

# Biologia molecolare della cellula 2

Giacomo Fantoni

Telegram: @GiacomoFantoni

Github: <https://github.com/giacThePhantom/BioMolCellula2>

**19 ottobre 2020**

# Indice

<b>1</b>	<b>Struttura e funzione dei cromosomi</b>	<b>3</b>
1.1	Organizzazione dei cromosomi	3
1.1.1	Ploidia	3
1.1.2	Ulteriore DNA presente nelle cellule	4
1.2	Impacchettamento del DNA cromosomale	4
1.2.1	Il nucleotide	4
1.2.2	DNA eucariotico	5
1.2.3	Il ciclo cellulare e la dinamicità dei cromosomi	5
1.3	Impacchettamento del DNA cromosomale degli eucarioti	5
1.3.1	Istoni	5
1.3.2	Livelli di compattazione	6
1.4	Modifiche covalenti degli istoni	7
1.4.1	Epigenetica	7
1.4.2	Acetilazione	7
1.4.3	Metilazione	8
1.4.4	Fosforilazione	8
1.4.5	Ubiquitinazione e sumoilazione	8
1.4.6	Codice istonico	8
1.5	Complessi rimodellatori dei nucleosomi	9
1.5.1	Ruoli dei rimodellatori della cromatina	9
1.5.2	Sottofamiglie	9
1.6	Variazione nella struttura cromatinica	10
1.6.1	Eucromatina	10
1.6.2	Eterocromatina	10
1.6.3	Effetti della cromatina	10
1.6.4	Nucleolo	10
1.7	Metilazione del DNA	11
1.7.1	DNA metilasi	11
1.7.2	Effetti della metilazione	11
1.7.3	La disattivazione del cromosoma <i>X</i> è un esempio di silenziamento epigenetico della metilazione di cromatina nei mammiferi	12
1.7.4	Imprinting genetico	12
1.8	La separazione dei domini cromatinici da elementi barriera	12
1.8.1	Variegazione da effetto di posizione	12
1.8.2	Elementi di barriera	13
1.9	Elementi richiesti per la funzione dei cromosomi	13

1.9.1	Origine di replicazione . . . . .	13
1.9.2	Centromeri . . . . .	13
1.9.3	Telomeri . . . . .	14
<b>2</b>	<b>Replicazione</b>	<b>16</b>
2.1	Replicazione del DNA semi-conservativa . . . . .	16
2.1.1	Modelli di replicazione . . . . .	16
2.2	Il modello dei repliconi . . . . .	17
2.3	Identificazione delle origini di replicazione . . . . .	17
2.4	Panoramica della replicazione del DNA . . . . .	17
2.5	Iniziazione . . . . .	17
2.6	Allungamento . . . . .	17
2.7	Terminazione . . . . .	17
2.8	Replicazione dei telomeri . . . . .	17
2.9	Correzione degli errori post-replicativa . . . . .	17
2.10	Mantenimento delle modifiche istoniche . . . . .	17
2.11	DNA polimerasi specializzate . . . . .	17
<b>3</b>	<b>Trascrizione</b>	<b>18</b>
<b>4</b>	<b>Processamento dell'RNA</b>	<b>19</b>
<b>5</b>	<b>RNA regolatori</b>	<b>20</b>
<b>6</b>	<b>Traduzione</b>	<b>21</b>
<b>7</b>	<b>Modifica e targeting delle proteine</b>	<b>22</b>
<b>8</b>	<b>DNA mobile</b>	<b>23</b>
<b>9</b>	<b>Strumenti e tecniche della biologia molecolare</b>	<b>24</b>

# Capitolo 1

## Struttura e funzione dei cromosomi

### 1.1 Organizzazione dei cromosomi

L'informazione genetica è impacchettata in almeno una molecola di DNA molto lunga, un cromosoma. Ogni cromosoma contiene una molecola di DNA a doppio filamento con molti geni e regioni di DNA non codificante. Si dicono intergeniche le regioni tra i geni. Se batteri ed archea possiedono cromosomi circolari gli eucarioti ne possiedono di lineari. La distribuzione dei geni varia tra gli organismi: quelli meno complessi tendono ad avere geni ordinati più densamente. La densità genica può variare anche sui diversi cromosomi degli organismi. Il numero dei cromosomi è caratteristico per una specie. Si possono fare incroci tra specie con numero di cromosomi diverso: in questo caso sono incapaci di accoppiarsi durante la prima parte della meiosi e l'incrocio risulta sterile.

#### 1.1.1 Ploidia

Con ploidia si intende quanti cromosomi identici possiede un organismo:

- Aploidia: 1 cromosoma come nel lievito.
- Diploidia: 2 cromosomi come negli umani.
- Poliploidia: più di 2 cromosomi come nelle piante.
- Aneuploidia: un numero anormale di cromosomi, può avvenire in caso di sindromi genetiche o cancro.

La poliploidia viene sfruttata nei prodotti ortofrutticoli per aumentarne le dimensioni.

#### Aneuploidia e aborti

L'aneuploidia può essere sopportata in un certo numero dagli organismi: si nota per la trisomia del cromosoma 21 (sindrome di Down) e le poliploidie, ma può essere mortale e causare un aborto spontaneo.

### Gametogenesi femminile

Si nota come con l'aumentare dell'età della donna aumenta il rischio di aneuploidia per i figli. Questo avviene in quanto ogni donna nasce con tutte le uova diploidi già presenti anche se immature. Queste maturano una alla volta dopo la pubertà una volta al mese. La continuazione della meiosi bloccata comincia il giorno prima dell'ovulazione a causa della gonadotropina. Un oocita primario può causare più errori durante la segregazione cromosomica nelle due fasi della meiosi rispetto a un uovo più giovane risultando in un uovo aploide con più o meno cromosomi.

### 1.1.2 Ulteriore DNA presente nelle cellule

#### Cellule eucariote

Le cellule eucariote possono avere DNA addizionale oltre il DNA cromosomale, in particolare in:

- Mitochondri: forniscono le cellule con ATP e sono organelli racchiusi da membrana con il proprio, solitamente circolare, cromosoma singolo.
- Cloroplasti: derivano l'energia dalla luce solare nelle piante, possiedono un proprio cromosoma.

Si pensa che questi organelli derivino da un batterio ancestrale assorbito e mantenuto da un altro organismo unicellulare.

#### Cellule batteriche

Le cellule batteriche possiedono DNA addizionale nelle proprie cellule: piccolo DNA circolare detto plasmide. Questi tipicamente codificano poche proteine che conferiscono un vantaggio selettivo come una resistenza ad un antibiotico.

#### Virus

I virus sono agenti infettivi che trasportano informazioni genetiche come piccoli cromosomi a DNA o RNA. I cromosoma virale può essere lineare o circolare, a doppio o singolo filamento.

## 1.2 Impacchettamento del DNA cromosomale

Si nota come per potersi adattare alle dimensioni del nucleo, delle cellule o di organelli intracellulari il DNA deve essere compattato. Compattare il genoma svolge anche una funzione di protezione, rendendolo meno accessibile da agenti esterni.

### 1.2.1 Il nucleoide

Nei procarioti, in assenza di nucleo il DNA si organizza in un nucleoide. È composto per l'80% di DNA e per il restante 20 di proteine di compattamento e RNA. Il cromosoma è pertanto composto da un grande complesso DNA proteine detto cromatina. Il nucleoide appare come una regione che esclude cromosomi, occupa  $\frac{1}{3}$  del volume della cellula ed è ancorato all'origine di replicazione nella membrana cellulare. Forma "loops" o domini di circa 40kb grazie alla proteina *HIF* (integration host factor), una piccola proteina carica positivamente per bilanciare le cariche negative sul backbone. Il DNA è successivamente superavvolto da altre proteine che piegano il DNA. L'IHF è costituito da un dimero su cui si forma il loop. Il superavvolgimento è controllato da altri fattori come fattori di

trascrizione e l'attività di DNA ed RNA polimerasi che creano due superavvolgimenti con polarità opposta ai lati della bolla.

#### 1.2.2 DNA eucariotico

Nel nucleo degli eucarioti i cromosomi subiscono cambi visibili durante il ciclo di divisione cellulare. Nelle cellule umane diploidi il DNA deve essere compattato 300 000-400 000 volte.

#### 1.2.3 Il ciclo cellulare e la dinamicità dei cromosomi

Durante la fase  $G_2$  del ciclo cellulare i cromosomi replicati si trovano in uno stato poco avvolto e si forma il centromero. Nella profase compaiono le fibre del fuso e i cromosomi si condensano. Nella prometafase le fibre si attaccano ai cromosomi che continuano a condensarsi. Nella metafase i cromosomi si allineano. Nell'anafase i centromeri si dividono e i cromatidi fratelli si muovono ai poli opposti. Durante la telofase si riforma la membrana nucleare, i cromosomi si decondensano e scompaiono le fibre del fuso.

### 1.3 Impacchettamento del DNA cromosomale degli eucarioti

#### 1.3.1 Istoni

Negli eucarioti gli istoni sono proteine leganti il DNA. Si trovano quattro istoni del nucleo: nascono molto presto nell'evoluzione ed essendo cruciali per la sopravvivenza sono altamente conservati. Gli istoni sono basici in quanto ricchi in lisina e arginina cariche positivamente grazie all'gruppo ammino  $+NH_3$  che stabilizzano le interazioni tra il DNA e gli istoni. 146bp si arrotolano 1.75 volte intorno a un complesso istonico in maniera sinistrorsa per formare un nucleosoma. Il complesso istonico prende il nome di ottamero istonico. Il superavvolgimento negativo facilita la separazione più facile, necessaria per la replicazione e la trascrizione. L'ottamero istonico ha due di ognuno dei quattro istoni del nucleo:  $H2A$ ,  $H2B$ ,  $H3$ ,  $H4$ . Inizialmente due dimeri  $H3-H4$  si associano con il DNA e reclutano poi due dimeri  $H2A-H2B$  per la formazione dell'ottamero. Nonostante tutto il DNA eucariote sia impacchettato dagli istoni i nucleosomi si formano preferenzialmente a sequenze di DNA. Il DNA è generalmente piegato dolcemente intorno agli istoni ma presenta curve più acute ???????? La scanalatura minore deve diventare più stretta durante il piegamento, cosa più favorevole in regioni ricche di  $AT$ . Gli istoni fanno 13 interazioni con gli istoni del DNA nucleosomale: i due dimeri  $H3-H4$  legano il centro e le terminazioni del DNA mentre  $2(H2A-H2B)$  legano 30bp su un lato del nucleosoma. Il core istonico è composto dai domini di histone-fold composti da tre  $\alpha$ -eliche.

#### Code istoniche

Il nucleo di una proteina istonica è legato a una lunga coda N-terminale che si estende verso l'esterno. Sono lunghe tra i 20 e i 39 amminoacidi e non hanno strutture. Interagiscono con altri nucleosomi per aiutare un ulteriore compattamento del DNA e strutture cromatiniche di livello superiore. La coda può essere modificata chimicamente in modo da modificare la struttura della cromatina e la sua funzione promuovendo o prevenendo il reclutamento di proteine che regolano la trascrizione.  $H2A$  e  $H2B$  presentano anche code C-terminali che regolano la trascrizione.

#### Varianti istoniche

Le varianti istoniche sono altre proteine con stabilità diverse, domini specialisti che cambiano la funzione del cromosoma, sequenze diverse alle terminazioni. Hanno amminoacidi diversi che possono essere diversamente modificati. Le varianti istoniche sono depositate da complessi di rimodellamento della cromatina dipendenti da ATP e possono essere dipendenti o indipendenti dalla replicazione.

#### Interazioni con il DNA

Gli istoni interagiscono con il DNA attraverso interazioni elettrostatiche tra i gruppi fosfato del legame fosfodiester e gli amminoacidi basici negli istoni e attraverso legami a idrogeno tra l'atomo di ossigeno nei gruppi fosfato e gli atomi di idrogeno nei gruppi ammino degli istoni. Modifiche chimiche delle basi o code istoniche attraverso enzimi modificano le cariche locali e le interazioni.

### 1.3.2 Livelli di compattazione

L'impacchettamento cromatinico ha diversi livelli di compattamento.

#### Primo livello

Il primo livello di compattazione è la fibra di 10nm, che nasce dall'associazione con il DNA dei nucleosomi con apparenza di perline su un filo.

#### Secondo livello

La fibra è ulteriormente compattata da una quinta proteina istonica *H1* in una fibra di 30nm nel secondo livello di compattamento, un ordinamento regolare che avvicina i nucleosomi. *H1* si lega al DNA linker tra due nucleosomi successivi diminuendo la lunghezza di 7 volte. Anche le code istoniche sono coinvolte nella formazione di questo secondo livello.

#### Terzo livello

Il terzo livello di compattamento, con diametro di 300nm si forma grazie a domini di loop radiali e al legame con la matrice nucleare nelle cellule in interfase. La matrice nucleare è composta dalla lamina nucleare composta da fibre proteiche della matrice interna e da proteine che legano ad essa i cromosomi. Le proteine attaccano la base di un loop di DNA alla fibra proteica grazie a sequenze specifiche *MAR* (matrix-attachment region) e *SAR* (scaffold attachment region). Si nota come ogni cromosoma occupa nel nucleo un territorio determinato

#### Quarto livello

I loop radiali diventano altamente compattati e rimangono ancorati alla matrice nucleare. Mentre la cellula entra in profase la membrana nucleare si dissolve e non si trova più una matrice nucleare: la compattazione aumenta drammaticamente nel quarto livello di compattazione o condensazione. Alla fine della profase i cromosomi sono interamente eterocromatici con un diametro di 700nm. Pertanto i cromosomi in metafase subiscono poca trascrizione e unicamente nel centromero. In questo momento i cromosomi hanno accesso al fuso mitotico.

##### Quinto livello

Il quinto livello di compattamento avviene con la formazione dei cromosomi visibili e grazie alla condensina. La condensina è una proteina che si sposta nel nucleo durante l'inizio della fase *M*, si lega ai cromosomi e compatta i loop radiali riducendo il loro diametro. Un'altra proteina coinvolta è la coesina caricata durante la fase *S* per tenere uniti i cromatidi fratelli.

## 1.4 Modifiche covalenti degli istoni

### 1.4.1 Epigenetica

Si intende per epigenetica l'ereditarietà di fenotipi non causati da cambi nella sequenza del DNA. È un fenomeno principalmente eucariote ed è causata da cambi strutturali nella composizione dei nucleosomi (varianti istoniche), modifiche chimiche della coda o nucleo istonico che altera lo stato di compattazione della cromatina e l'attività del nucleo del nucleosoma, metilazione del DNA alla citosina e dal legame di DNA o RNA con RNA non codificanti. Queste opzioni alterano l'espressione genetica. Cambi epigenetici sono trasferiti da cellula madre e figlia durante la replicazione del DNA e un numero di sindromi e cancro sono dovuti alla mal-regolazione di attività epigenetiche. Nei batteri la trascrizione dipende principalmente dall'RNA polimerasi e la sua regolazione allo stadio di iniziazione. Metilazione di adenosina e citosina intervengono nell'espressione genica, nella replicazione e riparazione del DNA e come difesa contro attacchi virali. Le modifiche chimiche più comuni sono alle code istoniche ma anche gli amminoacidi del nucleo globulare degli istoni possono essere modificati. Le modifiche sono principalmente acetilazione, metilazione, fosforilazione, ubiquitinazione e sumoilazione: "PUMAS". Tali modifiche vanno a colpire la struttura cromatinica e il reclutamento di proteine specifiche su di essa. Le modifiche epigenetiche sono molto veloci e reversibili attraverso enzimi e sono alla base di una veloce e precisa regolazione dell'attività genica.

### 1.4.2 Acetilazione

La maggior parte della cromatina possiede istoni acetilati, specialmente nelle code *H3* e *H4*. È associata con una trascrizione attiva: l'eucromatina è più acetilata. L'acetilazione di code e nuclei ha effetto sulla struttura cromatina:

- Direttamente: neutralizza le cariche positive sulla lisina sulla coda istonica riducendo le interazioni tra le code e il DNA rendendo la cromatina più accessibile da proteine leganti il DNA.
- Indirettamente: la lisina acetilata agisce come un sito di riconoscimento e legame per proteine contenenti bromodomini o lettori che possono reclutare altre proteine, componenti di grandi complessi che regolano la trascrizione come *HAT*, complessi di rimodellamento della cromatina e fattori di trascrizione che agiscono come *HAT*.

L'enzima responsabile per l'aggiunta di un gruppo acetile (mono-acetilazione) al gruppo ammino +  $\text{NH}_3$  della lisina è l'istone acetiltrasferasi *HAT*, mentre l'istone deacetilasi *HDAC* lo rimuove. L'acetilazione della lisina pertanto neutralizza direttamente la carica positiva di essa riducendo l'attrazione tra DNA  $\text{PO}_4^-$  e lisina  $\text{NH}_3^+$ . Inoltre diventa un sito di legame per proteine con bromodominio e rimodellatrici della cromatina aprendola e attivando la trascrizione. La deacetilasi agisce come repressione della trascrizione. La (de)acetilazione in regioni promotrici ha un ruolo nell'iniziazione della trascrizione. Altre acetilazioni sono presenti lungo sequenze codificanti, con



ruolo nell'allungamento della trascrizione. Se ne trovano ancora in enhancers o in varianti istoniche che presentano trascrizione attiva. Le proteine contenenti un bromodominio possono legarsi a una o più lisine acetilate attraverso il dominio e contengono altri domini come un dominio *PHD* che si lega a lisine metilate.

##### 1.4.3 Metilazione

La metilazione sugli istoni avviene grazie a un istone metiltrasferasi *HMT* che può aggiungere 1, 2 o 3 gruppi metile sul gruppo amminico della lisina *K* o 1 o 2 gruppi metile sul gruppo amminico dell'arginina *A*. La metilazione della coda e del core istonico ha due effetti sulla struttura cromatinica:

- Diretto: mantiene la carica locale della lisina positiva compattando il legame tra istoni e DNA.
- Indiretto: proteine contenenti cromodomini (*HP1*, *Polycomb*) riconoscono e legano a specifiche lisine metilate e reclutano proteine che causano il silenziamento trascrizionale (togliendo spazio al legame con fattori di trascrizione) o la sua attivazione.

La metilazione è associata sia con attivazione che con repressione della trascrizione in base al residuo che è metilato:

- Mono-metilazione di *K9* nella coda *H3* causa una cromatina attiva trascrizionalmente.
- Mono- o tri-metilazione di *K4* nella coda *H3* causa una cromatina attiva trascrizionalmente.
- Di- o tri-metilazione di *K9* nella coda *H3* causa una cromatina silente trascrizionalmente.

##### 1.4.4 Fosforilazione

I fosfati sono aggiunti da chinasi e rimossi da fosfatasi. La fosforilazione aggiunge una carica negativa alla coda istonica. Fosforilazione di *S10* nella coda *H3* permette la crescita cellulare e trascrizione promuovendo l'acetilazione di *K14* sulla coda *H3*. La fosforilazione di *S10* e *S27* nella coda *H3* è correlata con la condensazione dei cromosomi durante la mitose. È importante per la replicazione e riparazione del DNA e per l'apoptosi.

##### 1.4.5 Ubiquitinazione e sumoilazione

L'ubiquitinazione delle lisine consiste nell'aggiunta di una proteina di 76 amminoacidi catalizzata dall'ubiquitina ligasi e rimossa dalla de-ubiquitinasi. Il suo ruolo non è compreso a fondo e avviene specialmente nelle code C-terminali di *H2A* e *H2B*. Regola la trascrizione reclutando rimodellatori e risposte al danno del DNA. Una mono-ubiquitinazione di *H2A* causa repressione trascrizionale mentre se avviene a *H2B* causa un'attivazione indiretta in quanto richiesta per la mono-metilazione di *H3K4* e di *H3K79*. La sumoilazione della lisina è una modifica simile all'ubiquitinazione e gioca un ruolo nella regolazione di trascrizione e riparazione di DNA.

##### 1.4.6 Codice istonico

Le grandi possibili modifiche in aggiunta con le loro interazioni porta alla definizione di un codice istonico in cui modifiche uniche definiscono certi stati di cromatina e di espressione genica.

## 1.5 Complessi rimodellatori dei nucleosomi

La cromatina compattata rappresenta una barriera per le proteine che devono accedere al DNA e pertanto inibisce processi come trascrizione. La composizione del nucleosoma, la compattezza del suo legame con il DNA e la sua locazione possono essere fisicamente cambiati da complessi di rimodellamento dei nucleosomi dipendenti da ATP. Questi complessi possono introdurre loop nel DNA avvolto intorno a un nucleo istonico, far scivolare il DNA lungo l'ottamero istonico o rimuovere l'intero ottamero o 1-2 proteine istoniche e trasferirle da qualche altra parte. Possono attivare o reprimere la trascrizione ma non sono usati per la replicazione.

### 1.5.1 Ruoli dei rimodellatori della cromatina

I complessi di rimodellamento della cromatina hanno diversi ruoli nello stato cromatinico. Possono intervenire dopo la deposizione degli istoni durante la maturazione dei nucleosomi portando a una loro spaziatura regolare. Possono inoltre alterare lo stato cromatinico riposizionando i nucleosomi, espellendoli completamente o solo alcune loro subunità. Possono inoltre compiere installazioni o rimozioni di varianti istoniche.

### 1.5.2 Sottofamiglie

Esistono diverse classi di rimodellatori dei nucleosomi, ma tutte contengono dei domini chiave:

- Dominio motore ATPasi come *Dexx* e *HELICc*.
- Bromodominio o cromodominio.
- Dominio legante actina *HSA*.
- Dominio per il legame alla coda istonica *SANT* e *SLIDE*.

#### Switch/sucrose non-fermentable

Il complesso *SWI/SNF* facilita l'accesso alla cromatina: fa scivolare ed espelle i nucleosomi per l'attivazione o repressione genica.

#### Imitation switch

Il complesso *ISWI* assembla e spazia i nucleosomi principalmente per la repressione della trascrizione.

#### Cromodominio elicasi legante il DNA

Il complesso *CDH* è usato per l'assemblaggio dei nucleosomi e la loro spaziatura, per l'accesso ai geni esponendo i promotori e l'editing attraverso l'incorporazione di *H3.3*. Aiuta i repressori a legarsi alla cromatina e reprimere i geni attraverso *HDAC* associate.

#### Richiedenti inositolo

Il complesso *INO80* interagisce con *HAT* per attivare la trascrizione. Interviene anche nell'assemblaggio e spaziatura dei nucleosomi oltre a sostituire *H2A* con *H2A.Z* per la riparazione del DNA.

## 1.6 Variazione nella struttura cromatinica

I cromosomi subiscono varie fasi di compattazione diversa durante il ciclo cellulare. Durante l'interfase, quando i cromosomi sono relativamente poco condensati, i geni sono trascritti e il genoma è replicato si trova un gran numero di compattazione lungo il cromosoma. Della trascrizione può avvenire nelle regioni eterocromatiche, ma la traslocazione di un gene da una regione eucromatica a una eterocromatica può prevenire attivamente la sua trascrizione. Il livello di compattamento della cromatina non è uniforme e l'epigenetica rappresenta il suo ultimo livello di regolazione.

### 1.6.1 Eucromatina

Si dicono eucromatiniche le regioni dove le fibre di 30nm formano domini radical loop formando cromatina a 300nm. Questa zona è trascrizionalmente attiva.

### 1.6.2 Eterocromatina

Nell'eterocromatina i domini radical loop sono ulteriormente compattati attraverso metilazione della coda istonica a formare una cromatina a 700nm. L'eterocromatina si divide in costitutiva, o regioni sempre eterocromatiche permanentemente disattivate rispetto alla trascrizione o silenti e facoltativa, o regioni di cromatina che cambiano stato tra eucromatina ed eterocromatina. Alcune zone dei cromosomi sono altamente eterocromatiche:

- Telomeri: regioni di DNA alla terminazione dei cromosomi.
- Peri-centromeri.
- Regioni con sequenze di DNA altamente ripetute come l'rDNA nei nucleoli.

### 1.6.3 Effetti della cromatina

La cromatina ha effetto su trascrizione, replicazione, ricombinazione e trasmissione dei cromosomi. Riarrangiamenti che spostano un'origine di replicazione nell'eterocromatina causano una replicazione tardiva, arrivando fino a ritardare la divisione cellulare. La ricombinazione coinvolge rotture e riunioni di DNA di diverse molecole. Le regioni eterocromatiche ne subiscono di meno, proteggendo la regione contro tale modifica, cosa che avviene come nei geni di ripetizione di DNA ribosomiale. I cromosomi devono essere completamente compattati affinché avvenga la trasmissione e segregazione dei cromosomi.

### 1.6.4 Nucleolo

Il nucleolo è la parte del nucleo che contiene i geni di rDNA. Gli esseri umani possiedono cinque cluster di rDNA vicino la fine di cinque cromosomi. Si dice regione organizzatrice dei nucleoli i trascritti di rRNA prodotti dalle ripetizioni dall'rDNA. rDNA codifica per l'rRNA ribosomiale e molte cellule possiedono migliaia di ripetizioni di rDNA per riuscire a soddisfare la richiesta di rRNA e produzione di ribosomi. Il nucleolo non è separato da una membrana: sono le proteine e le RNA ad esso specifiche che gli conferiscono diversi pattern di colorazione. Un sottoinsieme di ripetizioni di rDNA sono silenti trascrizionalmente ed eterocromatiche in modo da aumentare la stabilità delle regioni ripetute.

## 1.7 Metilazione del DNA

Il DNA può essere modificato chimicamente attraverso la metilazione, che avviene in batteri ed eucarioti. I gruppi metile possono essere aggiunti a residui di citosina per creare la *5-metil citosina* attraverso DNA metiltransferasi o DNA metilasi. La modifica è reversibile grazie alla DNA demetilasi. La metilazione è rischiosa in quanto può alterare il DNA permanentemente. Le citosine metilate infatti possono subire una spontanea deamminazione idrolitica che cambia la citosina in timina con cambio mutagenico.

### 1.7.1 DNA metilasi

Le DNA metilasi utilizzano un base flipping per accedere alla citosina: una citosina è fatta uscire dalla doppia elica: un amminoacido dell'enzima è inserito temporaneamente al suo posto. La citosina viene poi metilata e reinserita nel DNA.

### 1.7.2 Effetti della metilazione

#### Nei procarioti

Nei procarioti la metilazione del DNA distingue il DNA appena sintetizzato nel processo di riparazione: appena dopo la replicazione solo il filamento genitore è metilato: questa regione si dice emi-metilata. Quando gli enzimi di riparazione del mismatch ne trovano uno leggono lo stato metilato per identificare correttamente il filamento parentale e riparare quello appena sintetizzato. La metilazione permette anche ai batteri di distinguere il DNA genomico da quello virale invasivo: enzimi di restrizione tagliano il DNA del fago a siti di riconoscimento specifici e durante il taglio il batterio protegge il proprio DNA metilando i siti di restrizione.

#### Negli eucarioti

La metilazione del DNA negli eucarioti silenzia la trascrizione. È pertanto un'altra forma di silenziamento epigenetico. Non cambia la carica della base e l'effetto repressivo è indiretto in quanto comporta il reclutamento di proteine lettrici che riconoscono e legano la base metilata. La metilazione avviene tipicamente a siti *CpG* o *CpXpG*, dove *p* è il legame fosfodiesterico e *X* una base qualsiasi. Circa il 60% delle *CpG* umane sono metilate. La metilazione può anche essere ereditata. Alcuni complessi si legano specificatamente a DNA metilato come enzimi di modifica istonica e complessi di rimodellamento della cromatina. Alcune proteine leganti istoni possono reclutare DNA metiltransferasi.

**Isole *CpG*** Le sequenze *CpG* non sono distribuite uniformemente nel genoma ma si trovano in lunghezze di 1-2kb dove il 60% del contenuto di DNA forma queste isole *CpG*. Sono studiate principalmente per la disattivazione del cromosoma *X*, si trovano in tutti i geni housekeeping, principalmente nella zona 5' nel promotore. Sono principalmente hypo-metilate, protette dalla metilazione e si correla con un'alta attività di trascrizione. *CpG* sono riconosciute da proteine *MBD* (metil-CpG-binding domain) con un dominio di legame di DNA e di un dominio repressore della trascrizione che possono reclutare complessi di rimodellazione della cromatina che disattivano la trascrizione. La metilazione può anche proibire il legame con fattori di trascrizione alle proprie sequenze di riconoscimento del DNA in un processo di mascheramento di *C*. La demetilazione avviene quando un gene deve essere trascritto. La metilazione di *CpG* è ereditata grazie all'enzima DNA metiltransferasi *DNMT1* che riconosce il sito emimetilato e lo rende completamente metilato.

### 1.7.3 La disattivazione del cromosoma $X$ è un esempio di silenziamento epigenetico della metilazione di cromatina nei mammiferi

Un cromosoma  $X$  in ogni cellula è disattivato nelle femmine in modo che abbiano la stessa quantità di prodotto di gene  $X$  come nei maschi che ne possiedono uno solo. Il DNA è altamente metilato,  $H2A$  è sostituito con *MacroH2A-Z*, gli istoni sono modificati come in eterocromatina ed avviene una regolazione basata su long non-coding RNA. La disattivazione del cromosoma  $X$  è casuale ed avviene alla gastrulazione nell'embrione, ognuna delle cellule possono scegliere individualmente quale dei due cromosomi  $X$  disattivare e la scelta viene ereditata. Uno dei due cromosomi si presenterà pertanto più denso, compatto e su un lato del nucleo. Circa il 15% dei geni legati a  $X$  non vengono disattivati completamente e la loro attività genica varia tra i cromosomi disattivati. La maggior parte di questi si trova nelle regioni pseudoautosomiali *PAR*, dove  $X$  e  $Y$  si accoppiano durante la meiosi.

#### Non corretta disattivazione di $X$ durante la gastrulazione

**Gatti calico** La colorazione rossa del pelo dei gatti è dovuta a un gene nel cromosoma  $X$ , in cui l'allele rosso sintetizza un enzima che crea il pigmento arancio, mentre un altro non lo esprime e causa una colorazione nera. Nel caso in cui un gene  $X$  non sia disattivato e i maschi presentano  $XXY$  presentano una colorazione arancio e nera, oltre ad essere sterili.

### 1.7.4 Imprinting genetico

Una parte dell'attività genetica è controllata dall'imprinting genetico, che regola l'espressione di geni materni e paterni nell'embrione, casualmente in alcune cellule è silenziata la copia materna, in altre quella paterna. Se una delle copie di un gene è silenziata e l'altra è stata deleta non si trova espressione genica.

#### Disordini fisici e neurologici dovuti alla misregolazione dei geni soggetti a imprinting attraverso metilazione di citosina

**Sindrome di Rett** Questa sindrome è dovuta a una mutazione disattivante in un allele del *MECP2*. Avviene quando *MECP2* in un allele non è espresso a causa di metilazione. Uno di questi geni deve essere sempre espresso per la vitalità.

**Sindrome di Prader-Willy e di Angelman** In queste due sindromi sono colpiti gli stessi alleli del cromosoma 15. *PWS* avviene quando una regione paterna di 7 geni è eliminata. *AS* avviene quando è eliminata la regione materna. Le sindromi si manifestano quando l'altro allele parentale è espresso sub-ottimamente a causa dell'imprinting. Un insieme allelico parentale deve essere intatto per la sopravvivenza dell'embrione.

## 1.8 La separazione dei domini cromatinici da elementi barriera

### 1.8.1 Variegazione da effetto di posizione

Un effetto epigenetico è la variegazione da effetto di posizione. Un suo esempio è il colore dell'occhio di *Drosophila* in cui si presentano rossi grazie all'espressione del gene *white*<sup>+</sup>. In alcuni casi gli occhi

possono presentare sfaccettature bianche se il gene viene convertito in una regione eterocromatica in qualche cellula in cui risulta silenziato.

### 1.8.2 Elementi di barriera

Le cellule possiedono elementi di barriera che separano eu ed eterocromatina. Questi elementi possono prevenire la diffusione dell'eterocromatina. In *S. pombe* due elementi di barriera affiancano una regione di eterocromatina silente intorno al centromero. Gli *H3* negli elementi di barriera sono altamente metilati a *K9* silenziando la regione, mentre quelli fuori la barriera sono altamente metilati a *K4* attivando la regione. La rimozione di questi elementi permette la diffusione di metilazione *K9* e della zona silenziata. L'eterocromatina può infatti diffondersi attraverso modifiche di istoni successive come deacetilazione di *H3* la sua metilazione a *K9* e il legame della proteina di silenziamento *Swi6*. Gli elementi di barriera agiscono come barriere fisiche e possono essere sequenze specifiche a cui si legano proteine regolatrici delle modifiche istoniche o grandi loop di cromatina. Elementi di sequenze di barriera possono ancorare gli anelli nella lamina nucleare: l'eterocromatina si trova nelle regioni periferiche del nucleo in quanto *SAR/MAR* affiancano spesso elementi di sequenza di barriera.

## 1.9 Elementi richiesti per la funzione dei cromosomi

### 1.9.1 Origine di replicazione

Le origini di replicazione sono regioni del DNA con sequenze specifiche richieste per la replicazione in batteri ed eucarioti. Le *Ori* sono dove il dsDNA è svolto e separato per prepararsi all'attacco delle proteine di replicazione. La replicazione è bidirezionale:

- Nei batteri si trova un *Ori* per cromosoma e si indica con *ter* gli elementi di terminazione della replicazione.
- Negli eucarioti si trovano diverse *Ori* lungo il cromosoma in quanto si ha più cromosoma da replicare

### 1.9.2 Centromeri

I centromeri si trovano in tutti i cromosomi eucarioti. Sono sequenze che si trovano tipicamente al centro del cromosoma e sono necessarie per la segregazione dei cromosomi durante la divisione cellulare. La maggior parte delle specie ne possiedono 1 per cromosoma. Si trova in una regione eterocromatica e dopo la replicazione del DNA 2 cromatidi fratelli si formano e sono uniti dai complessi di anelli di coesina. Il centromero appare come una costrizione dovuta all'arricchimento locale di coesina che si trova in una quantità minore lungo l'intero paio di cromatidi. Il centromero ha dimensioni variabili a seconda della specie e si distingue in:

- Centromero puntiforme con sequenze definite di poche centinaia di basi.
- Centromero regionale con centinaia di kilobasi.

Alcuni organismi possiedono molti centromeri lungo il cromosoma e sono detti olocentrici. I microtubuli si attaccano su tutta la lunghezza del cromosoma. Durante la mitosi si possono segregare frammenti di cromosomi.

### Il cinetocore

Il centromero recluta più di 100 proteine che formano il cinetocore che attacca i cromatidi fratelli ai microtubuli che si estendono da poli opposti del fuso, permettendo ad esso di separare i cromatidi attraverso la depolimerizzazione dei microtubuli. Questo meccanismo di segregazione è altamente conservato.

### Esempi di centromeri

**S. cerevisiae** Il centromero è lungo 125bp e possiede tre regioni *CDEI*, *CDEII* e *CDEIII*, la prima e la terza possiedono sequenze altamente conservate e singole mutazioni possono rompere la funzione del centromero. *CDEII* invece è una regione ricca di *AT* e la sequenza esatta non è fondamentale.

**S. pombe** Ogni cromosoma di *S. pombe* presenta un cromosoma con una sequenza di centromero leggermente diversa con un nucleo unico di 5-6kb con lunghe sequenze di ripetizioni inverse che lo affiancano.

**Esseri umani** I centromeri sono lunghi 1Mb e sono fatte di sequenze ripetute dette ripetizioni  $\alpha$ -satellite, lunghe 171bp ordinate in ripetizioni di ordine più alto. I nucleosomi centromerici possiedono varianti istoniche di *H3* *CENP-A* particolarmente nelle regioni ricche di *AT* che potrebbe riconoscere gli *i-motivi* e diadi. Il centromero marcato da *CENP-A* è dove il cinetocore si assembla. Una sovraespressione di *CENP-A* causa un legame del cinetocore con tutto il cromosoma e una sua rottura durante la segregazione.

### 1.9.3 Telomeri

I telomeri sono regioni alle terminazioni dei cromosomi lineari e funzionano come cappucci protettivi. Negli esseri umani sono formati da sequenze ripetute centinaia di migliaia di volte di *TTAGGGG*, marcano la terminazione del cromosoma definendolo e impedendo la fusione di cromosomi alle loro terminazioni. Infatti più un cromosoma è lungo più è propenso a subire rotture. Il DNA dei telomeri consiste di un filamento ricco di *G* e uno ricco di *C*. La lunghezza totale delle ripetizioni varia tra i 50 000 e i 30 000bp in base alla specie. La sequenza ricca di *G* si estende 5'-3' verso la terminazione del cromosoma dove termina in una regione corta a filamento singolo. Negli organismi con telomeri lunghi questa regione può essere processata in un rolled back T-loop formato dall'invasione e accoppiamento di basi del filamento singolo con la sequenza a doppio filamento a monte. Le ripetizioni sono un sito di legame per proteine che le marcano come terminazioni naturali distinguendoli dalle rotture del DNA. La DNA polimerasi non può copiare la terminazione di una molecola di DNA e pertanto interviene la telomerasi per mantenere le terminazioni dei cromosomi.

### Telomerasi

Le proteine *TRF1* e *TRF2* (*TTAGGGG* repeat binding factor), *TIN2* e *RAP1* si legano ai telomeri e proteggono le loro terminazioni. La terminazione di ogni telomero forma un T-loop composto da una ripetizione *TTAGGGG* 3' a filamento singolo che lega una sequenza complementare in una sequenza a monte denaturata detta D-loop (displacement loop) e viene stabilizzata da copie multiple di *POT1* che vi si lega. La telomerasi è una speciale DNA polimerasi che possiede una proteina e una componente a RNA: forma un *RNP*. L'RNA della telomerasi fornisce un corto stampo che specifica la sequenza della ripetizione telomerica che deve essere aggiunta. La telomerasi pertanto sintetizza il DNA telomerico usando l'RNA come stampo. La lunghezza dei telomeri è mantenuta

### *1.9. ELEMENTI RICHIESTI PER LA FUNZIONE DEI CROMOSOMI*

---

nelle cellule staminali e germinali, mentre nei tessuti maturi si trova una telomerasi insufficiente e avviene un accorciamento dei telomeri. Che limita il numero di divisioni cellulari che la cellula può avere. Una sovraattivazione della telomerasi è implicata in molti cancro e permette alle cellule di continuare a crescere e a dividersi.



## Capitolo 2

# Replicazione

### 2.1 Replicazione del DNA semi-conservativa

Durante la divisione cellulare l'informazione genetica deve essere copiata e distribuita equamente tra le cellule figlie. Dopo la scoperta della struttura a doppia elica del DNA si ragionò come i due filamenti complementari sono copiati e replicati.

#### 2.1.1 Modelli di replicazione

- Replicazione conservativa: il DNA rimane intatto come un doppio filamento e agisce come stampo.
- Replicazione semi-conservativa: un filamento agisce come stampo per sintetizzare un nuovo filamento complementare.
- Replicazione dispersiva: il doppio filamento si rompe nella sua lunghezza e frammenti sovrapposti servono come stampi per la sintesi.

#### Determinazione del modello semi-conservativo

Per determinare il modello di replicazione Meselson e Stahl idearono un esperimento che utilizzava un gradiente di densità e ultra-centrifugazione.

**Tecnica del gradiente di densità** Gli scienziati presero un tubo di plastica in cui era presente un gradiente del sale cloruro di cesio. In questo modo aggiungendo componenti di diversa densità in cima al gradiente e centrifugandoli ad alta velocità la forza gravitazionale trasporta le componenti nel gradiente in modo che si fermino quando la loro densità è uguale alla densità locale della soluzione di *CsCl*. Le componenti a bassa densità sono posizionate più in alto nel gradiente, mentre quelle a densità più alta in basso. Quando le componenti si sono mosse attraverso il gradiente durante la centrifugazione si prendono campioni dal basso all'alto attraverso frazionamento.

**Rendere il DNA più pesante** Per rendere il DNA di nuova sintesi più pesante rispetto a quello originale viene utilizzato un isotopo dell'azoto  $^{15}N$  in quanto è la massa dell'elemento più frequente e può essere sintetizzato in forma radioattiva.

**L'esperimento** Gli scienziati fecero crescere una coltura di *E. coli* per 4 divisioni cellulari in un medio minimale contenente glucosio e con  $15\text{NH}_4\text{Cl}$  come l'unica fonte di azoto. Il DNA alla fine pertanto conterrà  $15\text{N}$  nelle basi nucleotidiche. Prendendo un campione della coltura della quarta divisione cellulare e isolandolo. Successivamente si isola il resto dei batteri attraverso centrifugazione, li si lava e risospende nel medio minimale con  $14\text{NH}_4\text{Cl}$  come unica fonte di azoto. Si lascia crescere e dividere la coltura così ottenuta prendendo campioni ogni divisione. Si isola il DNA dai vari campioni e lo si carica su un tubo a gradiente di  $\text{CsCl}$  separato. Successivamente si ultracentrifugano tutti i tubi in parallelo, si fraziona i campioni e si fa correre il DNA su un gel di agarosio e li si trasferisce su membrana di nitrocellulosa. Infine si espone la membrana a un foto film.

**Conclusioni** Si nota come in base al modello si osserverebbero comportamenti diversi:

- Modello conservativo: il numero di batteri con  $15\text{N}$  rimarrebbe costante e aumenterebbe quella con  $14\text{N}$ , presentando pertanto due bande, una per l'isotopo e una per  $14\text{N}$ .
- Modello dispersivo: i batteri presenterebbero tutti del DNA ibrido contenente sia  $15\text{N}$  che  $14\text{N}$ , presentando pertanto una banda unica all'ibrido.
- Modello semi-conservativo: si troverebbe nella popolazione un numero di molecole contenenti uno strand con  $15\text{N}$  e l'altro  $14\text{N}$ , mentre il resto tutto a  $14\text{N}$ , pertanto si noterebbero due bande, una per  $14\text{N}$  e una per l'ibrido.

Si osserva che avviene il terzo caso, determinando che la replicazione è semi-conservativa.

## 2.2 Il modello dei repliconi

## 2.3 Identificazione delle origini di replicazione

## 2.4 Panoramica della replicazione del DNA

## 2.5 Iniziazione

## 2.6 Allungamento

## 2.7 Terminazione

## 2.8 Replicazione dei telomeri

## 2.9 Correzione degli errori post-replicativa

## 2.10 Mantenimento delle modifiche istoniche

## 2.11 DNA polimerasi specializzate

## Capitolo 3

# Trascrizione

## Capitolo 4

# Processamento dell'RNA

## Capitolo 5

# RNA regolatori

## Capitolo 6

# Traduzione

## Capitolo 7

# Modifica e targeting delle proteine

## Capitolo 8

# DNA mobile



## Capitolo 9

# Strumenti e tecniche della biologia molecolare