

Biologia molecolare della cellula 2

Giacomo Fantoni

Telegram: @GiacomoFantoni

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

15 ottobre 2020

Indice

1	Struttura e funzione dei cromosomi	3
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
1.6	Variazione nella struttura cromatinica	9
1.7	Metilazione del DNA	9
1.8	La separazione dei domini cromatinici da elementi barriera	9
1.9	Elementi richiesti per la funzione dei cromosomi	9
1.10	Centromeri	9
1.11	Telomeri	9
2	Replicazione	10
3	Trascrizione	11
4	Processamento dell'RNA	12
5	RNA regolatori	13
6	Traduzione	14
7	Modifica e targeting delle proteine	15

INDICE

8	DNA mobile	16
9	Strumenti e tecniche della biologia molecolare	17

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 nucleotide

Nei procarioti, in assenza di nucleo il DNA si organizza in un nucleotide. 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 nucleotide 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 α -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 + 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 PO_4^- e lisina 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

1.6 Variazione nella struttura cromatinica

1.7 Metilazione del DNA

1.8 La separazione dei domini cromatinici da elementi barriera

1.9 Elementi richiesti per la funzione dei cromosomi

1.10 Centromeri

1.11 Telomeri

Capitolo 2

Replicazione

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