

# Cap. 7 – Interazioni fra le cellule e il loro ambiente

Matteo Paolucci

## Lo spazio extracellulare

carboidrati legati a proteine di membrana → formazione strato (glicocalice o rivestimento cellulare)  
glicocalice:

- contiene anche materiale extracellulare secreto da cellule
- media interazioni cellula-cellula e cellula-substrato
- protezione meccanica
- barriera



## La matrice extracellulare

MEC – rete organizzata di materiale extracellulare presente nelle immediate vicinanze della membrana plasmatica

- ruolo nel determinare forma e attività cellula

→ membrana o lamina basale

- strato spesso di 50-200 nm
  - circonda cellule muscolari
  - sotto superficie basale cellule epiteliali (epidermide, canale digerente e respiratorio)
  - rivestimento interno vasi sanguigni
- supporto meccanico per adesione cellule
- determinazione delle vie di migrazione cellulare
- funzione di barriera al passaggio di macromolecole
  - impedire passaggio di proteine fuori da circolo sanguigno (nei capillari) → rene
- barriere contro invasione dei tessuti da parte di cellule cancerose circolanti

matrice extracellulare può assumere diverse forme, ma composta da proteine molto simili

- maggior parte di proteine extracellulari è di tipo fibroso
- impalcature, travi, cemento e reti
- fibronectina, collagene, laminina, integrina, proteoglicani

## Collagene

famiglia di glicoproteine fibrose presenti solo nella matrice extracellulare  
elevata resistenza a trazione

- fibra di 1 mm di diametro sopporta 10 kg

tipo di proteina più abbondante nel corpo (25%)

prodotto principalmente da fibroblasti (in connettivi) e da cellule muscolari lisce e epiteliali

19 tipi con particolari localizzazioni nel corpo

- 2 o più tipi generalmente in stessa MEC
- esistono anche fibre eterotipiche (diversi tipi dentro stessa fibra)

caratteristiche strutturali comuni:

- tripli formati da 3 catene polipeptidiche [catene  $\alpha$ ]
- le tre catene sono avvolte l'una intorno all'altra almeno per un tratto
- collagene fibrillari: tipi I, II, III → si assemblano in fibrille a forma di cavo che si associano in fibre più spesse
  - all'interno di una fibrilla, molecole di collagene sono sfalsate per circa  $\frac{1}{4}$  della loro lunghezza rispetto a molecole vicine → maggiore resistenza meccanica
    - → bandeggio delle fibrille
  - fibrille rinforzate da legami covalenti crociati fra i residui di lisina ed idrossilisina di molecole di collagene adiacenti
    - processo dura tutta la vita → diminuita elasticità e maggiore fragilità negli anziani

nella MEC, collagene forma impalcatura insolubile → proprietà meccaniche matrice

- es.: tendini → fibre collagene in MEC allineate lungo asse maggiore tendine, parallelamente a direzione forza di trazione

- es.: stroma corneale: fibrille brevi parallele, in strati tra loro perpendicolari → resistenza ma passaggio luce

anomalie del collagene possono portare a gravi patologie (osteogenesis imperfecta, nanismo, deformità, sindromi di Ehler-Danlos, sindrome di Alport [tipo IV])

non tutti i collagene formano fibrille → tipo IV: distribuzione limitata a laminae basali

- formazione rete → supporto meccanico; traliccio per deposizione di altri materiali extracellulari
- trimeri contengono diversi elementi di interruzione della tripla elica
  - flessibilità
- presentano domini globulari a ciascuna estremità
  - siti di interazione tra molecole che danno al complesso il suo aspetto a rete

### Proteoglicani

notevoli quantità in membrane basali e matrici extracellulari

complesso proteico-polisaccaridico:

- nucleo polipeptidico
  - attaccate covalentemente a questo: catene di glicosaminoglicani (GAG)
    - catene: disaccaridi ripetuti (struttura A-B-A-B ecc.)
    - altamente acidi → presenza di gruppi solfato e carbossilici legati a anelli zuccheri
    - cheratan solfato, condroitin solfato, dermatan solfato, eparina

proteoglicani della matrice → assemblati in complessi giganti:

- legami degli assi proteici con una molecola di *acido ialuronico*, un GAG non solforato
- es.: proteoglicano aggregano → matrice cartilagine:
  - contiene 30 catene di cheratan solfato e 100 di condroitin solfato
  - tanti di questi proteoglicani sono attaccati a molecole di acido ialuronico perlecani, agrine → membrane basali
  - poche catene di GAG attaccate a scheletro proteico

GAG: cariche negative → legano numero enorme di cationi (che attirano e trattengono acqua)

- → formano gel poroso e idratato che riempie gli spazi extracellulari: resistenza a compressione

proteoglicani + collagene → solidità e resistenza a deformazioni a matrice extracellulare e cartilagine

### Fibronectina

struttura: due catene polipeptidiche simili unite da un paio di ponti disolfuro vicino all'estremità C-terminali

- ciascun polipeptide è formato da serie lineare di moduli distinti (30 domini Fn ripiegati in modo indipendente) → organizzati in unità funzionali più grandi (5 o 6)
  - ciascuna unità contiene uno o più siti di legame per un componente specifico della MEC (formazione rete stabile e interconnessa) e per superficie cellulare (sequenza arg-gly-asp o RGD → si lega a integrine transmembrana; fa parte di membr. basale: mantiene forma cellula e permette migrazione)
  - domini Fn fanno parte di numerose proteine → domini comuni
    - molti dei geni attuali sono stati generati durante evoluzione da fusione di parti di geni ancestrali originariamente separati

importante durante attività dinamiche dei tessuti (es.: sviluppo embrionale)

- guida migrazioni cellulari (es.: creste neurali, cellule germinali primordiali, progenitori cellule linfoidi)

### Laminina

famiglia di glicoproteine extracellulari

- 3 differenti catene polipeptidiche legate da ponti disolfuro
  - $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  con domini globulari

- struttura a croce con 3 braccia corte e una lunga
- ruolo in migrazione, crescita, differenziamento cellula  
 si lega a recettori della superficie cellulare e a altre molecole di laminina  
 laminina + collagene IV → in membrane basali: formano reti separate ma interconnesse (forniscono resistenza e flessibilità); interconnessione tramite molecole di entactina  
 proprietà dinamiche MEC:
- può essere allungata
  - continua degradazione/ricostruzione (es.: ossa)
    - degradazione dei materiali compiuta da famiglia di enzimi contenenti zinco: metalloproteinasi della matrice (MMP)
      - secreti nello spazio extracellulare
      - legati su superficie esterna membrana
      - inappropriata attività → artrite, sclerosi multipla, aterosclerosi, deterioramento denti, progressione tumorale

### Interazioni delle cellule con substrati non cellulari

recettori cellulari possono legare componenti MEC (fibronectina, collagene, laminina, proteoglicani):

#### Integrine

superfamiglia di proteine integrali di membrana – tutte le cellule dei vertebrati  
 2 catene polipeptidiche transmembrana, una catena  $\alpha$  (18 tipi) e una catena  $\beta$  (8 tipi) legate tra loro non covalentemente → tante combinazioni possibili, ma solo due dozzine di integrine identificate ognuna con distribuzione tessuto-specifica

- cellule → varietà di integrine; stessa integrina → in differenti tipi cellulari
- 2 subunità (singola elica transmembrana) formano testa globulare extracellulare connessa alla membrana da un paio di steli rigidi
- porzione extracellulare: sito di legame per ligandi
    - N-terminale extracellulare: 7 moduli di ripetizione, ognuno con 60 aminoacidi
    - ripiegata a singolo dominio → forma appiattita e circolare: “elica  $\beta$  a 7 pale”
      - 3 ioni Calcio nelle pale 5, 6, 7 → necessari per mantenere struttura appropriata dell’integrina

subunità  $\alpha$  – due gruppi:

- sito di legame per ligando in elica  $\beta$  a 7 pale
- in metà, dominio I: elemento globulare di 200 aminoacidi che si poggia sopra elica tra 2° e 3° pala → sito di legame

subunità  $\beta$ : sito di legame sempre in dominio I

- dominio I (o I-simile) sempre presente; elica mai presente

integrine possono essere inattive → attivate da cambio conformazionale di propri domini citoplasmatici: aumenta affinità per ligando (es.: aggregazione piastrine per formazione coagulo dopo attivazione integrine – affinità per fibrinogeno)

2 principali attività

- adesione di cellule a substrato o a altre cellule
- trasmissione di segnali da ambiente esterno a interno (attraverso cambi conformazionali → legame in un'estremità modifica affinità dell'altra estremità)
  - segnali: influenzano mobilità, crescita e sopravvivenza cellule

Integrine 1:

- favoriscono attacco a membrana basale
- nell'epidermide, finché nelle cellule c'è integrina, continua ad avvenire divisione cellulare

proteine extracellulari che legano integrina: sequenza arginino-glicina-acido aspartico (RGD)

- sito di legame per RGD in dominio I-simile di subunità  $\beta$

maggior parte integrine: funzioni uniche → topi knockout a cui mancano differenti subunità di integrine esibiscono fenotipi diversi

#### Adesioni focali ed emidesmosomi: l'ancoraggio delle cellule al substrato

contatto cellula-substrato → cellula invia proiezioni che formano adesioni progressivamente più stabili

- → cellula si appiattisce e si estende sul substrato (piastra di coltura)
- contatto avviene solo in siti ben definiti: adesioni (o contatti) focali
  - strutture dinamiche che possono disassemblarsi
  - regione con ammassi di integrine
    - legame extracellulare con fibronectine e collagene → favoriscono interazioni con actina intracellulare e protein chinasi FAK (→ innescano reazioni nella cellula)

nel corpo, contatti più stretti tra matrice e cellule (membrana basale in cellule epiteliali)

- → struttura adesiva: emidesmosoma
  - placca densa in superficie interna membrana
    - contiene plectina (che attacca integrine transmembrana e filamenti intermedi)
      - integrine attaccate a membrana basale da particolare laminina
  - filamenti che si estendono all'interno del citoplasma (più spessi di quelli dei contatti focali: cheratina invece di actina)
    - filamenti intermedi: cheratina → sostegno
    - filamenti sottili: actina → funzioni contrattili
  - pemfigoide bolloso → malattia autoimmune: anticorpi contro proteina di emidesmosomi
    - distacco strato inferiore epidermide da membrana basale

#### **Interazione delle cellule con altre cellule**

Riconoscimento cellula-cellula → interazioni selettive

- sorting out: 2 tipi di cellule embrionali diverse vengono mischiate insieme
  - si riassociano nei due tipi differenti e continuano sviluppo
- → proteine coinvolte in adesione cellulare:
  - selectine
  - membri di famiglia Immunoglobuline (IgSF)
  - membri famiglia integrine
  - caderne



#### Selectine

"homing dei linfociti": linfociti prelevati da linfonodi periferici e reinseriti nel corpo → tornano a sito originario

- aderiscono a venule dei linfonodi → legame bloccato da anticorpi che legano glicoproteina dei linfociti: LEU-CAM1 → L-selectine

famiglia di glicoproteine integrali di membrana che riconoscono e legano una particolare disposizione degli zuccheri negli oligosaccaridi che sporgono da superficie di altre cellule

- piccolo dominio citoplasmatico
- singolo dominio transmembrana
- ampio segmento extracellulare: vari domini separati (tra cui EGF e lectina terminale → lega gruppi carboidrati specifici)

3 selectine:

- E-selectine – cellule endoteliali
- P-selectine – piastrine e cellule endoteliali
- L-selectine – leucociti (globuli bianchi)

riconoscono complesso di 4 zuccheri alle estremità delle catene di carboidrati di alcune glicoproteine complesse:

- fucosio e acido sialico + N-acetilglucosammina solforato
- legame calcio-dipendente



### Immunoglobuline ed integrine

immunoglobuline Ig → anticorpi: catene polipeptidiche composte da domini simili

- domini Ig: 70-110 aminoacidi
  - struttura altamente ripiegata
  - presenti in ampia varietà di proteine → superfamiglia delle immunoglobuline (IgSF)
    - funzione immunitaria
    - adesione cellula-cellula indipendente da ioni calcio

molecole di adesione cellulare di tipo Ig: interazioni specifiche dei linfociti con cellule necessarie per risposta immunitaria

- VCAM (vascular) NCAM (neural) e L1 mediano adesione fra cellule non immunitarie
- struttura modulare

- costituite da singoli domini
- L1:
  - dominio citoplasmatico
  - segmento transmembrana
  - diversi segmenti simili a moduli ripetuti presenti in fibronectina
  - 6 domini Ig nella parte N-terminale della molecola (spazio extracellulare)
    - interagiscono con altri domini Ig di L1 presenti su altre cellule

L1: importanza nello sviluppo neurale → mutazioni del gene L1: ritardo mentale o idrocefalia letale

- coinvolto in crescita assoni:
  - assone → cono di accrescimento "esploratore" (contengono L1)
  - cono si dirigono verso substrati contenenti L1
  - crescita del nervo bloccata da anticorpi che interagiscono con L1

Integrine

- maggior parte: favoriscono adesione cellule al substrato
- alcune: mediano adesione cellula-cellula legandosi a proteine della superfamiglia Ig della cellula vicina



### Caderine

grande famiglia di glicoproteine che mediano l'adesione cellulare calcio-dipendente e trasmettono segnali da MEC a citoplasma

- uniscono tra loro cellule dello stesso tipo
  - si legano a stessa caderina presente su superficie di cellula vicina

tipi:

- E-caderina – epiteliale
  - N-caderina – neurale
  - P-caderina – placentare
- contengono un segmento extracellulare relativamente grande (→ 5 domini ripetuti), singolo segmento transmembrana, piccolo dominio citoplasmatico

dominio citoplasmatico:

- associato a catenine (proteine citosoliche)
  - doppio ruolo: collegano caderine al citoscheletro e trasmettono informazioni a citoplasma

domini extracellulari:

- si associano lateralmente a formare dimeri

- ioni calcio: formano ponti tra domini successivi di una singola molecola → mantengono porzione extracellulare di ogni caderina in conformazione rigida, necessaria per adesione

adesione:

- interazione tra i domini terminali delle caderine di cellule opposte → adesione cellulare a cerniera
- 2 strutture alternative:
  - per interdigitazione
  - per contatto testa-testa

forza dell'adesione cellula-cellula è proporzionale al numero di molecole di caderine presenti

perdita di funzione caderine → diffusione tumori maligni

cambiano le proprietà adesive delle cellule:

- importante in sviluppo embrionale:
  - conversione di cellule da mesenchima (cellule lasse, non adesive) in epitelio (strato di cellule strettamente adese ed organizzate)
  - gastrulazione: cellule da strato superiore embrione a doccia interna → migrazione laterale come cellule mesenchimali
  - si aggregano in blocchi → epiteliali → somiti
    - comparsa di N-caderina su superficie cellule
  - porzione di parete somiti si trasforma in mesenchima migrante
    - scomparsa N-caderina

partecipano anche a formazione di giunzioni intercellulari specializzate

L'ancoraggio delle cellule con altre cellule: sinapsi, giunzioni aderenti e desmosomi

Giunzione sinaptica

tra assone e specifico gruppo di cellule

- assone può riconoscere gruppo grazie a molecole della superficie cellulare complementari → protocaderine portano il codice molecolare per le connessioni sinaptiche
  - differenti membri della famiglia si trovano su differenti neuroni
  - più di 50 geni codificanti per protocaderine
    - geni con particolare organizzazione che è adatta a generare un gran numero di polipeptidi simili

caderine

- → mediazione specificità
- → contatto adesivo che mantiene membrane pre e post-sinaptiche a giusta distanza

caderine classiche → 5 domini extracellulari – localizzate ai bordi della sinapsi (favoriscono adesione tra membrane pre e post sin.)

protocaderine → 6 domini extracellulari – al centro della sinapsi (mediano specificità delle interazioni tra le due cellule)

Giunzioni aderenti e desmosomi

giunzioni adesive specializzate calcio-dipendenti

- in epiteli e muscolo cardiaco
- epiteli: complesso giunzionale
  - superficie laterale
    - giunzione stretta (zona occludens)
    - giunzione aderente (zona adherens)
      - strette e aderenti circondano la cellula
    - desmosoma (macula adherens)
  - più profondamente
    - desmosomi

- giunzioni comunicanti (gap)
  - in particolari siti
- superficie basale
  - emidesmosomi

#### Giunzioni aderenti

- comuni negli epiteli → cinture (zonulae adherentes) tutto attorno alla cellula vicino a superficie apicale
- cellule tenute insieme da legami calcio-dipendenti fra i domini extracellulari delle caderine che fanno da ponte (30 nm tra cellule adiacenti)
  - dominio citoplasmatico: legato da  $\alpha$  e  $\beta$  catenine a proteine citoplasmatiche (compresi filamenti actina)
  - catenina P120 si lega ad un sito del dominio citoplasmatico della caderina che è adiacente al doppio strato lipidico (traduzione del segnale)
- forniscono
  - connessione fra ambiente esterno e citoscheletro
  - via di trasmissione dei segnali da esterno a citoplasma
 → come integrine dei contatti focali

#### Desmosomi (maculae adherentes)

- giunzioni adesive a forma di disco con un diametro di circa 1  $\mu\text{m}$  in diversi tessuti
  - specialmente in tessuti soggetti a stress meccanico (muscolo cardiaco, strati epiteliali cute e cervice uterina)
- contengono caderine che legano le due cellule (30 nm di spazio)
  - ma hanno domini con struttura differente → desmogleine e desmocolline
- dense placche citoplasmatiche su superficie interna membrana → ancoraggio per filamenti intermedi ripiegati ad ansa (simile a emidesmosomi)
  - filamenti intermedi: rete → continuità strutturale e resistenza alla trazione
  - legati a domini citoplasmatici caderine da altre proteine (desmoplachina, placoglobina)



#### Il ruolo dei recettori di adesione cellulare nella trasmissione dei segnali attraverso la membrana

trasmissione dei segnali transmembrana → proteine integrali di membrana trasferiscono informazioni attraverso la membrana

- molecole di adesione (integrine, immunoglobuline, selectine, caderine) potenzialmente in grado di svolgerlo
  - integrine e caderine: capacità di formare collegamenti con citoscheletro e protein chinasi
    - interazione con ligando → risposte interne (cambio di pH, concentr.  $\text{Ca}^{++}$ , fosforilazione proteine, espressione genica)
    - integrina si può legare anche a proteine extracellulari (laminina) → legame può trasmettere segnale all'interno

sommario dei tipi di interazioni della superficie cellulare

- cellula-cellula
  - caderina-caderina; Ig-Ig; Integrina-Ig; selectina-selectina
- cellula-substrato
  - contatto focale, emidesmosoma

#### **Giunzioni strette: barriera allo spazio extracellulare**

soluti non possono diffondere attraverso strato epiteliale

- membrana è impermeabile
- spazi tra le cellule inagibili → giunzioni strette (tight junctions o zonulae occludens)

giunzioni strette: presenti all'estremità apicale del complesso giunzionale che si forma tra cellule epiteliali adiacenti

- membrana affiancate non sono fuse insieme per un'ampia regione → contatto in punti intermittenti: siti di incontro proteine transmembrana
- facce interne membrane contengono filamenti interconnessi che corrono parallelamente uno rispetto all'altro e rispetto a superficie apicale
  - corrispondono alle file appaiate di proteine di membrana allineate → formano fibrille continue che circondano completamente la cellula
- barriere alla libera diffusione di acqua e soluti; aiutano anche a mantenere polarizzazione cellule epiteliali (→ bloccano diffusione proteine di membrana da zone apicali a zone baso-laterali)
  - diversa permeabilità: giunzioni con molti filamenti formano barriere più efficaci
  - alcune giunzioni permeabili a specifici ioni e soluti (tubulo renale → piccolo tratto, TAL, permeabile a  $Mg^{++}$ )

Claudine: famiglia di proteine – formano le principali componenti strutturali dei filamenti delle giunzioni strette; almeno 20 individuate + occludina (→ differenze di permeabilità: in TAL, Claudina-16)

barriera emato-encefalica: giunzioni strette presenti tra le cellule endoteliali dei capillari cerebrali → permeabile a cellule del sistema immunitario ma non a ioni e acqua

### **Giunzioni comunicanti e plasmodesmi: mediatori della comunicazione cellulare**

gap junctions: siti specializzati per la comunicazione intercellulare

- punti in cui le membrane di cellule adiacenti si avvicinano strettamente tra loro (3nm) ma non prendono diretto contatto
  - spazio fra cellule riempito da filamenti molto sottili, che sono condutture che attraversano membrane adiacenti e si aprono nel citoplasma delle due cellule

struttura: proteina integrale di membrana, connessina

- connessine raggruppate a formare connessone, che attraversa completamente membrana
  - connessone: 6 subunità di connessina organizzate intorno ad apertura centrale (annulus) – 16 Å diametro

formazione gap: connessioni di membrane di cellule adiacenti si legano mediante interazioni tra loro domini extracellulari → si allineano e formano canali completi

- connessioni si raggruppano in regioni specifiche

comunicazione tra citoplasmi – GJIC gap junc. interc. communication

- passaggio correnti ioniche o coloranti
- libera diffusione di molecole con peso fino a 1000 dalton
- relativamente non selettivi (selettivi solo a grandezza)
- chiusura di questi canali è innescata da fosforilazione delle subunità di connessina

flusso di correnti ioniche attraverso gap junctions: nel cuore, tra le cellule muscolari lisce dell'esofago e dell'intestino

mettono in contatto numerose cellule di un tessuto

- proteine regolatrici come AMP ciclico e inositol fosfato passano per gap
  - gap integrano le attività di singole cellule di un tessuto in un'unità funzionale
    - stimolo ormonale trasmesso a tutte cellule tessuto
- permettono cooperazione metabolica: cellule condividono metaboliti (ATP, zuccheri fosfato, aminoacidi, coenzimi)

Connessine (Cx): membri di famiglia multigenica

- circa 20 connessine con diversa distribuzione tessuto-specifica
  - differenze in conduttanza, permeabilità, regolazione
  - differenze di compatibilità tra connessioni diversi
    - favoriscono o prevengono comunicazione tra differenti tipi cellulari in un organo



- Cx43 muscolo cardiaco e Cx40 sistema di conduzione elettrica:  
fisicamente in contatto ma elettricamente isolate

# Cap. 8 – I sistemi delle membrane citoplasmatiche: struttura, funzione e traffico di membrana

Matteo Paolucci

citoplasma eucarioti: suddiviso in compartimenti delimitati da membrane

- organelli distinti:
  - sistema di endomembrane → reticolo endoplasmatico, complesso di Golgi, endosomi, lisosomi, vacuoli, vescicole, granuli
    - insieme interconnesso strutturalmente e funzionalmente
  - mitocondri, perossisomi, cloroplasti

## Uno sguardo d'insieme al sistema delle endomembrane

maggior parte organelli citoplasmatici membranosi: elementi di rete dinamica e integrata

- trasporto di materiali tra i distretti della cellula
- trasportatori: vescicole di trasporto
  - si formano per gemmazione di un compartimento di membrana
  - movimento nel citoplasma secondo direzioni precise (proteine motrici + binari di microtubuli citoscheletro)
  - si fondono con membrana di compartimento accettore
    - riceve carico solubile e imballaggio membranoso

2 vie principali

- via biosintetica/secretoria
  - materiali sintetizzati nel reticolo endoplasmatico (proteine), modificati (o sintetizzati – polisaccaridi complessi) nel complesso di Golgi e trasportati per il citoplasma fino a destinazioni
    - secrezione: molti prodotti scaricati fuori da cellula
  - 2 tipi di secrezione:
    - costitutiva:
      - materiali trasportati in vescicole secretorie da siti di sintesi a spazio extracellulare in maniera continua
      - contribuisce a formazione matrice extracellulare e a formazione membrana
    - regolata:
      - materiali accumulati in granuli secretori in regioni periferiche e scaricati in risposta ad uno stimolo
        - cellule endocrine e rilascio ormoni, acini pancreatici e enzimi digestivi, cellule nervose e neurotrasmettitori
  - Materiali trasportati: proteine, lipidi, polisaccaridi complessi
    - diverse classi di proteine:
      - di secrezione – scaricate dalla cellula
      - integrali – si fondono nelle membrane
      - solubili – risiedono nei compartimenti delimitati da endomembrane (enzimi lisosomiali)

## • via endocitica

- materiali si muovono da superficie esterna cellula verso i componenti cellulari (endosomi, lisosomi)

Definito quadro del traffico – necessario indirizzamento specifico dei materiali

- destinazioni predeterminate riconosciute da segnali di smistamento che sono codificati nella sequenza aminoacidica della proteina o negli oligosaccaridi collegati
  - riconosciuti da recettori nelle membrane o da rivestimenti di vescicole

Le due vie uniscono le endomembrane in una rete dinamica e interconnessa

## Alcuni approcci allo studio delle endomembrane

Indicazioni ottenute dall'autoradiografia

tecnica per seguire cicli da inizio a fine (mezzo per visualizzare processi biochimici): es – da sintesi a secrezione proteina nelle cellule acinose del pancreas



- sezioni di tessuto con isotopi radioattivi – strato di emulsione fotografica esposta a radiazioni
- per **determinare siti di sintesi**: incubazione pezzi di tessuto in soluzione contenente aminoacidi radioattivi → sito di sintesi è reticolo endoplasmatico
- per **determinare percorso intracellulare**: **pulse-chase** (pulse=breve incubazione radioattiva in cui aminoacidi marcati sono incorporati in proteina – 3 min.; chase=periodo in cui tessuto è esposto a mezzo non radioattivo, proteine sintetizzate con aminoacidi non marcati) → si segue movimento di proteine sintetizzate in pulse
  - **reticolo endoplasmatico rugoso → complesso di golgi → granuli secretori (dotti)**

#### Indicazioni ottenute dall'uso della proteina verde fluorescente

per determinare **movimenti** dinamici di specifiche proteine in **cellula vivente**

utilizzo gene isolato di medusa – codifica per piccola proteina verde fluorescente (GFP)

- DNA di GFP unito a DNA di proteina da studiare
- formazione DNA chimerico (composto)
  - esprime proteina chimerica: GFP fuso a parte terminale proteina – non influisce su movimento o funzione → si segue luce fluorescente

generalmente si utilizza virus VSV con gene fuso a GFP (VSVG)

- virus fa produrre a cellula molte proteine VSVG → prodotte in RER, veicolate al Golgi e trasportate su membrana dove vengono incorporate negli involucri virali
- sincronismo movimento: **mutanti temperatura-sensibili** → a bassa temperatura (permissiva) si muovono, a alta temperatura (restrittiva) sono bloccate su RER → si abbassa temperatura di colpo: movimento sincrono da RER a Golgi

#### Indicazioni ottenute dall'analisi biochimica delle frazioni subcellulari

per **determinare composizione biochimica** delle strutture – tecniche di frazionamento

(**omogeneizzazione**) cellulare e isolamento organelli

- cellula rotta per omogeneizzazione → membrana si **frammenta** e forma piccole **vescicole** sferiche
  - vescicole di organelli differenti hanno proprietà differenti → separazione componenti: **frazionamento cellulare** (centrifugazione a differenti velocità – precipitano tipi differenti)

vescicole formate da endomembrane formano **microsomi**

- suddivisibili in lisci e rugosi con tecniche del gradiente
  - composizione biochimica determinabile
    - es.: vescicole formate da Golgi → enzimi che aggiungono zuccheri a catene di carboidrati
    - enzima utilizzabile come antigene per preparazione **anticorpi** specifici
    - iniettati nella cellula, antigeni marcati localizzano enzima nei compartimenti

#### Indicazioni ottenute dall'uso di sistemi acellulari

**parti isolate** di una cellula mantengono un notevole grado di **attività** → sistemi acellulari (non contengono cellule intere) → **informazioni su processi complessi**

- es.: ribosomi sintetizzano proteine
  - se isolati, proteine liberate in fluido acquoso
  - se incorporati in frazione microsomiale rugosa, proteine sintetizzate sono intrappolate in vescicole membranose

scoperto ruolo di alcune proteine nel **permettere la gemmazione** di vescicole (utilizzo liposomi)

- senza determinate proteine non avviene gemmazione

#### Indicazioni ottenute dallo studio dei mutanti

mutanti → cromosomi contengono uno o più geni che codificano prodotti differenti da quelli codificati dalla maggior parte della popolazione

- determinazione precisa della natura dell'attività assente fornisce **indicazioni sulla funzione del prodotto genico normale**
- es.: lievito (eucariote) – vescicole gemmano da RER e si fondono con cisterne del Golgi
  - attraverso mutanti si riconoscono proteine coinvolte in questa porzione del percorso secretivo (codificate da geni SEC)
  - mutazione in gene che codifica per **proteina coinvolta in formazione vescicole** → vescicole non si formano → accumulo prodotti ed espansione RE
  - mutazione in gene che codifica per **proteina coinvolta in fusione vescicole** → vescicole non si fondono e si accumulano in numero eccessivo nel citoplasma → isolamento proteine

scoperta che attività dinamiche dei componenti del sistema delle endomembrane sono altamente conservate (da lievito a uomo, somiglianza – anche nelle proteine)

### Reticolo Endoplasmatico

diviso in 2 categorie:

- reticolo endoplasmatico **rugoso – RER**
    - **ribosomi** legati a superficie **citoplasmatica**
    - organello composto da estese membrane **appiattite (cisterne)**
    - continuo con membrana esterna nucleo (anch'essa con ribosomi)
  - reticolo endoplasmatico **liscio – REL**
    - **non ha ribosomi** su superficie citoplasmatica
    - membrane **tubulari** → sistema di **canali interconnessi** nel citoplasma
- sistemi di membrane che racchiudono un lume (spazio cisternale) separato da citosol → differente composizione

omogeneizzazione:

- REL → vescicole lisce
- RER → vescicole rugose

densità diverse: separabili per centrifugazione

tipi diversi di cellule hanno diverse quantità relative di RER e REL → in base a attività

- es.: secrezione proteina (pancreas, ghiandole salivari) → >RER

### Reticolo Endoplasmatico Liscio

esteso in muscoli scheletrici, tubuli renali, ghiandole endocrine che producono steroidi

diverse funzioni:

- **sintesi di ormoni steroidei** (in cellule endocrine gonadi e corteccia surrenale)
- **detossificazione** nel fegato di composti organici
  - enzimi che trasferiscono ossigeno (ossigenasi) comprendenti citocromo P450
  - enzimi senza specificità per substrato → ossidano molti composti idrofobici in idrofilici: secrezione più semplice
  - benzo[*a*]pirene convertito in cancerogeno
- **rilascio glucosio 6-fosfato** nel fegato da parte di enzima glucosio 6-fosfatasi
  - fegato: glicogeno in granuli fuori da REL
  - aumento richiesta energetica → glicogeno degradato da fosforilasi → glucosio 1-fosfato → glucosio 6-fosfato (in citoplasma)
  - zucchero fosforilato non può lasciare cellula (impermeabile a zuccheri fosfati)
    - glucosio 6-fosfatasi su membrane REL → rimuove gruppo fosfato → glucosio può entrare in circolo sanguigno
- **sequestro ioni Ca<sup>++</sup>** all'interno delle cisterne (molte proteine che legano Ca<sup>++</sup>)
  - rilascio regolato → attiva risposte cellulari: fusione vescicole secretorie in membrana plasmatica, contrazione cellule muscolari scheletriche

### Funzioni del Reticolo Endoplasmatico Rugoso

studi su cellule acinose pancreas, cellule rivestimento tubo digerente → secernenti

- cellule epiteliali → **polarizzate**

- o nucleo e esteso RER verso superficie basale (vicino a circolo sanguigno)
  - o Golgi in regione centrale
  - o superficie apicale rivolta verso dotto escretore; contiene materiale di secrezione racchiuso da membrana
- riflette **flusso di prodotti** secretori attraverso cellula (da siti sintesi a secrezione)

Sintesi di proteine sui ribosomi legati a membrane o sui ribosomi "liberi"

RER → sito di **sintesi proteine** di secrezione

proteine sintetizzate in due luoghi distinti:

- **ribosomi attaccati** a superficie citosolica membrane RER
    - o proteine secrete
    - o proteine integrali di membrana
    - o proteine solubili (all'interno dei compartimenti del sistema di endomembrane)
  - **ribosomi liberi**, non aderiscono a RER
    - o proteine destinate a rimanere nel citosol (enzimi glicolisi e proteine citoscheletro)
    - o proteine periferiche della superficie interna della membrana plasmatica (spectrine e ankirine)
    - o proteine trasportate nel nucleo
    - o proteine da incorporare nei perossisomi, cloroplasti, mitocondri
- ultimi 2 gruppi: proteine sintetizzate nel citosol e completate post-traduzionalmente nell'organello

**Sito di sintesi** di proteina è determinato da sequenza aminoacidica in porzione N-terminale (prima parte a emergere da ribosoma durante sintesi)

- proteine di secrezione: **sequenza segnale a estremità N-terminale** → innesca attacco del ribosoma a membrana RE
  - polipeptide si muove in cisterne RE attraverso un canale acquoso proteico in membrana RE → mentre viene sintetizzato: co-traduzionalmente
- ipotesi del segnale (Blobel)

Sintesi delle proteine secretorie, lisosomiali, o del vacuolo vegetale sui ribosomi legati alle membrane

**traslocazione:**

inizio sintesi polipeptide:

- mRNA si lega a ribosoma libero (tutti i ribosomi sono identici)
- polipeptide contiene successione da 6 a 15 residui aminoacidici non polari in N-terminale → indirizza polipeptide nascente a membrana RE

**sequenza segnale** inizia a emergere da ribosoma

- riconosciuta da particella di riconoscimento del segnale (**SRP**)
  - o 6 distinti polipeptidi + piccolo RNA 7S
- SRP si lega a sequenza segnale e a ribosoma
  - o arresta ulteriore sintesi del polipeptide fino a quando il complesso non viene a contatto e si attacca specificatamente a superficie citosolica **membrana RE**

legame complesso SRP-ribosoma-polipeptide nascente con RE – due interazioni:

- tra **SRP e recettore per l'SRP**
- tra **ribosoma e canale di membrana delineato da traslocone**

avvenuto il legame

- SRP rilascia sequenza nascente
- sequenza nascente inserita in canale acquoso di traslocone (in conformazione ad ansa)
  - o legame con sito interno traslocone: **cambiamento conformazionale** → canale allargato verso il lume del RE
- rilascio SRP da recettore, traduzione riparte, resto polipeptide entra nel lume del RE

dopo la fine della traduzione

- rilascio ribosoma da membrana
- canale traslocone ritorna a conformazione stretta

tappe regolate da legame o idrolisi **GTP**

- proteine G (proteine che legano GTP): regolatore (interruttore) → 2 conformazioni: attiva, legata a GTP e inattiva, legata a GDP
  - SRP e recettore per SRP contengono proteine G
    - siti di legame GTP vuoti quando SRP e recettore interagiscono tra di loro → interazione li stimola a legare GTP → interazione con GTP stimola rilascio di sequenza segnale e suo inserimento in traslocone
      - idrolisi GTP: dissociazione complesso e rilascio SRP in citosol

poro acquoso del traslocone si apre fino a 50 Å: canale più largo

- traslocone non è mai completamente aperto da un'estremità all'altra → membrana RE mantiene **permeabilità**
  - prima del contatto con ribosoma, è aperto in estremità citosolica (15 Å), ma sigillato in estremità luminale da proteina chaperon del RE
  - canale allargato da contatto con sequenza segnale, ma sigillato sul versante citosolico da ribosoma ancorato

Come una proteina neo-sintetizzata viene processata nel reticolo endoplasmatico

polipeptide nascente entra in **cisterne RE** → interazione con **enzimi**

- rimozione porzione N-terminale che contiene sequenza segnale: enzima **peptidasi del segnale**
  - aggiunta **carboidrati a proteina**: enzima **oligosaccariltrasferasi**
- enzimi → proteine integrali di membrana vicine a traslocone

lume del RE contiene **proteine chaperon** (BIP – binding protein – e calnexina), ovvero proteine che riconoscono e si legano a **proteine non ripiegate o ripiegate male** e danno loro l'opportunità di assumere la corretta struttura tridimensionale

- ruolo anche nel movimento verso il lume di proteina nascente
- nel lume anche **proteindisulfideisomerasi** → formazione e rimaneggiamento ponti disolfuro tra residui di cisteina

**controllo di qualità:**

- polipeptidi che non riescono a ripiegarsi correttamente vengono distrutti → trasportate fuori del lume (traslocazione inversa) → nel citosol, distrutte dai proteasomi

ruolo del RE:

- membrana → ampia superficie per ribosomi (anche 13 milioni a cellula) - sintesi
- lume → ripiegamento e assemblaggio proteine; segregazione di proteine di secrezione da neosintetizzate (da modificare e poi spedire a destinazione precisa)

Sintesi delle proteine integrali di membrana sui ribosomi legati alle membrane

tranne quelle dei mitocondri, anche proteine integrali di membrana sintetizzate su ribosomi associati a membrane RE

- trasferite nel RE co-traduzionalmente (durante sintesi) → stesso processo di proteine di secrezione

differenze:

- proteine **integrali** contengono uno o più **segmenti idrofobici transmembrana** che bloccano il passaggio completo della proteina verso il lume del RE → **sequenze fine di trasferimento** (15 residui aminoacidici idrofobici o senza carica; rimangono stabilmente nel doppio strato)
  - se presente singolo segmento che fa da sequenza segnale per SRP e da sequenza di fine trasferimento → sequenza ancora-segnale
- traslocazione bloccata: ribosoma si inclina in modo da permettere a porzione C-terminale di essere sintetizzata nel citosol (ipotetica proteina cancello per mantenere permeabilità)

- canale di traslocazione si apre lateralmente e espelle segmento transmembrana nel doppio strato

proteine che attraversano una sola volta membrana possono avere N-terminale verso cisterna o verso citosol

- fattore più comune che determina **allineamento** è presenza di **residui aminoacidici carichi positivamente all'estremità citosolica** di segmento transmembrana
- rivestimento interno del traslocone orienta polipeptide nascente in modo che estremità più positiva si affacci verso il citosol

proteine che attraversano più volte la membrana i segmenti transmembrana adiacenti hanno orientamento opposto – ogni ulteriore segmento transmembrana deve essere ruotato di 180°

- traslocone capace di orientare correttamente i segmenti (→ esperimenti con sistemi acellulari)

### Biosintesi delle membrane nel RE

membrane non si originano ex novo ma derivano solo da membrane preesistenti

**crescita membrane** → proteine neosintetizzate e lipidi inseriti nelle membrane del RE già esistenti

→ componenti di membrana si muovono da RE a altri compartimenti cellula

- durante movimento, composizione è modificata da enzimi nei compartimenti → membrane dei diversi compartimenti sono diverse per composizione

membrane cellulari: **asimmetriche**

- asimmetria stabilita nel RE
- mantenuta quando la membrana passa da un compartimento al successivo per gemmazione e fusione
  - componenti in superficie luminale in RE → superficie luminale di vescicole e Golgi → superficie esterna (esoplasmica) della membrana plasmatica

**Sintesi dei lipidi** di membrana

- avviene nel RE (tranne per sfingomieline e glicolipidi – sintesi inizia in RE e finisce in Golgi – e per lipidi particolari dei mitocondri – sintetizzati su membrane mitocondri)
- enzimi coinvolti nella sintesi di fosfolipidi: proteine integrali della membrana del RE
  - **sito attivo** rivolto verso **citosol**
  - alcune molecole di lipidi vengono poi trasportate nel foglietto opposto dalle flippasi (trasporto attivo attraverso doppio strato)
- lipidi trasportati da RE a Golgi a membrana plasmatica come parte del doppio strato che costituisce le pareti delle vescicole di trasporto

membrane di organelli diversi hanno **differente composizione in lipidi** → cambiamenti avvengono mentre la membrana passa attraverso la cellula

- **organelli** possiedono **enzimi che modificano lipidi** già presenti in membrana → cambiano fosfolipide in un altro tipo (fosfatidilserina → fosfatidilcolina) – agiscono su teste
- quando le **vescicole** gemmano da un compartimento, alcuni tipi di **lipidi sono preferiti** ad altri
- cellule contengono proteine in grado di scambiare fosfolipidi → **trasporto di specifici fosfolipidi** attraverso il citosol acquoso da un compartimento a un altro
  - facilitano passaggio di specifici fosfolipidi da RE a organelli

percentuale di ciascuna specie lipidica cambia gradualmente quando la membrana si sposta da RE a Golgi a membr. plasmatica

### Glicosilazione nel reticolo endoplasmatico rugoso

quasi tutte le proteine prodotte sui ribosomi legati alla membrana diventano **glicoproteine**

- gruppi carboidrati: siti di legame nelle interazioni con altre macromolecole
- sequenze di zuccheri che compongono oligosaccaridi di glicoproteine sono altamente specifiche

**Glicosiltrasferasi**: enzimi legati a membrane → aggiungono **zuccheri a catena oligosaccaridica** in crescita

- trasferimento di specifico monosaccaride da zucchero donatore a zucchero accettore
  - zucchero donatore: zucchero di un nucleotide
    - CMP-acido sialico; GDP-mannosio; UDP-N-acetilglucosamina
  - zucchero accettore: estremità in crescita catena oligosaccaridica
- sequenza di incorporazione zuccheri → sequenza di glicosiltrasferasi → disposizione di enzimi su varie membrane del percorso secretorio

Aggiunta zuccheri a oligosaccaridi legati alle proteine con azoto (legati a asparagina di impalcatura peptidica):


- segmento di base su ciascuna catena di carboidrati è montato indipendentemente dalla proteina su un **trasportatore lipidico (dolicol fosfato** – molecola idrofoba nel doppio strato – più di 20 unità di isoprene) → successivo trasferimento in blocco a specifici residui di asparagina del polipeptide
- zuccheri aggiunti a dolicol fosfato uno alla volta da glicosiltrasferasi di membrana – **processo di N-glicosilazione**:
  - (mammiferi) trasferimento di N-acetilglucosamina 1-fosfato
  - trasferimento di altra N-acetilglucosamina
  - trasferimento di 5 unità di mannosio
  - dolicolo ruota attraverso membrana
  - trasferimento di 4 unità di mannosio nel lato lumenale (legati nel citosol a altro dolicolo uno alla volta, poi dolicolo ruota all'interno) → cede zucchero a catena
  - trasferimento 3 unità di glucosio nel lato lumenale (legati nel citosol a altro dolicolo uno alla volta, poi dolicolo ruota all'interno) → cede zucchero a catena→ **blocco di 14 zuccheri** → enzima **oligosaccariltrasferasi** lo trasferisce dal trasportatore di lipidi **al polipeptide** nascente mentre polipeptide è traslocato nel lume del RE

organismi più complessi: diversificazione dei gruppi carboidrati uniti alle proteine

- RE: rimozione dei residui terminali di glucosio da parte delle **glicosidasi**
- glicoproteine con un **singolo glucosio** residuo si legano a proteine **chaperon** (calnexina, calreticulina)
- glucosio rimosso enzimaticamente
- glicoproteina viene rilasciata

→ se a questo stadio glicoproteina non ha ancora completato ripiegamento o se non è piegata correttamente, è riconosciuta da **enzima di monitoraggio (GT)** – controllo di qualità:

- GT aggiunge singolo residuo di glucosio ad uno dei residui mannosio su estremità oligosaccaride
  - GT riconosce proteine non completamente ripiegate o mal ripiegate → mostrano residui aminoacidici idrofobici
- glicoproteina targata è riconosciuta da chaperon → nuova possibilità di ripiegarsi
- glucosio rimosso e nuovo controllo di GT
- o si ripete processo (nuova aggiunta glucosio → altra possibilità di trovare ripiegamento giusto) o proteina è trasferita nel citosol e distrutta nei proteasomi

 Dal RE al complesso di Golgi: la prima tappa del trasporto vescicolare  
cisterne del RER interconnesse → movimento proteina da sito sintesi a siti verso regione centrale cellula

- facce delle cisterne RER verso regione centrale: lisce → **elementi di transizione** (no ribosomi)



- o siti di uscita per gemmazione di vescicole
- o dopo gemmazione vescicole si fondono tra loro a formare vescicole più grandi e tubuli interconnessi → formazione VTC in regione ERGIC (endoplasmic reticulum Golgi intermediate compartment)
- o VTC (membrane vescicolo-tubulari) si muovono lungo binari composti da microtubuli

## Il complesso di Golgi

cisterne appiattite a forma di disco con bordi dilatati, associate a vescicole e tubuli

- cisterne disposte in pile ordinate
  - o una pila contiene meno di 8 cisterne
- singole pile interconnesse a formare complessi simili a nastri
- vescicole gemmano da dominio tubulare periferico di ciascuna cisterna
  - o vescicole comprendono un rivestimento proteico distinto

diviso in diversi compartimenti per funzionalità, disposti secondo un asse che va dalla faccia cis o di entrata (più vicina a RE) a faccia trans o di uscita

- faccia più cis – composta da rete di tubuli interconnessi: rete cis del Golgi (CGN)
  - o stazione di smistamento – distingue proteine da rimandare indietro da proteine che possono proseguire nel Golgi
- massa del complesso – larghe cisterne appiattite: divise in cis, mediali e trans
- faccia più trans – rete distinta di tubuli e vescicole: rete trans del Golgi (TGN)
  - o stazione di smistamento – proteine segregate in differenti tipi di vescicole (o verso membrana plasmatica o verso siti intracellulari)

singola cisterna → due domini distinti: dominio concavo centrale e uno periferico irregolare (rete tubulare → gemmazione)

complesso non è uniforme nella composizione da un'estremità all'altra

- → impianto di lavorazione:
  - o proteine neosintetizzate arrivano da RE, entrano in cis e proseguono verso trans
    - modificate: sequenze tagliate, aminoacidi modificati (idrossilazione di lisina e prolina nel collagene), carboidrati modificati



### La glicosilazione nel complesso di Golgi

ruolo chiave nell'assemblaggio dei carboidrati di glicolipidi e glicoproteine

glicoproteine escono da RE dopo rimozione dei residui di glucosio terminali

- rimozione dei residui di mannosio durante passaggio per cisterne cis ( $\alpha$ -mannosidasi I) e mediali ( $\alpha$ -mannosidasi II)
- aggiunta di altri zuccheri in sequenza da varie glicosiltrasferasi → varietà di oligosaccaridi differenti
  - o sequenza di incorporazione zuccheri è determinata da disposizione spaziale di specifiche glicosiltrasferasi (sialiltrasferasi aggiunge acido sialico alla fine delle catene nelle cellule animali)

Oligosaccaridi legati alle proteine

- da legami con azoto → sintesi inizia in RE
- da legami con ossigeno → assemblati completamente in complesso di Golgi

Sito di sintesi della maggior parte dei polisaccaridi complessi della cellula, compresi i

glicosaminoglicani (matrice extracellulare) e pectine ed emicellulosa (pareti cellulari piante)



### Movimento di materiali attraverso il complesso di Golgi

varie ipotesi

- anni '80: modello della maturazione delle cisterne
  - o cisterne: strutture transitorie; si muovono da cis a trans maturando
- anni '90: modello del trasporto vescicolare
  - o cisterne rimangono al loro posto: compartimenti stabili tenuti insieme da impalcatura proteica

- vescicole gemmano da un compartimento e fondono nel successivo (direzione: da cis a trans)
- osservazioni:
  - ogni cisterna ha popolazione diversa di enzimi
  - foto microscopio elettronico: numerose vescicole gemmano da margini delle cisterne
- ultimi anni: ritorno a modello maturazione cisterne
  - alcuni materiali attraversano complesso di Golgi rimanendo all'interno delle cisterne → non compaiono mai nelle vescicole (procollagene)
  - evidenziato che vescicole non si muovono solo in senso anterogrado, ma anche in senso **retrogrado** (trans → cis)
  - ruolo per vescicole di trasporto → spostano in senso retrogrado gli **enzimi** (spiega differenze di popolazione – es.: mannosidasi in cis e mediale)
- nuovo modello: **modello combinato**
  - parte del carico è trasportata da vescicole in senso anterogrado veloce
  - cisterne cis maturano in cisterne trans
  - vescicole: trasporto retrogrado enzimi

### Tipi di vescicole di trasporto e loro funzioni

trasporto tra i vari compartimenti della via biosintetica

varia grandezza, ma tutte gemmano da membrana donatrice e si fondono in membrana accettrice

- maggior parte di gemme sono coperte da **rivestimento proteico** su **superficie citosolica** (strato elettrondenso)
  - proteine solubili che si accumulano sul lato citosolico della membrana donatrice nei punti dove avviene gemmazione → distacco di vescicole rivestite

#### **rivestimenti proteici**

- dispositivo meccanico che induce la membrana a **curvarsi** e a formare vescicola in gemmazione
- meccanismo per **selezione componenti** che devono essere trasportati nella vescicola
  - componenti selezionati:
    - **carico** da trasportare
    - macchinario richiesto per **indirizzare** e far **attraccare** vescicola a membrana ricevente
  - selezione operata in base a affinità specifica per le code citosoliche delle proteine integrali nella membrana donatrice

diverse categorie di vescicole rivestite:

- vescicole rivestite da **COPII**
  - spostano materiali da RE a ERGIC a Golgi – in avanti [cop=coat proteins]
- vescicole rivestite da **COPI**
  - spostamento retrogrado da Golgi a RE
- vescicole rivestite da **clatrina**
  - spostamento da TGN verso gli endosomi, i lisosomi e i vacuoli (piante)
  - spostamento da membrana plasmatici a compartimenti citoplasmatici (via endocita)



#### Le vescicole rivestite da COPII: trasporto del carico dal RE al complesso di Golgi

prima tappa percorso biosintetico: RE → ERGIC → CGN

struttura: 5 subunità proteiche

- identificate in mutanti lievito
- anticorpi anti-COPII bloccano gemmazione ma non movimento di carichi in altre zone

funzione:

- **selezione** e **concentramento** di determinati componenti

- proteine integrali di membrana del RE → interagiscono specificatamente con COPII
  - **enzimi** che agiscono in fasi successive (glicosiltrasferasi)
  - proteine addette ad **aggancio** e fusione di vescicola a compartimento bersaglio
  - proteine che **legano carico** solubile (che possono essere proteine di secrezione)
    - ERGIC-53 (si lega a mannosio su proteine lisosomiali e di secr.)
    - proteine in lume RE si legano a estremità luminale di questi recettori

interazione tra proteine di membrana e COPII → mediata da **sequenze segnale** nelle code citosoliche delle proteine di membrana

- carichi non selezionati – stessa concentrazione in vescicole e lume RE → vengono racchiuse in vescicole in seguito a movimento per **flusso di massa** (rimangono intrappolati in vescicole)
- alcune proteine del RE – BiP – sono escluse da vescicole rivestite

Tra le proteine di rivestimento di COPII: **Sar** – si lega a GTP

- ruolo regolatore (**assemblaggio/disassemblaggio rivestimento vescicola**)
  - conformazione attiva: Sar-GTP si lega a membrana RE
    - reclutamento di altre proteine del rivestimento di COPII in quel sito – formazione gemma rivestita
  - idrolisi GTP → Sar-GDP – minore affinità per membrana vescicola
    - disassemblaggio di rivestimento proteico (liberato in citosol)
      - vescicola può fondersi con membrana bersaglio

**Le vescicole rivestite da COPI: trasporto retrogrado delle proteine indietro verso il RE**

identificate tramite esperimenti con utilizzo di analoghi del GTP non idrolizzabili

- accumulazione vescicole COPI all'interno della cellula (non si possono fondere)
  - rivestimento contiene proteina che si lega a GTP (ARF1) → idrolisi GTP: disassemblaggio
- non è certo se sono coinvolte nel trasporto anterogrado e/o retrogrado tra le cisterne di Golgi
- mediano il **trasporto retrogrado** da Golgi e ERGIC a RE

**Ritenzione e recupero delle proteine residenti nel RE**

compartimenti mantengono composizione – 2 meccanismi:

- **ritenzione** delle molecole residenti che sono escluse dalle vescicole di trasporto
  - ipotesi: proteine da trattenere fanno parte di complessi troppo grandi per vescicola
  - ipotesi: microeterogeneità membrane – possiedono domini differenti → proteine che vengono trasportate risiedono in particolare dominio di membrana RE catturato da proteine di COPII
- **recupero** delle molecole sfuggite che vengono riportate di nuovo nel comparto in cui risiedono normalmente
  - proteine del ER (sia quelle del lume che della membrana) contengono corte sequenze di aminoacidi in estremità C-terminale → **segnali di recupero** recettori specifici catturano molecole e le restituiscono al RE in vescicole rivestite di COPI:
    - proteine del lume (proteindisolfuroisomerasi e chaperon): lys-asp-glu-leu (**KDEL**) [catene idrofiliche → proteine solubili]
      - riconosciute e legate da dominio interno proteina integrale di membrana – recettore per KDEL → code citosoliche si legano a COPI → restituzione a RE

- proteine integrali di membrana del RE (come recettore SRP) hanno inoltre segnale di recupero in C-terminale (KXXX – lisina + qualsiasi aminoacido) → si lega direttamente a COPI
- recupero: in Golgi – KDEL si legano a recettori KDEL, che hanno sequenza KXXX → legame a COPI → recupero
- ogni compartimento ha proprio segnale di recupero unico → composizione particolare

#### Le vescicole rivestite da clatrina: smistamento delle proteine lisosomali a TGN

cellula deve distinguere tra proteine che produce → diverse destinazioni

- **smistamento:** in TGN
  - luogo assemblaggio vescicole rivestite da clatrina
    - smistamento carico
    - trasporto proteine a endosomi, **lisosomi**, vacuoli (piante)
  - struttura:
    - **gabbia** esterna a nido d'ape composta da proteina clatrina → impalcatura strutturale
    - **guscio interno** composto da complessi proteici detti adattatori → coprono superficie vescicola che si affaccia su citosol
  - formazione:
    - reclutamento degli adattatori alla superficie citosolica TGN
      - richiede presenza **ARF1** che lega GTP (stessa proteina che controlla formazione del rivestimento di COPI)
    - assemblaggio gabbia di clatrina → gemmazione membrana

**adattatori (AP1):** connessione tra due tipi diversi di componenti

- superficie esterna (citosolica) → **legame con clatrina:** mantenimento impalcatura
- superficie interna → legame con **segnali di smistamento** nelle code citosoliche delle proteine integrali di membrana
  - alcune proteine integrali di membrana selezionate fungono da **recettori** che legano molecole specifiche nel lume

dopo gemmazione, rivestimento di clatrina si perde e vescicole senza rivestimento procedono verso destinazione

trasportano enzimi lisosomali e proteine di membrana del lisosoma

#### Smistamento di proteine lisosomali

proteine sintetizzate su ribosomi legati a RER e trasportati a cis Golgi insieme ad altre proteine

- nel Golgi, riconosciute da enzimi – aggiungono gruppo fosfato a certi mannosio delle catene di carboidrati legati all'azoto
  - due tappe (aggiunta NAG-P; rimozione NAG)
  - **enzimi lisosomali** riconoscibili da **mannosio-6-fosfato** → catturati da **recettori** per il mannosio 6 fosfato (**MPR**) – proteine integrali di membrana che si concentrano nelle fossette ricoperte di clatrina del TGN
    - MPR: siti di legame diversi ai due lati della membrana del TGN
      - nel lume, **legame con enzima** lisosomale
      - nel citosol, **legame con complesso adattatore-clatrina** assemblato su superficie citosolica di membrana TGN
        - enzimi lisosomali inclusi in vescicole con clatrina → da indirizzare a lisosomi
    - MPR si separa da enzimi prima di formazione lisosomi
    - MPR presenti anche su membrana plasmatica: cattura enzimi lisosomali secreti in spazio extracellulare

TGN invia vescicole e granuli contenenti anche proteine di membrana dirette a membrana plasmatici e materiali secretori destinati a uscire da cellula

- TGN si frammenta in vescicole e tubuli → combacia con modello di maturazione delle cisterne
  - vescicole non rivestite – possono contenere solo materiale da espellere o diretto a membrana plasmatica → tutto il resto è selettivamente rimosso
    - prodotto di secrezione forma aggregati – intrappolati in granuli che gemmano da orli trans Golgi

#### Indirizzamento delle vescicole verso un particolare compartimento

fusione vescicola: interazione tra differenti membrane → **fusione selettiva**, vescicole si possono fondere solo con determinate membrane → **flusso altamente direzionale**

- vescicola contiene specifiche proteine associate a membrana
  - determinano destinazione e fusione

tappe tra gemmazione e fusione:

- movimento della vescicola verso lo specifico compartimento bersaglio
  - distanze a volte considerevoli → movimenti diretti da **microtubuli**
- ormeggio delle vescicole al compartimento bersaglio
  - avviene per mezzo di **proteine fibrose allungate**
  - legame è fase iniziale processo di fusione – specificità tra vescicola e bersaglio
    - data da proteine **Rab** (legate a **GTP**)
      - reclutano proteine citosoliche di ormeggio alla superficie della membrana + funzioni regolatrici
- attracco delle vescicole al compartimento bersaglio
  - le 2 membrane si affiancano strettamente giustapposte → interazione tra domini citosolici di alcune loro proteine di membrana (SNARE)
    - **v-SNARE**: incorporate nelle membrane delle vescicole durante gemmazione
    - **t-SNARE**: nelle membrane dei compartimenti bersaglio

SNARE di aggancio vescicole sinaptiche con membrana presinaptica:

- v-SNARE: sinaptobrevina
- 2 t-SNARE: syntaxina e SNAP-25
- quando si avvicinano, t- e v-SNARE interagiscono tra loro → formazione **fasci elicoidali a 4 filamenti** (ogni fascio: 2  $\alpha$ -eliche da SNAP-25 e una  $\alpha$ -elica da sinaptobrevina e syntaxina)
- $\alpha$ -eliche parallele formano fascio che tira i 2 doppi strati lipidici
- queste specifiche SNARE sono bersaglio di tossine del tetano e del botulismo → impediscono rilascio neurotrasmettitori
- fusione tra la vescicola e la membrana bersaglio
  - si fondono uno con l'altra (in laboratorio dimostrato che non si riescono a fondere con se stesse) → v- e t-SNARE contribuiscono a riconoscimento
  - v- e t-SNARE: interazione necessaria per fusione, ma non sufficiente a determinare fusione all'interno della cellula → necessarie altre proteine
  - dopo fusione, SNARE su membrane separate ora si trovano su stessa membrana
  - proteina citosolica – **NSF** – spezza complesso SNARE a 4 filamenti
  - interazioni tra SNARE sono meno specifiche di quello che ci si aspettava – abilità di una particolare vescicola di fondersi con la membrana bersaglio è determinata da combinazione di fattori: proteine ormeggio, Rab, SNARE ecc.

#### Esocitosi

vescicola si fonde su membrana plasmatici: contenuto dei granuli rilasciato in spazio extracellulare

- processo innescato da aumento locale di **ioni Ca<sup>++</sup>**
- es.: rilascio neurotrasmettitore: impulso nervoso → aumento afflusso Ca<sup>++</sup>
  - sinaptotagmina lega il calcio e media fusione

- contatto tra membrane – formazione poro di fusione circondato da proteine → si dilata
- dopo fusione, superficie luminare membrana diventa parte della superficie esterna della membrana plasmatica

## I lisosomi

organelli digestivi di cellula animale

- circa 50 **enzimi idrolitici** (fosfatasi → esteri fosforici; nucleasi → RNA, DNA; proteasi → proteine, collagene; idrolisi GAG → dermatan, cheratan e eparan solfati; polisaccaridasi e oligosaccaridasi; idrolisi sfingolipidi → ceramide; idrolisi lipidi → triacilgliceroli, fosfolipidi)
  - prodotti nel RER
  - idrolizzano ogni tipo di macromolecola biologica in prodotti a basso peso molecolare
  - attività ottimale a pH acido → **idrolasi acide**
    - pH lisosoma=4,6 → pompa protonica H<sup>+</sup>-ATPasi
- membrana: varietà di proteine acide altamente glicosilate che proteggono membrana da attacchi di enzimi interni
- dimensioni variabili, forme irregolari

ruolo più studiato: **degradazione sostanze** portate nella cellula dall'ambiente esterno

- unicellulari: sostanze nutritive da lisosomi a citosol
- mammiferi: cellule fagocitare (macrofagi, neutrofilii) → depuratori: ingeriscono detriti o microrganismi potenzialmente dannosi (già inattivati da basso pH nel lisosoma)

altre attività

- durante fecondazione, enzimi lisosomali sono attivati al di fuori della cellula → testa spermatozoo: **acrosoma**
  - membrana si fonde con quella di cellula uovo → enzimi liberati aprono strada attraverso involucro uovo: foro per passaggio spermatozoo
- **turnover organelli**: distruzione e sostituzione → **autofagia**
  - organello viene circondato da doppia membrana fornita da cisterna del RE
  - membrana RE si fonde con lisosoma → autofagolisosoma
  - digestione: dell'organello rimane corpo residuo – eliminato per esocitosi o trattenuto nel citoplasma come granulo di lipofuscina (accumulo nell'invecchiamento)
  - mitocondri in cellule fegato: autofagia ogni 10 minuti
  - cellula senza nutrimento – aumento autofagia (risorsa energetica)

## I vacuoli delle cellule vegetali

90% volume di cellula vegetale – ripieno di liquido – circondato da una sola membrana

**immagazzina** temporaneamente soluti cellulari e macromolecole

può contenere **composti tossici**

- armi chimiche
- sottoprodotto di reazioni metaboliche

strumento di escrezione di cellule vegetali

membrana del vacuolo: **tonoplasto** – pompa ioni all'interno (concentrazione molto maggiore)

- acqua entra nel vacuolo per osmosi (molti soluti all'interno) → pressione idrostatica: turgore
  - supporto meccanico per tessuti molli e distensione parete durante crescita

siti di digestione **simili a lisosomi** (non presenti nelle piante) – somiglianze:

- idrolisi acide
- pH basso per mezzo di H<sup>+</sup>-ATPasi tipo V
- punto di arrivo processo biosintetico
- proteine sintetizzate su ribosomi RER

**L'assunzione da parte della cellula di particelle e macromolecole**

cellule possono assumere materiali troppo grandi per oltrepassare membrana → **meccanismi di inclusione** dall'ambiente extracellulare all'interno di vescicole (invaginazioni di membrana)

- **fagocitosi** – assunzione di **materiale corpuscolato**
- **endocitosi** – assunzione di materiale **liquido, soluti** e **macromolecole** in sospensione

### Fagocitosi

organismi eterotrofi unicellulari → intrappolano cibo e organismi più piccoli [**nutrimento**]

- pieghe di membrana si fondono per formare un vacuolo (**fagosoma**)
- vacuolo si distacca da membrana
- fagosoma si fonde con lisosoma e materiale è digerito all'interno del risultante **fagolisosoma**

organismi superiori: meccanismo di **protezione**

- → fagociti professionali negli organismi: **macrofagi e neutrofilii**
  - fagocitano organismi estranei, cellule danneggiate, globuli rossi invecchiati e detriti
  - materiali riconosciuti e legati da recettori sulla superficie del fagocita
- mammiferi: **opsonine** (fattori nel sangue) – ricoprono particella da digerire
- nel fagocita: microrganismi uccisi da enzimi lisosomali o da radicali liberi dell'ossigeno

**inglobamento** particelle:

- formazione pseudopodi
- intrappolamento
- ingolfamento
- particelle in vacuolo di digestione
- assorbimento nutrienti

inglobamento di materiale particolato è mediato da attività contrattile di microfilamenti contenenti actina sotto la membrana

fasi **digestione**:

- fagocitosi
- formazione fagosoma
- formazione fagolisosoma (lisosoma con enzimi provenienti da Golgi)
- digestione
- formazione corpo residuo
  - allontanato da cellula
  - trattenuto come granulo di lipofusina

alcuni batteri resistono a distruzione

- mycobacterium tuberculosis – fagosoma non si fonde con lisosoma
- coxiella burnetii (febbre Q) – enzimi lisosomali non lo distruggono
- listeria monocytogenes – meningite – fosfolipasi distrugge membrana lisosomale

### Endocitosi

- **endocitosi generalizzata** – assunzione non specifica di fluidi extracellulari
  - in molti tipi di cellule in maniera continua
  - funzione primaria: **recupero membrana** plasmatica in membrane citoplasmatiche
    - → cellule coinvolte in secrezione (molte vescicole si fondono su membrana)
- **endocitosi mediata da recettori (RME)** – assunzione di specifiche molecole extracellulari (**ligandi**) dopo che si sono legate a recettori su faccia esterna membrana
  - rapido movimento verso interno
  - non c'è riduzione della superficie della cellula – no necessità sintesi nuova membrana
    - continuo riciclaggio avanti-indietro

Il percorso endocitico

ben definito – inizia con rete dinamica di tubuli e vescicole → **endosomi**

- fluido interno a endosomi: **acidificato** da H<sup>+</sup>-ATPasi su membrana
- endosomi:
  - **precoci** – vicino a regioni periferiche della cellula (selezione sostanze)
  - **tardivi** – in parte più interna cellula (vicino a nucleo); più grandi e a forma di vescicole

distinguibili per densità, pH, contenuto enzimatico

sostanze assunte → vescicole endocitiche → endosomi precoci (assortimento)

- **proteine integrali** di membrane vescicole si distaccano da recettori interni a endosoma (infatti erano all'esterno della cellula) per ambiente acido; vengono concentrate in compartimenti tubulari (centri di riciclaggio) → gemmazione vescicole: riportano proteine su membrana plasmatica (dove possono svolgere il ruolo di recettori)
- **materiali dissolti e ligandi** rilasciati da recettori si concentrano in compartimento sferico → spediti a endosomi tardivi attraverso vescicole endosomali di trasporto specializzate (ECV), oppure endosomi precoci maturano in tardivi
  - molecole che raggiungono e. tardivo sono dirette a lisosoma
    - maturazione e. tardivi in lisosomi
    - fusione di e. tardivi con lisosomi preesistenti
    - trasporto vescicolare (e. tardivo e lisosoma in posizioni fissate)
  - e. tardivi ricevono materiale da e. precoci e enzimi lisosomali (sintetizzati in RER) da TGN (i recettori, come MPR recettore del mannosio 6-fosfato, che trasportano enzimi tornano indietro a TGN)

#### Endocitosi mediata da recettori e ruolo delle fossette rivestite

RME – mezzo per assunzione selettiva ed efficiente di macromolecole presenti a concentrazioni relativamente basse in fluido extracellulare

- ormoni, fattori di crescita, enzimi, proteine plasmatiche
- si legano a **recettori** in aree specializzate della membrana (**fossette rivestite**)
  - superfici incavate della membrana
  - membrana ricoperta nel lato citoplasmatico da strato materiale setoloso: **clatrina** (stessa di vescicole ricoperte nel TGN)
    - rete di poligoni (nidi d'ape) dovuta a struttura clatrina
  - fossetta si invagina nel citoplasma per formare vescicola rivestita che si separa da membrana plasmatica

Clatrina: 3 catene pesanti e 3 catene leggere → struttura a 3 gambe: **trischelio** (catene si sovrappongono in parte centrale del trischelio)

- modulo molto adattabile → tipi differenti di reticoli poligonali
  - lati dei poligoni: gambe di trischeli sovrapposte
- invaginazione → reticolo si curva
  - curvatura facilitata da conversione di esagoni in pentagoni (trischeli permettono riarrangiamento strutturale)

formazione di vescicole endocitiche ricoperte da clatrina richiede **dinamina** (lega GTP)

- si autoassembla in un collare elicoidale intorno al collo della fossetta rivestita invaginata → divisione di vescicola da membrana
- 2 modelli di funzionamento per divisione
  - **idrolisi GTP** – cambiamento conformazione nell'elica della dinamina; dinamina come proteina strutturale in grado di generare forze meccaniche (se c'è analogo del GTP che non idrolizza, polimerizzazione dinamina continua attorcigliandosi diverse volte)
  - interruttore dell'attività di **proteina effettrice** separata che divide cellule

vescicole rivestite che si formano durante endocitosi contengono strato di **complessi adattatori** posti tra reticolo di clatrina e superficie della vescicola rivolta verso citosol



- estremità N di ogni catena pesante clatrina: **uncino** verso superficie membrana → aggancio adattatore
- adattatori: 4 differenti unità polipeptidiche (uncini e adattatori ai vertici dei poliedri)
- adattatori impegnano code dei recettori di membrana rivolte verso citosol
  - recettori e ligandi racchiusi nelle vescicole ricoperte (non vengono lasciati su membrana plasmatica)
  - interazione mediata da segnali di internalizzazione sulla coda citoplasmatica di proteine di membrana
  - AP2 – polipeptidi differenti ma in relazione con quelli di AP1 in TGN
  - AP3 funzionano in percorso endosomale-lisosomale

entro un minuto da formazione, vescicola perde rivestimento di clatrina – si fonde con endosoma precoce

- pH basso dell'endosoma → modifica stato ionizzato delle molecole di recettore – distacco ligandi – recettori rinviiati a membrana plasmatica

Molecole di **LDL e metabolismo del colesterolo**

esempio di endocitosi mediata da recettori

colesterolo – componente membrane plasmatiche, precursore ormoni steroidi

- molecola idrofobia trasportata nel sangue come parte di enormi complessi lipoproteici come LDL (low-density liprotein)
  - **LDL**: parte centrale con 1500 molecole di **colesterolo esterificate** da acidi grassi a lunga catena; circondata da singolo **strato fosfolipidico**, colesterolo non esterificato, singola copia di **apolipoproteina B-100** che si lega a recettori LDL su superficie cellula
  - **recettori** presenti su membrane concentrati in **fossette rivestite**
  - una volta che LDL è legato a recettori → invaginazione e formazione vescicola rivestita; rivestimento clatrina si disassembla, recettori riciclati di nuovo su membrana plasmatica
    - LDL portate a lisosomi → componente proteica è degradata e colesterolo è rilasciato per essere usato dalla cellula
- numero di LDL varia a seconda delle necessità metaboliche della cellula
- livello di LDL nel sangue correlato a **aterosclerosi** (restringimento delle arterie maggiori)
  - occlusione dovuta a formazione placche che contengono LDL nella parete interna dei vasi
  - formazione **placca**: offese a cellule endoteliali che circondano il vaso → endotelio attrae leucociti e **macrofagi** → macrofagi ingeriscono LDL ossidato da radicali liberi dell'ossigeno – LDL depositato in citoplasma macrofagi come gocce di grasso ricche di colesterolo (macrofagi schiumosi) → macrofagi stimolano produzione cellule muscolari lisce → producono matrice di connettivo densa (**cappuccio fibroso**) che sporge nel lume dell'arteria
    - riduzione flusso sanguigno
    - punti di formazione coaguli – flusso può essere completamente bloccato → infarto miocardio
  - abbassamento di LDL nel sangue: **statine**, bloccano enzima chiave nella sintesi del colesterolo (HMG CoA riduttasi)
- anche **HDL** trasporta colesterolo, ma contengono apolipoproteina A-I
  - LDL portano colesterolo da fegato (sintesi) a cellule organismo attraverso sangue
  - HDL: direzione opposta

- eccesso di colesterolo → da membrana plasmatica (recettori) direttamente a HDL circolanti (verso il fegato) → alti livelli di HDL nel sangue abbassano il rischio di malattie cardiache
  - ma HDL di piccole dimensioni aumento rischio di malattie coronarie; inoltre enzima CETP trasferisce colesterolo da HDL a LDL (vaccino contro CEPT – maggiori livelli HDL)

### Assunzione post-traduzionale di proteine da parte di perossisomi, mitocondri e cloroplasti

traffico proteine intracellulare:

- **segnali** di smistamento (sequenze peptidiche, gruppi mannosio fosfato)
- **recettori** che riconoscono segnali

proteine importate in nucleo, perossisomi, mitocondri e cloroplasti contengono sequenze aminoacidiche che servono da indirizzi – **proteine importate post-traduzionalmente** (dopo sintesi completa nel citosol)

**Assunzione delle proteine da parte dei perossisomi**

**2 subcompartimenti** in cui proteina può essere disposta

- membrana di contorno
- matrice interna

proteine possiedono segnale di indirizzo perossisomiale (**PTS**)

- PTS per matrice
- mPTS per membrana

recettori si legano a proteine nel citosol e poi le trasportano alla membrana perossisomiale importano proteine perossisomiali della matrice nella loro **conformazione ripiegata nativa**

**Assunzione delle proteine da parte dei mitocondri**

**4 subcompartimenti**

- membrana mitocondriale esterna (**OMM**)
- membrana mitocondriale interna (**IMM**)
- spazio intermembrane
- matrice

maggior parte delle proteine dell'organello è codificata dal genoma nucleare, sintetizzata nel citosol ed importata post-traduzionalmente

segnale di indirizzo (**presequenza**) – segmento in N terminale (residui carichi positivamente) rimosso dopo importazione da proteasi **mitocondriale**

Pre-proteina presentata al mitocondrio in stato relativamente disteso

- coinvolgimento di **proteine chaperon** in **dispiegamento** e **indirizzamento**

OMM: complesso di importazione delle proteine – **complesso TOM**

- include recettore che lega pre-proteine mitocondriali ed un canale delimitato da proteine → proteine da membrana esterna a interna (maggior parte sono destinate a matrice mitocondriale → attraversamento membrana mitocondriale interna)
- pre-proteina è traslocata da citosol a matrice mitocondriale nei siti in cui le membrane mitocondriali interna ed esterna si trovano in prossimità
- IMM contiene **complesso TIM** (recettore pre-proteine + canale per trasporto attraverso membrana)
  - movimento nella matrice è alimentato da **potenziale elettrico** tra i due lati della IMM (agisce su segnale carico positivamente)
- una volta entrato nella matrice, polipeptide interagisce con chaperon mitocondriali (mHsp70) che mediano entrata nello scompartimento acquoso
  - 2 modelli per azione chaperon
    - **motori generazioni di forza**: energia derivata da idrolisi **ATP** → polipeptide tirato attraverso segnale di traslocazione
    - aiutano diffusione del polipeptide attraverso membrana

- processo casuale (molecola si muove in qualsiasi direzione possibile)
- proteina si affaccia nella matrice → chaperon su superficie interna della membrana lega polipeptide: blocca diffusione all'indietro, ma non quella in avanti
- **meccanismo a diffusione controllata** (chaperon = **valvola Browniana** – valvola: movimento in una sola direzione)



#### Assunzione delle proteine da parte dei cloroplasti

##### **6 subcompartimenti**

- involucro esterno e interno di membrana
- spazio tra membrane
- stroma
- membrana tilacoidi
- lume

meccanismi simili a quelli dei mitocondri

- maggioranza proteine importata dal citosol
- membrane dell'involucro esterno ed interno contengono distinti complessi di traslocazione (**Tic e Toc**)
- **chaperon** contribuiscono a dispiegamento dei polipeptidi nel citosol e al ripiegamento nel cloroplasto
- pre-proteine hanno sequenza N-terminale removibile (**peptide di transito**)

peptide di transito

- indirizza polipeptide a cloroplasto e più precisamente a uno dei vari subcompartimenti

tutte le proteine che migrano attraverso l'involucro del cloroplasto contengono **dominio di indirizzo stromatico** (nel peptide di transito) → entrata in stroma

- rimozione dominio stromatico

polipeptidi in membrana o lume tilacoide

- segmento supplementare in peptide transito: **dominio di trasferimento in tilacoide**

# Cap. 9 – Il citoscheletro e la motilità cellulare

Matteo Paolucci

cellule eucarioti → citoscheletro

- 3 strutture filamentose
    - microtubuli → tubi rigidi formati da subunità di tubulina
    - microfilamenti → strutture piene formati da subunità di actina
    - filamenti intermedi → fibre a forma di corda, formate da diverse proteine
- strutture altamente dinamiche capaci di riorganizzarsi totalmente e rapidamente

## Uno sguardo d'insieme alle funzioni più importanti del citoscheletro

1 – struttura e supporto; 2 – trasporto intracellulare; 3- contrattilità e motilità; 4 – organizzazione spaziale

- impalcatura dinamica
  - supporto strutturale → forma alla cellula e resistenza a forze; flessibilità
- reticolo interno che determina la posizione degli organelli all'interno della cellula
  - es.: epitelio → polarizzati
- rete di percorsi che dirigono i movimenti di materiali e organelli nella cellula
  - fornitura di mRNA a parti specifiche
  - movimento di trasportatori membranosi (RE → Golgi)
  - trasporto vescicole con neurotrasmettitore lungo assone
- microtubuli → binari
- apparato generatore di forza che produce lo spostamento delle cellule
  - organelli specializzati per il moto sporgenti da superficie
  - estremità in accrescimento (assone)
- sito per ancoraggio di mRNA che facilita traduzione
- componente essenziale del meccanismo per la divisione cellulare
  - apparato di separazione cromosomi (mitosi e meiosi)
  - suddivide cellula madre in figlie

## Lo studio del citoscheletro



### L'uso della microscopia a fluorescenza

tecnica per studiare dinamiche del citoscheletro

- subunità proteiche rese fluorescenti
- iniettate in cellula vivente → localizzazione
- rivela anche strutture a basse concentrazioni → anticorpi ad alta specificità fluorescenti
  - rivelano anche funzione: anticorpo blocca attività



### L'uso della videomicroscopia e di raggi laser focalizzati per saggi di motilità in vitro

rilevabile attività di singole molecole proteiche che agiscono come motori molecolari

- sferette microscopiche con motori proteici attaccati a microtubuli utilizzando raggi laser focalizzati → pinzette ottiche (optical tweezers)
- raggi laser possono anche misurare forza prodotta da singola proteina motore su sferetta

→ sviluppo nanotecnologia



### L'uso di cellule manipolate con l'ingegneria genetica

studio polipeptidi attraverso analisi fenotipo in cui sono assenti o alterati

- creazione mutazioni specifiche e inserzione DNA in cellule o animali

in attivazione di geni: 2 approcci

- animali knockout – mancano di un gene particolare
  - se mostrano difetti specifici, indicano ruolo proteina
- cellule che sovraesprimono una proteina mutante dominante negativa – cellule producono grande quantità di proteina non funzionante
  - prodotte per trasfezione – incorporazione DNA alterato in cromosomi
  - proteina mutante sovraespressa compete con proteina normale → fenotipo mutante

## I microtubuli

### Struttura e composizione

- strutture **cave, tubulari** in tutte le cellule eucarioti
- componenti di **varietà di strutture** (fuso mitotico, ciglia e flagelli ecc.)
- diametro esterno di 24 nm, parete di 5 nm di spessore
- possono estendersi per tutto il diametro della cellula

### Parete

- proteine globulari disposte in file longitudinali → **prototofilamenti**
- allineati parallelamente all'asse longitudinale del tubulo

### Sezione trasversale

- formati da **13 prototofilamenti** disposti in disegno circolare a formare la parete

### Prototofilamento

- costituito da **blocchi dimerici** formati da una subunità globulare di  **$\alpha$ -tubulina** e da una di  **$\beta$ -tubulina**
  - struttura tridimensionale simile, si adattano una all'altra (forma complementare)
    - subunità  $\alpha$ : GTP legato (non idrolizzato né scambiabile)
    - subunità  $\beta$ : **GDP** legato (scambiato con GTP prima dell'assemblaggio del polimero)
- dimeri sono disposti in serie lineare
  - prototofilamenti adiacenti non in registro, ma **sfalsati** di 1 nm → molecole di tubulina disposte a elica
  - elica interrotta dove subunità  $\beta$  e  $\alpha$  formano contatti laterali → cucitura lungo microtubulo
  - distanza di **8 nm** tra un dimerico e il successivo
- eterodimero → componenti non identiche
  - prototofilamento è **asimmetrico**: estremità con  $\alpha$ -t. e estremità con  $\beta$ -t.
  - tutti i prototofilamenti di un microtubulo hanno la stessa **polarità** → intero polimero ha polarità
    - **estremità più – ad accrescimento rapido – subunità  $\beta$**
    - **estremità meno – ad accrescimento lento – subunità  $\alpha$**
  - polarità importante nell'accrescimento e nella capacità di partecipare ad attività meccaniche direzionali

### Proteine associate ai microtubuli

**MAP** – maggior parte solo nel tessuto cerebrale (tranne MAP4, in cellule non neuronali)

- dominio che si lega ad un microtubulo
- dominio che si estende come un filamento dalla superficie

### funzioni

- alcune **ponti** che connettono microtubuli
- alcune aumentano **stabilità** o modificano **rigidità** o **velocità di assemblaggio** dei microtubuli

attività è spesso controllata da aggiunta o rimozione di **gruppi fosfato** su particolari residui aminoacidici

- → opera di chinasi e fosfatasi
- MAP tau: livello alto di fosforilazione correlato a sviluppo malattie neurodegenerative
  - cellule cerebrali: grovigli neurofibrillari (tau non lega microtubuli)

### I microtubuli come supporto strutturale e come organizzatori

**rigidi** → resistenza a forza che comprimono o piegano fibra

- capacità di fornire **supporto meccanico**

distribuzione dei microtubuli in cellula → contributo a **determinazione forma**

- cellule in coltura: disposizione radiale – forma rotonda e appiattita

- epitelio colonnare: microtubuli orientati con il loro asse parallelo all'asse maggiore delle cellule
- assone: microtubuli paralleli a proprio asse
  - in assoni maturi → microtubuli sono binari per movimento vescicole e altre particelle citoplasmatiche
  - nell'embrione → mantengono assoni in forma estesa durante crescita
- protista – processi assopodali – struttura centrale da cui microtubuli a spirale
- cellule vegetali: influenza indiretta su forma (influenza su formazione parete cellulare)
  - interfase: microtubuli sotto membrana – zona corticale distinta
    - influenza su movimento enzimi che sintetizzano cellulosa
    - miofibrille di cellulosa dello strato più interno della parete assemblate parallelamente a microtubuli (→ perpendicolarmente a asse maggiore cellula → dato che cellulosa resiste a espansione laterale, pressione di turgore esercitata verso estremità: allungamento)

### I microtubuli come agenti della motilità intracellulare

distruzione microtubuli → impedimento trasporto di materiali tra compartimenti membranosi  
 cellule nervose → disposizione altamente ordinata di microtubuli e altri filamenti citoplasmatici

#### Trasporto assonale

assone di motoneurone si estende da midollo spinale a periferia

- centro di produzione neurone: corpo cellulare (nel midollo spinale)
  - contiene nucleo, RE e Golgi → sintesi proteine e altre molecole (non avviene nell'assone)
- materiali e neurotrasmettitori – racchiusi in vescicole membranose nel RE e nel Golgi
  - trasportate lungo l'assone a velocità differenti (fino a 5 µm al secondo)
- movimento da corpo a terminali assone: anterogrado
- vescicole di endocitosi (si formano nei terminali, trasportano fattori di regolazione provenienti da cellule bersaglio): movimento retrogrado (da sinapsi a corpo)

assoni ricchi di strutture citoscheletriche

- microfilamenti, microtubuli e filamenti intermedi interconnessi (proteine che formano legami crociati)

**movimento anterogrado e retrogrado mediato da microtubuli**: vescicole in movimento associate a microtubuli

- microtubuli – strutture passive → **binari**; **servono proteine motrici per generare forze**

#### Le proteine motrici che scorrono lungo il citoscheletro microtubulare

proteine motrici **convertono energia chimica (ATP) in energia meccanica** usata per trasporto carichi legati al motore

carichi: vescicole, mitocondri, lisosomi, cromosomi, altri filamenti citoscheletrici

cellule contengono diverse proteine motrici specializzate per un particolare carico in particolare regione cellula

3 famiglie di proteine motrici

- miosine
- chinesine
- dineine

**chinesine e dineine si muovono lungo microtubuli – miosine si muovono lungo i microfilamenti**

**movimento unidirezionale** a passi successivi lungo i binari citoscheletrici

- mentre proteina si sposta subisce **modificazioni conformazionali** – **ciclo meccanico**
- passi del ciclo meccanico sono associati a ciclo chimico (provvede a energia necessaria per il movimento)

#### ciclo chimico

- legame molecola ATP
- idrolisi ATP

- rilascio ADP e Pi → motore si muove di pochi nm
- nuovo legame ATP

ciclo meccanico e chimico ripetuti più volte

### Chinesine

isolata nel 1985 da assone gigante calamaro

responsabili del **movimento di vescicole e organelli verso terminali**

struttura:

- tetramero costituito da 2 catene pesanti identiche e 2 catene leggere identiche (è la proteina motore più piccola)
- **2 teste globulari** – si legano a microtubulo e agiscono come macchine che **idrolizzano ATP** e generano forza
- collo
- stelo bastoncellare – catene pesanti avvolte una sull'altra
- coda a ventaglio che si lega a carico da trasportare

vescicole si muovono **verso estremità più** del microtubulo → motore microtubulare diretto verso l'estremità più

- negli assoni estremità più verso i terminali sinaptici e estremità meno verso corpo cellulare → **movimento anterogrado**

chinesina si muove su singolo protofilamento ad una velocità proporzionale alla concentrazione di ATP (max 1  $\mu\text{m}/\text{sec}$ )

- passi distinti di **8 nm** – distanza tra i dimeri di tubulina lungo un protofilamento
  - movimento di **un eterodimero alla volta**

movimento tende ad essere **continuo** – percorse lunghe distanze (1  $\mu\text{m}$ ) senza staccarsi

- molecola a due teste riesce a farlo perché almeno una delle teste resta attaccata a microtubulo in ogni momento

**movimento coordinato teste**: sempre in stadi differenti dei loro cicli chimico e meccanico

- testa si lega a microtubulo
- cambiamento conformazionale nel collo adiacente (dopo attività catalitica teste)
- porta in avanti l'altra testa verso sito di legame successivo

molecola cammina idrolizzando una molecola di ATP ad ogni passo

chinesina convenzionale fa parte di superfamiglia di proteine: **KRP** o KLP (kinesin-related/like proteins)

- mammiferi – più di 50 KRP
- teste delle KRP hanno sequenze aminoacidiche simili – comune origine evolutiva e simile ruolo
- code hanno sequenze diverse – varietà dei carichi trasportati
- maggior parte KRP si muove verso l'estremità più (tranne Ncd, verso meno – differenze sono nel collo; altro gruppo è invece incapace di movimento: XKCM1)

### **Trasporto di organelli mediato dalla chinesina:**

vie seguite da vescicole citoplasmatiche sono definite da microtubuli e chinesine sono i motori responsabili del movimento

microtubuli sono disposti con estremità + lontane dal centro della cellula → chinesine tendono a **spostare vescicole e organelli verso l'esterno** (membrana plasmatica)

### La dineina citoplasmatica

prima proteina associata ai microtubuli scoperta – responsabile del **movimento di ciglia e flagelli**

proteina simile poi scoperta nel citoplasma → dineina citoplasmatica (proteina motrice ubiquitaria nelle cellule eucarioti)

struttura:

- proteina enorme – 1,5 mln di Dalton
- 2 catene pesanti identiche e da diverse catene intermedie e leggere (legame carico)

- o ogni catena pesante forma **testa globulare** (più grandi di teste chineina) → macchina **generatrice di forza**

dineina si muove **verso estremità meno (→ retrogrado)**

due ruoli per la dineina:

- agente generatore di forza nella disposizione del **fuso mitotico** e nel **movimento dei cromosomi** durante la mitosi
- motore microtubulare diretto verso l'estremità meno che determina la **posizione del complesso di Golgi** ed il **movimento delle vescicole e di organelli** nel citoplasma

movimento retrogrado in cellule nervose e movimento degli organelli citoplasmatici da periferia a centro cellula

carichi: endosomi, lisosomi, vesciche derivanti da RE e dirette verso golgi

non interagisce direttamente con carico circondato da membrana → cooperazione con complesso:

**dinactina** (regola attività dineina e produce legame con carico); anche chineina ha intermediario: **chinectina**

chineina e dineina muovono materiali simili in direzione opposta sullo stesso microtubulo

- organelli le legano simultaneamente, ma una delle 2 è inattivata (anche la miosina può essere presente su organelli)

### I centri di organizzazione dei microtubuli (MTOC)

funzione microtubulo dipende da posizione e orientamento

**assemblaggio dimeri** αβ-tubulina: 2 fasi

- fase lenta – **nucleazione** (si forma piccola porzione microtubulo)
- fase rapida – **allungamento**

nucleazione associata a strutture specializzate → MTOC (tra cui centrosoma)

### I centrosomi

in cellule animali – microtubuli del citoscheletro si formano in associazione con il centrosoma

struttura **centrosoma**:

- **2 centrioli** a forma di barilotto
  - o uno parentale più lungo, uno figlio più corto
- matrice pericentriolare (**PCM**) amorfa e opaca a elettroni intorno a centrioli (reticolo fibroso lassamente organizzato)

struttura **centrioli**:

- strutture cilindriche (0,2 μm di diametro, lunghi il doppio)
- contengono **9 fibrille** uniformemente spaziate
- trasversalmente ogni fibrilla è composta da **3 microtubuli** congiunti, A, B, C
  - o solo tubulo A è completo – connesso a centro del centriolo da un braccio radiale
  - o disposizione dei microtubuli conferisce aspetto a girandola a centriolo

centrioli si trovano quasi sempre a coppie – posti ad **angolo retto** uno rispetto all'altro

centrosomi sono i siti in cui converge un gran numero di microtubuli

### **origine dei microtubuli**

- studiabile attraverso depolarizzazione per mezzo del freddo e riassetto con il calore
- microtubuli appena formati si irradiano da un centrosoma
  - o non penetrano nel centrosoma e non prendono contatto con i centrioli → **terminano nel materiale denso pericentriolare**
  - o centrioli → ruolo nel reclutare i PCM che li circonda (no ruolo diretto in nucleazione)

centrosoma si trova al centro della cellula, appena fuori dal nucleo

- cellule epiteliali colonnari → regione apicale – microtubuli si estendono verso il nucleo e superficie basale
- **siti di nucleazione** dei microtubuli, la cui polarità è sempre la stessa
  - o **estremità – associata con il centrosoma**



- o estremità + lontana
  - microtubuli nucleati a livello del MTOC, ma si allungano all'altra estremità del polimero

non tutti i microtubuli sono associati a un centrosoma – micron. assionali: formati a livello del centrosoma, poi rilasciati dal MTOC e trasportati nell'assone da proteine motrici

#### Corpi basali e altri MTOC

centrosomi non sono unici MTOC → ciglia e flagelli hanno origine da **corpo basale**

- stessa struttura di centrioli (convertibili con centrioli)
- cellule vegetali mancano di centrosomi e centrioli → MTOC diverse

#### La nucleazione dei microtubuli

tutti **MTOC** hanno ruolo simile:

- controllo **numero** microtubuli
- controllo **polarità** microtubuli
- controllo numero **protofilamenti** della parete
- controllo **momento e luogo** assemblaggio

tutti MTOC hanno **γ-tubulina** (presente in quantità molto inferiori rispetto a α e β-tubulina)

- componente critico della nucleazione dei microtubuli (in assenza di questa non avviene)

fibre insolubili PCM: sito di attacco per strutture anulari che hanno stesso diametro dei microtubuli (25 nm) e contengono γ-tubulina

- disposizione a elica di 13 subunità di γ-tubulina → stampo a forma di anello sul quale si forma il primo giro di dimeri αβ (soltanto α può legare γ-tubuline): **nucleazione** → stabilità polarità dell'intero microtubulo

#### Le proprietà dinamiche dei microtubuli

microtubuli del **fuso mitotico** e del **citocheletro**: estremamente sensibili al **disassemblaggio**

microtubuli dei neuroni maturi meno sensibili, quelli di ciglia e flagelli altamente stabili (grazie a MAP e modificazioni enzimatiche)

disassemblaggio avviene senza danni a altre strutture

- dovuto a freddo, pressione idrostatica, elevate concentrazioni Ca<sup>++</sup> e sostanze chimiche (colchicina, vinblastina, vincristina, nocodazolo, podofilotossina, taxolo)
  - o taxolo impedisce disassemblaggio → impedito nuovo assemblaggio
    - usati in chemioterapie (uccidono di preferenza cellule tumorali)

**labilità** → polimeri formati da **associazioni non covalenti** di subunità dimeriche

- disassemblaggio/riassembliamento a seconda delle **diverse esigenze** in ogni istante  
es.: cellula vegetale – 4 disposizioni di microtubuli
  - o interfase: distribuiti in tutta la cortex
  - o verso mitosi: singola fascia trasversale: fascia preprofasica (sito di futuro piano di divisione)
  - o durante mitosi: fascia si perde, formazione fuso mitotico
  - o dopo separazione cromosomi: fuso si perde, formazione fragmoplasto → ruolo nella formazione parete cellulare che separa le due cellule

**cambiamenti nell'organizzazione** – 2 meccanismi separati:

- **riarrangiamento** microtubuli esistenti
- **disassemblaggio** dei microtubuli esistenti e **riassembliamento** di nuovi in differenti regioni della cellula

#### Lo studio in vitro della dinamica dei microtubuli

assemblaggio microtubuli in vitro – 1972

- 37°, con Mg<sup>++</sup>, GTP, EGTA (lega Ca<sup>++</sup> che inibisce polimerizzazione)
- 11 protofilamenti (invece di 13)

subunità di **tubulina sono aggiunte soprattutto all'estremità +** del polimero preesistente per assemblaggio dei dimeri è necessario GTP legato a β-tubulina

- **idrolisi** non necessaria per incorporazione: avviene poco **dopo incorporazione**
  - GDP rimane legato
  - quando un dimeri è rilasciato da microtubulo, GDP sostituito con nuovo GTP
- GDP/GTP → controllo indipendente di velocità assemblaggio e disassemblaggio
- conformazioni differenti → differente struttura
    - microtubulo in accrescimento: **estremità +** ha forma di **foglietto aperto** al quale vengono aggiunti dimeri **GTP**
    - durante accrescimento rapido, dimeri incorporati a velocità più alta di quanto GTP possa essere idrolizzato → formazione **cappuccio di GTP**
      - cappuccio favorisce aggiunta di altre subunità
    - **estremità aperta** va incontro a reazione spontanea che porta alla **chiusura del tubulo** → **idrolisi GTP** → cambio conformazione dimeri tubulina
      - **tensione meccanica** → protofilamenti si arricciano verso l'esterno → **depolimerizzazione catastrofica**
        - accorciamento con notevole velocità

#### Lo studio della dinamica dei microtubuli in vitro

ad ogni istante alcuni microtubuli crescono in lunghezza mentre altri si stanno accorciando sia accrescimento che accorciamento avvengono soprattutto all'estremità + del polimero (lontana da centrosoma - MTOC)

accorciamento avviene più rapidamente dell'allungamento

#### **instabilità meccanica**

- microtubuli che accrescono e che si accorciano possono coesistere nella stessa regione
  - stesso microtubulo può passare da fasi di accrescimento a fasi di accorciamento
- cellule regolano velocità di accrescimento/accorciamento e frequenza interconversione alterando le condizioni prevalenti nel citoplasma
- presenza di **proteine che favoriscono uno o altro processo**
    - chinesine favoriscono disassemblaggio
    - catanina incrementa tasso di disassemblaggio
      - taglia microtubuli → maggiori estremità disponibili per disassemblaggio
- regolando equilibrio tra assemblaggio e disassemblaggio, **cellule rispondono rapidamente al variare delle condizioni** che richiedono un **rimodellamento** della struttura del citoscheletro
- microtubuli degli organelli (non del citoscheletro) mancano di attività dinamica e sono molto stabili



#### Ciglia e flagelli: struttura e funzione

sottili **organelli motori** che si proiettano dalla superficie di una gran varietà di cellule eucarioti  
2 versioni della stessa struttura – si distinguono per il modo di muoversi

- **ciglio**: "remo" che si muove in una direzione perpendicolare a se stesso
  - fase di spinta: mantenuto rigido – spinge contro il mezzo
  - fase di ritorno: ciglio diventa flessibile offrendo poca resistenza a mezzo
  - tendono ad essere presenti in **gran numero** sulla superficie di una cellula
    - battito solitamente **coordinato**
      - onde metacroniche (ciglia di determinata fila sono allo stesso stadio del ciclo del battito, mentre quelle di fila adiacente si trovano in uno stadio differente)
  - negli organismi multicellulari **muovono fluidi e materiale particellare**
    - epitelio ciliato riveste tratto respiratorio – muco e detriti fuori dai polmoni
  - ruolo nel determinare **posizione organi** rispetto a piano di simmetria durante gastrulazione (→ nodo embrionale: ciglia ruotano in senso antiorario → stomaco, cuore, milza a sinistra e fegato a destra; altrimenti condizione di situs inversus)

- **flagello**: **più lungo** di ciglia, in **minor numero**
  - tipi differenti di battito (forme d'onda) a seconda del tipo cellulare
    - alga unicellulare: ondulazione simmetrica dei 2 flagelli
      - battito regolato da concentrazione interna  $Ca^{++}$



### La struttura di ciglia flagelli

parte sporgente coperta da membrana in continuità con membrana plasmatica

parte centrale ciglio: **assonema**

- contiene insieme di microtubuli che percorre longitudinalmente l'intero organello
- formato da 9 coppie periferiche di microtubuli che circondano un paio centrale di microtubuli separati
  - disposizione **9+2**
  - tutti i microtubuli hanno **stessa polarità**
    - **estremità +** all'**apice** del ciglio
    - estremità – alla base

### **doppietti periferici**

- microtubulo **completo: tubulo A**
- microt. incompleto: tubulo B (10/11 subunità invece di 13)
- collegati tra loro da **ponti intercoppia** (proteina elastica, **nexina**)

### **tubuli centrali**

- circondati da espansioni che formano la **guaina centrale**
  - collegata ai **tubuli A** delle coppie periferiche da **raggi**

**da tubulo A si proiettano bracci**

- braccio **esterno** (3 teste) e braccio **interno** (2 teste) di **dineina**

natura continua dei microtubuli e discontinua degli altri elementi

- raggi: a gruppi di 3 distanziati 96 nm
- bracci esterni distanziati 24 nm

**corpo basale** da cui originano ciglia e flagelli:

- 9 fibrille periferiche ognuna formata da **3 microtubuli** (A completo, B e C incompleti)
  - **A e B si prolungano** nel ciglio e nel flagello
- non ci sono microtubuli centrali

se ciglio e flagello è strappato da superficie cellula → si rigenera nuovo organello da corpo basale

### I bracci di dineina

**meccanismo per movimento** di ciglia e flagelli risiede nell'**assonema**

- battito avviene in presenza di  $Mg^{++}$  e **ATP** (maggiore concentrazione ATP, maggiore frequenza del battito)
  - proteina responsabile di conversione energia chimica ATP in energia meccanica: **dineina ciliare**
    - scoperta attraverso esperimento di Gibbons:
      - dissezione assonema (digitonina)
      - assonemi trattati con EDTA – scomparsa bracci dei tubuli A e tubuli centrali
        - assonemi perdono capacità di idrolizzare ATP (capacità guadagnata da supernatante)
      - ricombinazione con  $Mg^{++}$ 
        - bracci ricomparsi insieme a attività ATPasica

rimozione selettiva di bracci esterni: velocità dimezzata

### **bracci esterni:**

- 3 teste globulari (formate da catene pesanti) attaccate tramite sottili peduncoli a base comune
- ogni testa è un ponte trasversale che idrolizza ATP
- base saldamente attaccata a superficie esterna tubulo A

- teste globulari hanno espansioni proiettate verso tubulo B della coppia adiacente  
proteina è formata da 3 catene pesanti ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), 2 catene intermedie, diverse catene leggere

#### Il meccanismo di locomozione cigliare e flagellare

modello actomiosinico → movimento cigliare spiegato con lo **scorrimento reciproco delle coppie microtubulari**

**bracci di dineina** lavorano come **ponti trasversali oscillanti che generano forza**

- si proiettano da una coppia e **camminano lungo parete di coppia adiacente**
  - scorrimento reciproco
- 1 – braccia di dineina ancorate su tubulo A di coppia inferiore si attaccano a siti di legame su tubulo B di coppia superiore
- 2 – dineina: cambiamento conformazionale → coppia inferiore scivola verso estremità basale della coppia superiore
- 3 – braccia di dineina si staccano da tubulo B di coppia superiore
- 4 – braccia si riattaccano a coppia superiore per iniziare nuovo ciclo

**scorrimento su un lato dell'assonema si alterna con scorrimento su lato opposto** → parte di ciglio o flagello si piega prima in una direzione e poi nella direzione opposta

- in ogni momento braccia di dineina su un lato sono attive, sull'altro lato inattive
  - **coppie sul lato interno della curvatura si estendono oltre quelle sul lato opposto dell'assonema** (non si contraggono → estensione coppie esterne; quando ciglio è dritto, coppie terminano allo stesso livello)

#### La regolazione della locomozione di ciglia e flagelli

ciglia battono da 10 a 40 volte a secondo

- ogni colpo ha forma precisa
- movimento coordinato: migliaia di ciglia lavorano insieme
- **attività altamente regolata**
  - regolazione delle braccia di dineina
    - non tutte dineine attive nello stesso momento (altrimenti paralisi)
    - paio centrale di microtubuli e raggi → determinano dineine attive in ogni istante
      - **paio centrale ruota quando ciglio e flagello si muovono** → striscia periodicamente contro ogni raggio → segnale a dineina su tubulo A → movimento oscillatorio
    - attivazione/inattivazione bracci → aggiunta o rimozione **gruppi fosfato** su dineina (proteina motoria)

#### **Filamenti intermedi**

filamenti pieni, lisci, non ramificati; **diametro: 10 nm (intermedio)** → filamenti intermedi – IF

- con certezza solo in cellule animali

si estendono nel citoplasma, spesso sono **interconnessi a altri tipi di filamenti** citoscheletrici da sottili **ponti trasversali**

- ponti: enorme proteina fibrosa allungata, **plectina** (differenti isoforme)
  - sito di legame per IF a un'estremità e per altro filamento su altra estremità

gruppo eterogeneo di strutture – almeno 60 geni

- subunità polipeptidiche – divise in **6 classi** in base a distribuzione nei tessuti
  - tipo **I**: **cheratina** (15 subunità) – epiteli
  - tipo **II**: **cheratina** (più pesante, sempre 15 subunità) - epiteli
  - tipo **III**: **desmina** (vimentina, GFAP, periferina) – muscolo (cellule mesenchimali, cellule gliali, neuroni periferici)
  - tipo **IV**: proteine dei **neurofilamenti** (NF-L, NF-M, NF-H) – neuroni dei nervi periferici e centrali
  - tipo **V**: famiglia delle **laminine** – tutti i tipi di cellule (involucro nucleari)

- o tipo VI: **nestina** – cellule staminali nervose
- in comune: organizzazione simile dei domini → formazione filamenti apparentemente simili
  - o ogni polipeptide: **dominio centrale  $\alpha$ -elica**
    - forma bastoncellare, lunghezza e sequenza aminoacidica simile
  - o affiancato da **domini globulari variabili**
  - o 2 polipeptidi di questo tipo → si avvolgono spontaneamente: **dimero fibroso** di 45 nm di lunghezza
    - 2 polipeptidi allineati parallelamente – stesso orientamento → dimero ha **polarità**

#### Assemblaggio e disassemblaggio dei filamenti intermedi

unità di base IF: **tetrametro**

- formato da **2 dimeri** che si accostano lateralmente in modo sfalsato
  - o estremità N- e C- terminali **antiparallele** (N- di un dimero opposto a N- dell'altro dimero)
    - tetrametro **non è polare**

tetrameri si associano tra di loro lateralmente → formazione filamento finale

- non polare (distinzione da microtubuli e microfilamenti)

molto **resistenti a trazione**

- similmente a fibre collagene → stessa composizione di subunità sfalsate
- es.: strato più esterno **epidermide** – denso strato di filamenti intermedi cheratinizzati
  - o pelle **impermeabile** all'aria, all'acqua e a agenti chimici e batteri

più resistenti a rottura chimica e **meno solubili** di altri filamenti citoscheletro

- in caso di disassemblaggio, subunità possiedono tutte informazioni necessarie per autoassemblaggio

**comportamento dinamico**

- subunità incorporate da filamenti già esistenti
  - o **incorporate all'interno** del filamento, non all'estremità
- → cellula rimane in equilibrio tra subunità polimerizzate e subunità libere (come nei microtubuli e nei microfilamenti)
  - o **assemblaggio/disassemblaggio continuo** – regolato da **fosforilazione/defosforilazione** di subunità

#### Tipi e funzione dei filamenti intermedi

**in cellule epiteliali** (e cellule epidermiche, epatociti, cellule acinose pancreas)

- **cheratine di tipo I (acide)**
- **cheratine di tipo II (neutre e basiche)**

IF → eterodimeri contenente un polipeptide per tipo cheratinico

- filamenti cheratinici epiteli: gabbia intorno al nucleo, si diramano nel citoplasma
  - o terminano in placche citoplasmatiche di desmosomi e emidesmosomi

**nei neuroni**

- citoplasma: fasci di IF lassamente associati – asse maggiore parallelo a quello di assone → **neurofilamenti**
  - o braccia laterali che sporgono dal neurofilamento
    - mantengono **distanza corretta** tra i neurofilamenti paralleli dell'assone
      - primi stadi di differenziamento: assone – tanti microtubuli (sostegno) pochi IF
      - crescita completa: assone – si riempie di neurofilamenti, aumento diametro (studi su mutante spontaneo quaglia giapponese – non produce neurofilamenti – quiver=tremare)

studi su topi knockout per polipeptidi IF

- K14 – cheratina tipo 1 – topi sensibili a pressione meccanica
  - simile a EBS umana
- ruolo dell'IF nell'impartire **resistenza meccanica** alle cellule degli strati epiteliali
- knockout per desmina - anomalie cardiache e del muscolo scheletrico
- desmina: mantiene **allineamento miofibrille** – senza: cellule fragili
- non tutti i polipeptidi IF hanno funzioni essenziali – IF hanno funzioni tessuto-specifiche che sono più importanti in alcune cellule rispetto ad altre
- sovraespressione NF-L – accumulo di neurofilamenti → impedisce movimento metriali e organelli lungo assone → degenerazione assonica e atrofia muscolare (ALS)

## Microfilamenti

### motilità cellulare

- movimento cellule, es.: creste neurali embrione, leucociti nel sangue
- movimento di parti di cellule, es.: espansioni cellule epiteliali attorno a ferita, margine guida di un assone
- elemento in comune: **dipendono da presenza di microfilamenti**

### microfilamenti

- diametro 8 nm
- composti da **subunità globulari di actina**
  - in presenza di **ATP** → monomeri di actina **polimerizzano** formando un **filamento** rigido:
    - **2 filamenti** di molecole di actina avvolte uno sull'altro a doppia elica
      - microfilamento o **F-actina**
    - ogni subunità di actina ha polarità – tutte subunità orientate nella stessa direzione → **intero microfilamento risulta polare**
  - possono essere organizzati in sistemi altamente ordinati, in reticoli lassi mal definiti, in fasci compatti

actina: una delle principali proteine di quasi tutti i tipi di cellule eucarioti

- numerosi geni codificano per actina
  - prodotti specializzati per diverse attività motorie
  - struttura **actina conservata** durante evoluzione (sequenze aminoacidi di lievito e coniglio combaciano per 88%)

filamenti di actina **interagiscono** in modo altamente specifico con la proteina **miosina**

- frammento S1 di miosina purificata scissa si lega a molecole di actina lungo tutto il filamento
  - identifica polarità: dopo attacco **S1**, un'estremità actina appare **appuntita** l'altra **sfrangiata** → decorazione a **punta di freccia**
    - orientamento punte di freccia indica direzione in cui sarà mosso il microfilamento da proteina motrice miosonica

### Assemblaggio e disassemblaggio dei microfilamenti

**actina: ATPasi** (come **tubulina è GTPasi**) – senza ATP, actina non è incorporata nel filamento

- ATP associato a monomero di actina viene idrolizzato a ADP dopo incorporazione nel filamento in crescita (come GDP nei microtubuli)
- quando le cellule assemblano filamenti ad alta velocità → estremità: **cappuccio** di subunità actina-ATP che ostacola disassemblaggio e favorisce assemblaggio

un'estremità incorpora filamenti a 5-10 volte la velocità dell'altro

**estremità sfrangiata (+) – crescita rapida**

- **estremità appuntita (-) – crescita lenta**; sito preferenziale di depolimerizzazione
  - subunità **actina-ATP** tendono ad **aggiungersi** ad estremità **+**, mentre subunità **actina-ADP** tendono a **staccarsi** da estremità **-**
    - singoli monomeri si muovono da estremità a altra → **treadmilling** (filatura)

- cellule mantengono **equilibrio dinamico** tra forme monometrica e polimerica dell'actina
  - tasso di assemblaggio/disassemblaggio influenzato da diverse proteine e da condizioni locali
    - riorganizzazione di microfilamenti del citoscheletro necessaria per processi dinamici, come la locomozione, i cambiamenti di forma, la citochinesi

determinazione del ruolo dell'actina nella cellula:

- trattamento con citocalasine → depolimerizzazione dei microfilamenti
- trattamento con falloidina → microfilamenti stabilizzati al massimo

#### Miosina: il motore molecolare dei filamenti di actina

terzo motore oltre a chinesina e dineina – ma scorre sui microfilamenti

- tutti i **motori** che agiscono in connessione con **filamenti di actina** appartengono a famiglia miosine
- tutte le miosine (una sola eccezione) si muovono **in direzione delle estremità +** dei microfilamenti
  - se le molecole di miosina sono **impedite** nei loro movimenti (→ cellule muscolari), attività della miosina **fa muovere i filamenti di actina** con estremità – in avanti

miosine:

- caratteristico dominio motorio: **testa**
  - contiene sito che lega e **idrolizza ATP** → fornisce energia al motore
  - domini molto simili
- domini della coda
  - molto differenti
- contengono anche varietà di catene a basso peso molecolare (leggere)

divise in **2 classi**:

- miosine **convenzionali** – di tipo II
  - **non convenzionali** – tipo I e III-XV (14 classi)
- ogni tipo ha funzioni specializzate; più tipi possono essere contemporaneamente presenti nella stessa cellula

#### Miosine convenzionali (tipo II)

si trovano in vari tipi di tessuti muscolari e anche in molte cellule non muscolari

- **attività non muscolari**:
  - necessarie per dividere le cellule in due durante divisione cellulare
  - generano tensione alle adesioni focali

struttura:

- **6 catene polipeptidiche**
  - 1 coppia di catene pesanti
  - 2 coppie di catene leggere
- proteina altamente asimmetrica
  - paio di **teste globulari** → contengono sito catalitico della molecola
  - paio di **colli** → singola  $\alpha$ -elica ininterrotta + 2 catene leggere associate
  - lunga coda a forma di bastoncino → avvolgimento delle sezioni ad  $\alpha$ -elica delle 2 catene pesanti: **superelica**

apparato richiesto per **attività motoria** risiede nelle teste (**frammenti S1**) → fanno slittare i filamenti di actina a cui aderiscono

porzione fibrosa della **coda** interviene nell'**assemblaggio** della miosina in filamenti

- assemblaggio: code rivolte verso il centro e teste rivolte verso estremità → **filamento bipolare**
  - inversione di polarità nel centro del filamento

filamenti di miosina II

- componenti molto stabili dell'apparato contrattile nel muscolo scheletrico
  - **disposizione sfalsata** miosina II
    - estremità: teste
    - centro: sezione liscia, avvicinamento laterale supereliche formate da catene pesanti (sezione liscia)
- cellule non muscolari → più piccoli, strutture transitorie

Miosine non convenzionali

1973: scoperta miosina non convenzionale

- più piccola (4 catene leggere – 2 cadmuline leganti calcio)
  - solo 1 testa e 1 coda (che si lega a teste polari dei lipidi di membrana)
  - non capace di formare filamenti
- **miosina I**

classi delle miosine non convenzionali: basate su sequenza aminoacidica

miosine non convenzionali sono **in grado di generare movimenti ATP- dipendenti** con filamenti di actina in vitro

cellule trattate in modo da esprimere solo miosina I sono ancora capaci di processi basati sull'actina (locomozione, fagocitosi), ma **non sono in grado di dividersi**

- divisione (citochinesi) strettamente dipendente da miosina II

**miosina V**

- dimerica
- si sposta lungo i filamenti di actina
  - alta affinità teste per filamento di actina – testa rimane attaccata fino a quando non si riattacca seconda testa
- notevole lunghezza collo (23 nm) x3 rispetto a miosina II
  - può fare **passi molto più lunghi (+ di 30 nm)**
    - ripetizioni della doppia elica di actina: 36 nm → = lunghezza passo miosina V

miosine **associate a vescicole** citoplasmatiche: I, V, VI

- vescicole possono contenere sia motori microtubulari (chinesine / dineina citoplasmatica) che motori basati su microfilamenti (miosine non convenzionali)
  - movimento su lunghe distanze: microtubuli
  - movimento in periferia su microfilamenti (zone ricche di actina)

mancanza di gene per miosina V – parziale albinismo (no trasporto cellula pigmentata)

**miosina VII**

- cellule capillate coclea dell'orecchio interno
  - **stereociglia** rigide → spostamento per stimoli meccanici → generazione impulsi nervosi → percezione suono
    - stereociglio: fascio di filamenti di actina che contiene molecole di miosina VII
      - mutazioni di geni per miosina VII → sordità

**miosina VI**

- trasportatore di organelli che si muove in direzione opposta
  - **verso estremità appuntita (-)** di filamento actina

**Contrattilità muscolare**

muscoli scheletrici

- ancorati alle ossa
  - determinano il movimento
- sotto controllo volontario

**cellule muscolari**

- diametro da 10 a 100 µm, lunghezza fino a 40 mm



- "fibre muscolari"
- più nuclei → fibre nate da fusione di un gran numero di mioblasti mononucleati nell'embrione
- struttura più altamente ordinata di qualsiasi altra cellula
  - cavo formato da centinaia di filamenti cilindrici più sottili detti **miofibrille**
    - miofibrille: successione lineare ripetitiva di unità contrattili (**sarcomeri**) dotate di caratteristico sistema di bande e linee (**aspetto striato**)

bandeggiatura: parziale **sovrapposizione** di due distinti tipi di filamenti

- **filamenti sottili**
- **filamenti spessi**

**sarcomero:**

- si estende da **linea Z** a successiva
  - contiene diverse bande scure e zone chiare
- coppia di **bande I**
  - colorate debolmente – **filamenti sottili**
  - margini estremi
- **banda A**
  - colorata più intensamente – **regione di sovrapposizione** (entrambi i tipi di filamenti)
  - tra le bande esterne I
- **zona H**
  - debolmente colorata – filamenti **spessi**
  - al centro della banda A
- **linea M**
  - colorata intensamente
  - al centro della zona H

sezioni trasversali:

- sistema esagonale attorno a ciascun filamento spesso
- ogni filamento sottile tra 2 filamenti spessi

sezioni longitudinali:

- presenza di proiezioni dai filamenti spessi → **ponti trasversali** (attacco su filamenti sottili)



Il modello di scorrimento dei filamenti per la contrazione muscolare

muscoli scheletrici lavorano per **accorciamento**

- unità di accorciamento sono i sarcomeri (diminuzione di lunghezza coordinata)
- accorciamento della fibra:
  - **banda A** rimane di lunghezza **costante**
  - bande **I** e **H** **diminuiscono** ampiezza fino a scomparire
  - **linee Z** si avvicinano **verso margine esterno della banda A** fino ad entrare in contatto con esso

Huxley: accorciamento sarcomeri → no accorciamento filamenti, ma scorrimento uni sugli altri

- **scorrimento filamenti sottili verso centro sarcomero:**
  - aumento **sovrapposizione** tra i filamenti e diminuzione ampiezza di bande I e H

Composizione e organizzazione dei filamenti spessi e sottili

**filamenti sottili → actina**

- **tropomiosina**
  - molecola allungata (40 nm); si inserisce nella scalmanatura tra le due catene di actina del filamento sottile
  - ogni tropomiosina filamentosa è associata con 7 molecole di actina disposte linearmente lungo il filamento sottile
- **troponina**

- o proteina globulare, 3 subunità; distanziate 40 nm lungo il filamento sottile, a contatto con actina e tropomiosina
- filamenti di actina di ogni mezzo sarcomero sono allineati con estremità sfrangiate legate a linea Z

#### filamenti spessi → miosina

- invertono la polarità al centro del sarcomero
- centro del filamento è composto da code contrapposte delle miosine (privo di teste)
- teste sporgono da ogni filamento spesso per gran parte della sua lunghezza (→ posizione sfalsata)

#### titina

- proteina più grande e più lunga
- origine dalla linea M e si allungano sui filamenti di miosina → continuano oltre banda A e terminano su linea Z
- molecola elastica – si allunga quando certi domini della molecola vengono srotolati
- impedisce che sarcomero venga strappato durante stiramento dei muscoli e mantenga posizione dei filamenti di miosina al centro del sarcomero durante contrazione

#### Le basi molecolari della contrazione

**teste di miosina** si estendono lateralmente per prendere contatto con il filamento sottile, formando **ponti trasversali**

- interagiscono con i 6 filamenti di actina che le circondano mentre testa è legata a miosina → cambiamento conformazionale
  - filamento actinico mosso di 5-15 nm verso il centro del sarcomero
- differenza con chinesina: miosina rimane in contatto con binario per piccola frazione del ciclo complessivo

- ogni filamento sottile in contatto con un **insieme di un centinaio di teste miosiniche** che oscillano senza sincronia
  - o filamento sottile ha **movimento continuo**
    - spostato di centinaia di nm in 50 ms

spiegazione del meccanismo d'azione:

- **energia rilasciata da idrolisi ATP** → **cambio conformazionale** nella testa mentre è legata a filamento actina
- movimento testa amplificato di circa 20 volte da **movimento a pendolo del collo** a  $\alpha$ -elica
  - o collo allungato: braccio di leva – actina scivola per distanza maggiore di quanto non sarebbe possibile
  - o 2 catene leggere avvolte intorno al collo producono rigidità leva
    - prova: miosine con colli differenti – movimento proporzionale a lunghezza collo

#### L'energetica dello scorrimento dei filamenti

miosina converte energia chimica ATP in energia meccanica

- ciclo di attività meccanica: 50 ms – accompagnato da ciclo di attività ATPasica

#### ciclo:

- ATP si lega a testa miosina
  - o dissociazione del ponte dal filamento di actina
- idrolisi ATP
  - o miosina ancora staccata da actina
  - o ADP e Pi rimangono attaccati a sito attivo enzima
  - o energia dell'idrolisi assorbita da proteina
- ponte è in stato energizzato
  - o attacco a molecola di actina
  - o rilascio Pi

- cambiamento conformazionale
- spostamento filamento actina verso centro sarcomero → fase attiva testa di miosina
- rilascio ADP legato (miosina ancora attaccata a actina)
- attacco nuovo ATP – distacco miosina: inizio nuovo ciclo

in assenza di ATP, testa di miosina rimane saldamente legata a actina → rigor mortis

#### Accoppiamento eccitazione-contrazione

fibre muscolari organizzate in gruppi detti **unità motorie**

- fibre di unità motore sono innervate da ramificazioni di **unico assone motore**
  - si contraggono contemporaneamente in seguito a stimolazione

punto di contatto tra terminazione assone e fibra muscolare

- **giunzione neuromuscolare**: sito di trasmissione impulso nervoso da assone, attraverso spazio sinaptico, a fibra muscolare
  - membrana muscolare è eccitabile e in grado di condurre potenziale d'azione

#### accoppiamento eccitazione-contrazione

- impulso generato in cellula muscolare scheletrica si propaga all'interno (non rimane sulla superficie come negli assoni) lungo i ripiegamenti membranosi detti **tubuli trasversi**
  - tubuli T terminano vicino a sistema di membrane che costituiscono **reticolo sarcoplasmatico RS** (forma manicotto membranoso intorno a miofibrilla)
    - 80% proteine integrali di reticolo sarcoplasmatico: **Ca<sup>++</sup>-ATPasi** → trasporto Ca<sup>++</sup> fuori da citosol nel lume del reticolo (accumulati)

#### ruolo del Ca<sup>++</sup>

- in condizioni di **rilassamento**: Ca<sup>++</sup> nel citoplasma a **livelli bassi** (sotto soglia richiesta per contrazione)
- arrivo **potenziale** tramite tubuli T → **canali** Ca<sup>++</sup> in RS **si aprono**
  - calcio diffonde all'esterno del compartimento – supera distanza da miofibrille
  - aumento livello Ca<sup>++</sup> intracellulare

sarcomero rilassato: **tropomiosina blocca siti di legame per miosina su molecole di actina**

- posizione di tropomiosina nella scanalatura è controllata da troponina

aumento livelli Ca<sup>++</sup> → **ioni si legano a subunità di troponina (C)**

- **cambio conformazionale** in altra subunità troponina
  - → tropomiosina adiacente si sposta di 1,5 nm verso il centro della scanalatura
  - **esposizione sito di legame per miosina su molecole di actina**
    - ponte trasversale del filamento spesso si attacca a filamenti sottili

1 troponina controlla 1 tropomiosina; 1 tropomiosina controlla capacità di legame di 7 monomeri di actina del filamento sottile

fine stimolazione nervosa → chiusura canali calcio su RS, Ca<sup>++</sup>-ATPasi rimuove eccesso di calcio dal citosol

- Ca<sup>++</sup> si dissociano da siti di legame su troponina, tropomiosina ritorna in posizione che impedisce interazione actina-miosina

→ rilassamento: competizione tra troponina e Ca<sup>++</sup>-ATPasi → proteina di trasporto ha affinità maggiore per ione: lo rimuove dal citosol

## Codificazione dell'informazione genetica

da DNA a proteina → RNA e codice genetico



### Codificazione dell'informazione genetica

G. Gamow → ciascun aminoacido codificato da una sequenza di tre nucleotidi

- codoni = **triplette**
- necessari almeno 3 nucleotidi perché ogni aminoacido possa avere un proprio specifico codone → **4 lettere, 64 parole ( $4^3$ )**; 2 lettere, 16 parole ( $4^2$ ) → 20 aminoacidi, quindi codoni di almeno 3 nucleotidi
- per Gamow codice è sovrapposto (scorretto)

codice è **non sovrapposto** → ciascun nucleotide fa parte di un solo codone (ribosoma si muove di tre in tre nucleotidi)

- studio emoglobina in anemia falciforme → proteina mutata: sostituzione di un solo aminoacido
  - se sovrapposto: una mutazione → alterazione di tre aminoacidi
  - se non sovrapposto: una mutazione → alterazione di un aminoacido
    - corretto

codice è **degenerato** → aminoacidi specificati da più di un codone (tranne due)

- solo 3 su 64 codoni non specificano aminoacidi
- ipotizzato già da Crick: contenuto di G+C può variare molto nel DNA di batteri, ma proteine avevano poche variazioni → aminoacidi specificati da diverse sequenze di basi

### L'identificazione dei codoni

1961, Nirenberg, Matthaei: tecnica per codifica del codice

- sintesi messaggi genetici artificiali
  - per determinare che proteina codificassero
- poli(U) in provetta con tutti aminoacidi e ribosomi → formazione **fenilalanina (→ UUU)**
- attraverso mRNA sintetici codice genetico è stato decifrato

codice è **universale** → stessi codoni, stessi aminoacidi in tutti gli organismi

- eccezioni: mitocondri
  - uomo: UGA=triptofano invece di stop; AUA=metionina invece di isoleucina; AGA e AGG=stop invece di arginino
- → origine evolutiva comune

corrispondenza tra aminoacido e codone: fenomeno non casuale → **aminoacidi raggruppati in zone**

- **somiglianza nei codoni che specificano stesso aminoacido**
- → mutazioni spontanee di un nucleotide hanno meno probabilità di far cambiare aminoacido

**aminoacidi simili tendono ad essere specificati da codoni simili**

- idrofobici nelle prime due colonne
- → mutazione di una base: maggiore probabilità di far cambiare aminoacido in uno simile a quello originale (minori conseguenze)

somiglianze più evidenti nei primi due nucleotidi dei codoni che codificano per stessi aminoacidi (es.: glicina – 4 codoni, tutti iniziano per GG)

## La decifrazione dei codoni: il ruolo degli RNA di trasferimento

Traduzione: informazione codificata nella sequenza nucleotidica di mRNA decodificata e utilizzata per dirigere assemblaggio aminoacidi in una sequenza polipeptidica

- tRNA: funzione di adattatori → legame con aminoacidi (aa-tRNA) e riconoscimento specifico codone di mRNA



### La struttura dei tRNA

1965, Holley: rende nota sequenza di basi di tRNA del lievito specifico per alanina

- 77 nucleotidi, 10 dei quali diversi da A,C,U e G (pseudouridina, ribotimidina, metilinosina, inosina, diemtil-guanosina, didrouridina, metil-guanosina)

Somiglianze tra tRNA:

- tutti sono costituiti da piccolo numero di **nucleotidi (73-93)**
- tutti con percentuale significativa di **basi insolite (modificazioni** enzimatiche delle 4 basi standard **post-trascrizionali)**
- tutti hanno in una parte della molecola sequenze di nucleotidi complementari a sequenze situate in altre parti della molecola
  - ripiegatura: **bidimensionalmente** appare come **un trifoglio**
    - **steli con basi appaiate**
    - **anse con basi non appaiate** (alta concentrazione **basi insolite** → non permettono formazione di legami idrogeno → possibili siti di riconoscimento per varie proteine)
    - **aminoacido** si attacca sempre **alla A all'estremità 3'**
    - **3 braccia** (D, anticodone, T) + **braccio variabile** (da 4 a 21 nucleotidi)
  - **struttura terziaria: due doppie eliche a forma di L**
    - basi invariati (in tutti i tRNA) importanti nel generare struttura terziaria → tutti i tRNA prendono parte alle stesse reazioni
- tutti hanno un **anticodone che interagisce specificatamente con i codoni dell'mRNA**
  - sequenza di **3 nucleotidi nell'ansa centrale** (7 nucleotidi compresi i 3 dell'anticodone)
  - estremità opposta del tRNA a quella a cui è attaccato aminoacido

61 codoni specificanti, ma cellula non possiede 61 tRNA diversi

- **intercambiabilità della base in terza posizione del codone** (aminoacido praticamente è specificato dai primi due nucleotidi)
- Crick: **ipotesi del vacillamento** → un **tRNA può riconoscere più di un codone**
  - richieste steriche tra tRNA e mRNA; forti nelle prime due posizioni e flessibili per la terza posizione
  - regole del vacillamento della terza posizione del codone (i nucleotidi in questione sono quello all'estremità 5' dell'anticodone e quello all'estremità 3' del codone):
    - **U** dell'anticodone può accoppiarsi con **A o G di mRNA**
    - **G** dell'anticodone può accoppiarsi con **U o C di mRNA**
    - **I (inosina, deriva da G)** dell'anticodone può accoppiarsi con **U, C, o A di mRNA**
  - es.: 6 codoni leucina → solo 3 tRNA

L'attivazione degli aminoacidi

importante che a ogni tRNA sia attaccato aminoacido corretto (isoaccettore)

aminoacidi legati covalentemente a estremità 3' di tRNA isoaccettore da enzima aminoacil-tRNA sintetasi

- specifiche **sintetasi** riconoscono certi **aminoacidi e tutti i tRNA appropriati**
- **riconoscimento tRNA** attraverso caratteristiche strutturali:
  - importanti **stelo accettore e anticodone**
  - presenza di **specifiche coppie di basi** (ad esempio, 3° G partendo da 5' → se coppia G-U, tRNA viene aminoacilato con alanina)
- enzima catalizza reazione a due tappe:
  - **1 – ATP + aminoacido → aminoacil-AMP + PPi (richiede energia)**
  - **2 – aminoacil-AMP + tRNA → aminoacil-tRNA + AMP (libera energia)**
  - PPi della prima reazione è idrolizzato a Pi → reazione spostata verso formazione prodotti
  - energia consumata durante sintesi proteina, ma non per formazione legami peptidici

- o nel secondo passaggio, se aminoacido è sbagliato, si attiva meccanismo di correzione bozze dell'enzima → recide legame tra tRNA e aa.
- aminoacido non ha ruolo diretto nel determinare dove verrà incorporato nel polipeptide
  - o Lipmann → altera aminoacido dopo che è stato legato a suo tRNA (tRNA caricato con cisterna → cisterna trasformata in alanina) → aminoacido, anche se sbagliato, viene incorporato nel polipeptide, perché anticodone del tRNA riconosce ancora il suo codone
    - specificità dell'incorporazione è determinata da tRNA, non da aminoacido

## Traduzione dell'informazione genetica

→ sintesi proteine

- sintesi più complessa della cellula: richiede aa-tRNA, mRNA, ribosomi, numerose proteine, cationi e GTP
- differenza traduzione procarioti/eucarioti: eucarioti hanno bisogno di più fattori proteici solubili
- 3 fasi:
  - o inizio della catena
  - o allungamento della catena
  - o terminazione

### Inizio

ribosoma si attacca in punto specifico dell'mRNA → **codone di inizio AUG**: pone **ribosoma nel giusto modulo di lettura**

Tappa 1: la subunità minore del ribosoma si porta al sito di inizio

inizio della sintesi richiede fattori di inizio (proteine solubili)

- **IF nei procarioti e eIF negli eucarioti**
  - o IF1, IF2, IF3 → legano subunità 30S
    - IF1: facilita attacco di subunità 30S a mRNA e impedisce che aa-tRNA si inserisca nel sito errato
    - **IF2: lega GTP** richiesta per legare primo aa-tRNA
    - IF3: previene che subunità 50S si leghi prematuramente a subunità minore

legame con codone AUG

- sequenza di **Shine-Dalgarno su mRNA a 5-10 nucleotidi prima del codone di inizio**
  - o complementare a sequenza di nucleotidi vicino a estremità 3' di rRNA 16S della subunità minore del ribosoma (GGAGGA)
    - interazione tra sequenze → attacco subunità 30S
- richiede IF1 e IF3

Tappa 2: il primo aa-tRNA si inserisce sul ribosoma

**AUG**: codone di inizio, specifica per **metionina** → sempre primo aminoacido inserito all'estremità N-terminale di catena polipeptidica nascente (nei procarioti, **N-formilmetionina**)

- nella maggior parte dei casi, metionina è **poi rimossa** enzimaticamente
- cellule possiedono 2 tRNA per metionina
  - o tRNA i/fMet → per inizio sintesi proteica
  - o tRNA fMet → residui interni di metionina

tRNA i/fMet entra nel complesso di preinizio legandosi sia al codone AUG dell'mRNA che a IF2

- rilascio di IF1 e IF3

Tappa 3: assemblaggio del complesso di inizio completo

**subunità maggiore (50S) si unisce al complesso**

**GTP** legato a IF2 è **idrolizzato**

- cambio conformazionale nel ribosoma → rilascio di IF2-GDP

## Inizio della traduzione negli eucarioti

trascritto primario (nucleo) → maturazione → trasporto nel citoplasma → traduzione

trasporto nel citoplasma: passaggio attraverso pori nucleari

- proteine sentinelle – controllano che esca solo mRNA maturo (marcato con certe proteine che vengono riconosciute dal poro)
  - controllo di capp binding protein (CBP) su cappuccio di metilguanosa
  - controllo di poli(A) binding protein (PBP)
  - controllo di proteine che marciano i siti in cui è avvenuto lo splicing

formazione di 2 complessi (ribosoma+tRNA – mRNA) - richiesti almeno 10 fattori di inizio

eIF1, eIF2, eIF3, eIF1A legano subunità 40S

- tRNA i/Met si inserisce in subunità legato con eIF2-GTP
- → complesso di preinizio 43S
  - può cercare estremità 5' di mRNA con cappuccio di metilguanosa

43S indirizzato verso mRNA da fattori di inizio presenti su mRNA

- eIF4E: si lega a cappuccio in 5' mRNA [→ CBP]
- eIF4A: si muove lungo estremità 5' di mRNA rimuovendo regioni a doppio filamento - elicasi
- eIF4G: collegamento tra estremità 5' incappucciata e estremità 3' poliadenilata di mRNA
  - converte mRNA lineare in messaggio circolare
  - sito soggetto a regolazione: inibito quando sostituito da 4EBP

43S si attacca e scorre su mRNA fino a sequenza riconoscibile di nucleotidi (5'-CCACCAUGC-3')

- quando raggiunge AUG → eIF2-GTP idrolizzato, eIF2-GDP è rilasciato e subunità maggiore (60S) si unisce al complesso

in mRNA euc non esiste Shine-Dalgarno: il primo AUG da 5' è quello di inizio

- subunità piccola si lega a eIF4E (CBP) – può effettuare scanning su mRNA grazie a idrolisi ATP
- eucarioti: 1 mRNA=1 proteina

## Il ruolo dei ribosomi

durante traduzione, vanno incontro a ciclo ripetitivo di cambiamenti meccanici (idrolisi GTP)

macchine programmabili: info su mRNA determina aa-tRNA

importante componente di rRNA:

- ruolo in selezione aa-tRNA
- assicura accuratezza
- lega fattori proteici
- polimerizza aminoacidi

struttura altamente irregolare (rigonfiamenti, lobi, canali, ponti)

- 3 siti di associazione per tRNA
  - sito A (aminoacidico)
  - sito P (peptidico)
  - sito E (exit)
- tRNA si legano sia a subunità minore che a subunità maggiore:
  - estremità dell'anticodone del tRNA → legame con subunità minore: decodificazione info presenti in mRNA
  - estremità di tRNA che porta aminoacido → legame con subunità maggiore: ruolo catalitico nella formazione del legame peptidico
- interfaccia tra le subunità: cavità spaziosa delimitata da RNA (a doppio filamento in sub. minore) → superfici di subunità presentano siti di legame per mRNA e tRNA
  - RNA → probabilmente unica componente di ribosomi primordiali
- sito attivo dove aminoacidi sono legati covalentemente è formato da RNA

- o porzione catalitica in fessura → protegge nuovo legame peptidico da idrolisi da parte del solvente acquoso
- a partire da sito attivo, **galleria attraverso subunità maggiore** → passaggio per **polipeptide nascente**
- proteine dei ribosomi. siti multipli per legame con RNA → stabilizzano struttura terziaria degli rRNA

### Allungamento

#### Tappa 1: selezione dell'aminoacil-tRNA

**tRNA iniziatore in sito P** → ribosoma può accettare **nuovo tRNA in sito A**

- nuovo aa-tRNA si deve legare con **EF-Tu [proc]/eEF1α [euc]** (fattore di allungamento proteico legato a GTP) → indirizza tRNA in sito A
- entrata nel sito è libera per tutti tRNA-Tu-GTP, ma solo quello con anticodone complementare a codone è intrappolato
  - o accoppiamento giusto riconosciuto da rRNA di sub. minore
  - o **se tRNA è giusto → idrolisi GTP → complesso Tu-GDP rilasciato → aa-tRNA su sito A**
    - fattore EF-Ts rigenera Tu-GTP da GDP

#### Tappa 2: formazione del legame peptidico

nel ribosoma presenti due aminoacidi legati ai loro tRNA → formazione di legame peptidico

- **gruppo amminico di tRNA in sito A reagisce con gruppo carbossilico di tRNA in sito P**
  - o tRNA di sito P è spostato e deacilato
  - o tRNA in sito A ha un dipeptide
  - o formazione del legame peptidico: spontanea
    - reazione **senza bisogno di energia**, catalizzata da peptidil trasferasi (molecola di rRNA di subunità maggiore del ribosoma → ribozima)

#### Tappa 3: traslocazione

ribosoma e mRNA si spostano uno rispetto all'altro

- **ribosoma si sposta di 3 nucleotidi su mRNA in direzione 5'→3'**
- spostamento del dipeptidil-tRNA da sito A a sito P (ancora legato con legami idrogeno a 2° codone mRNA)
- tRNA deacilato da sito P a sito E
- per **traslocazione** richiesto altro fattore di allungamento legato a GTP: **EF-G [proc]/eEF2 [euc]**
  - o accelerano reazione, ma in vitro può avvenire senza di essi

#### Tappa 4: rilascio di tRNA deacilato

**svuota il sito E**

per **ciascun ciclo** di allungamento → almeno **2 GTP idrolizzati** (1 per selezione aa-tRNA e 1 per traslocazione)

1 ciclo – 1/20 sec (maggior parte impiegato in scelta tRNA da citosol)

peptidil-tRNA si sposta su sito P mediante traslocazione → sito A nuovamente libero

→ ricomincia ciclo

mutazioni deleterie: aggiunta o rimozione di un nucleotide a mRNA – *scivolamento della cornice di lettura* → sequenze di aminoacidi completamente anormali (mutazioni acridine)

mRNA contiene segnali di ricodificazione che inducono ribosoma a cambiare il suo modulo di lettura, tornando indietro o andando avanti di un nucleotide

### Terminazione

**3** di 64 codoni → **stop**: non codificano per aminoacidi; **UAA, UGA, UGA**

richiesta presenza di fattori di rilascio **[proc]**

- **RF1** riconosce UAA e UAG



- RF2 riconosce UAA e UGA
- RF3 aumenta attività degli altri fattori

invece in euc:

- eRF1 e eRF3 → lavorano insieme per riconoscere tutti i codoni di stop
- mimetismo molecolare:** fattori di rilascio somigliano superficialmente a un tRNA → possono entrare nel sito A di ribosoma

- tripeptide interagisce con codone di stop

RF3 o eRF3 porta legato GTP

- idrolisi

traduzione completata: polipeptide completo si stacca da tRNA in sito P

- rilascio di RF e tRNA
- ribosoma si separa da messaggero
  - si dissocia in proprie subunità

mutazioni *nonsense* → mutazioni che producono codone di stop all'interno di un gene

- sintesi polipeptide parziale
- a volte, mRNA contenenti tali mutazioni sono tradotti una sola volta perché vengono riconosciuti e distrutti tramite un processo chiamato *decadimento-nonsense-mediato* (NMD)

Poliribosomi o polisomi

→ complesso di mRNA e ribosomi legati al filamento

i ribosomi si associano al codone di inizio → si muovono verso 3'

- appena si muovono da sito di inizio, altri ribosomi si attaccano

→ traduzione simultanea di stesso mRNA da parte di numerosi ribosomi

polisomi associati su faccia citoplasmatica di reticolo endoplasmatico

**Eucarioti → trascrizione nel nucleo, traduzione nel citoplasma**

**Procarioti → attività accoppiate – traduzione inizia su mRNA prima che questo sia stato completamente sintetizzato**

- direzione di sintesi mRNA è la stessa dei ribosomi

mRNA procarioti: policistronici → contengono al loro interno unità traduzionali diverse

- 1 unità=più proteine (presenti più codoni AUG → necessaria Shine-Dalgarno per riconoscimento)
- multicistroni=operoni

# Cap. 12 – Il nucleo e il controllo dell'espressione genica

Matteo Paolucci

Cellule possiedono meccanismi per esprimere informazioni geniche in maniera selettiva

## Il nucleo della cellula eucariote

contenuto del nucleo: massa di materiale viscoso e amorfo racchiusa da involucro nucleare (separazione tra nucleo e citoplasma)

all'interno (in interfase):

- cromosomi
  - presenti come fibre nucleoproteiche estese → cromatina
- matrice nucleare
  - rete fibrillare contenente proteine
- uno o più nucleoli
  - strutture di forma irregolare in cui avviene sintesi di rRNA e assemblaggio ribosomi
- nucleoplasma
  - sostanza fluida in cui sono disciolti i soluti del nucleo



## L'involucro nucleare

separazione materiale genetico da citoplasma → distinzione tra eucarioti e procarioti

involucro nucleare:

- 2 membrane cellulari
  - parallele una all'altra
  - distanti 10-50 nm
  - funzionano come barriera che impedisce il passaggio di ioni, soluti e macromolecole tra nucleo e citoplasma
- membrana nucleare esterna
  - tappezzata di ribosomi
  - in continuità con membrana RE
- Pori circolari
  - punti di fusione delle 2 membrane
  - pori contengono complessa associazione di proteine
  - cellule mammiferi: 3000 pori
- lamina nucleare
  - ricopre superficie interna dell'involucro nucleare
  - rete fibrillare
    - supporto strutturale
    - sito di attacco per fibrille cromatina alla periferia del nucleo
    - struttura reticolare continua che comprende filamenti orientati quasi perpendicolarmente
  - filamenti di 10 nm diametro – composti da lamine
    - membri della superfamiglia dei polipeptidi dei filamenti intermedi
      - integrità dei filamenti intermedie compongono la lamina è regolata da processi di fosforilazione e defosforilazione

## Struttura del complesso del poro nucleare e suo ruolo nello scambio nucleocitoplasmatico

pori → vie di passaggio attraverso barriera (involucro nucleare)

- involucro è centro di attività per movimento RNA e proteine in entrambe le direzioni tra nucleo e citoplasma
  - replicazione e trascrizione: partecipazione di numerose proteine che vengono sintetizzate nel citoplasma e trasportate nel nucleo
  - mRNA, tRNA e subunità ribosomiali: prodotte nel nucleo e trasportate nel citoplasma
  - snRNA si muovono in entrambe le direzioni
    - sintetizzati nel nucleo

- assemblati in RNP nel citoplasma
- rinviati nel nucleo (→ partecipano a maturazione mRNA)

particelle (anche materiali voluminosi) si muovono dal citoplasma al nucleo passando una alla volta attraverso il centro dei pori nucleari

struttura dei pori:

- complesso del poro nucleare (CPN)
  - apparato a forma di canestro che riempie il poro come un tappo
  - sporge sia verso il citoplasma che verso il nucleoplasma
    - canestro nucleare, tappo centrale trasportatore, 8 filamenti citoplasmatici
  - enorme: 30 volte la massa di un ribosoma
  - simmetria ottagonale
    - ripetizione di 8 volte di specifiche strutture
  - contiene da 30 a 50 proteine differenti: nucleoporine o nups
    - la maggior parte delle nucleoporine sono posizionate simmetricamente (presenti sia su lato citoplasmatico che nucleare)

soluti a basso peso molecolare → penetrano attraverso i pori per diffusione semplice

- passano attraverso raggi che connettono gli anelli del CPN

molecole più grandi – capacità di passaggio dipende da loro localizzazione normale

- proteine non nucleari restano nel citoplasma
- proteine nucleari entrano nel nucleo
  - nucleoplasmina (proteina nucleare) contiene breve segmento aminoacidico vicino a C-terminale → segnale di localizzazione nucleare (NLS) che consente alla proteina di passare attraverso i pori nucleari e di entrare nel nucleo
    - NLS classica: 2 brevi sequenze – aminoacidi positivi (es.: in antigene T)

→ trasporto di proteine nel nucleo è simile come principio a trasporto di proteine negli organelli

famiglia di proteine che funzionano come recettori di trasporto – carioferine

- trasportano macromolecole attraverso involucro nucleare
- all'interno della famiglia:
  - importine – da citoplasma a nucleo
  - esportine – da nucleo a citoplasma

importazione:

- proteina da trasportare con NLS si lega a recettore NLS nel citoplasma
  - recettore: eterodimero, solubile →  $\alpha/\beta$  importina
- recettore porta proteina su superficie esterna nucleo
- complesso recettore-proteina si aggancia a filamenti citoplasmatici che si estendono da anello esterno CPN
- filamenti citoplasmatici si ripiegano verso nucleo
  - trasportano complesso recettore-proteina a siti specifici di legame sul CPN
- cambio conformazione nel trasportatore → movimento proteina (+ recettore) attraverso poro
  - apertura canale acquoso al centro del trasportatore
- Ran-GTP nel nucleo
  - con GTP: forma attivata; con GDP: forma inattivata
  - cellula mantiene gradiente di Ran-GTP (concentrazione elevata nel nucleo e bassa nel citoplasma)
    - proteina Ran-GAP1 nel citoplasma promuove conversione in Ran-GDP, mantenendo bassi i livelli di Ran-GTP nel citoplasma

- proteina RCC1 nel nucleo converte Ran-GDP in Ran-GTP, mantenendo alti i livelli di Ran-GTP nel nucleo
- gradiente necessario per direzione del movimento di Ran-GTP
- complesso importina-proteina entrato nel nucleo incontra Ran-GTP
  - legame
    - disassemblaggio importina-proteina
      - proteina è rilasciata nel nucleoplasma
      - subunità  $\beta$  di importina (recettore NLS) ritrasportata nel citoplasma insieme a Ran-GTP (movimento secondo gradiente)
        - nel citoplasma, idrolisi GTP e distacco di Ran-GDP da subunità  $\beta$
        - Ran-GDP ritrasportato nel nucleo
      - subunità  $\alpha$  importina trasportata nel citoplasma tramite esportina

esportazione:

- poche informazioni
- traffico: mRNA, rRNA, tRNA – sintetizzati nel nucleo, ma agiscono nel citoplasma
  - RNA si muovono attraverso CPN come ribonucleoproteine RNP
    - componenti proteiche: sequenze aminoacidiche – segnali di esporto nucleare, NES
    - riconosciute da recettori di trasporto (esportine)
- mRNA sono legati nel nucleo da hnRNP → si muovono nel citoplasma
  - solo mRNA maturi vengono trasportati
  - Ran-GDP nel nucleo promuove assemblaggio (come Ran-GTP promuove disassemblaggio)
  - mRNA lasciano il nucleo come mRNA-hnRNP-esportina-RanGTP
    - nel citoplasma: idrolisi GTP
      - rilascio mRNA e proteine (hnRNP, RanGTP, esportine) tornano nel nucleo



## I cromosomi

si formano all'inizio della mitosi e scompaiono alla fine della mitosi

### Il compattamento del genoma

cellula umana: DNA

- 6 mld di paia di basi
- 46 cromosomi
  - corredo diploide di cromosomi non replicati

ciascun cromosoma: contiene singola molecola continua di DNA

- un paio di basi: 0,34 nm → 6mld=2m
- inoltre DNA nel nucleo lega acqua (6 molecole per paio di basi)

ma nucleo è di soli 10 $\mu$ m di diametro e deve rimanere accessibile a enzimi e proteine regolatorie

cromosomi sono costituiti da fibre: cromatina (DNA + proteine)

- proteine:
  - istoni
    - piccole proteine basiche
  - proteine non istoniche
    - gran numero di proteine molto diverse
    - funzioni strutturali, enzimatiche, regolatorie

*I nucleosomi: il primo livello di organizzazione dei cromosomi*

compattamento ordinato DNA eucariote dipende da istoni

- proteine basiche: molti aminoacidi basici (lisina, arginina)

- divisi in 5 classi a seconda del rapporto arginina/lisina
- ulteriormente diversificati da modificazioni post-traduzionali
  - fosforilazione
  - acetilazione
- sequenze degli istoni hanno subito poche variazioni durante evoluzione
  - istoni interagiscono con scheletro DNA, rimasto uguale negli organismi
  - altrimenti si perde funzionalità specifica (interazione con DNA e con altri istoni)
- struttura con regione globulare (piega istonica – 3  $\alpha$ -eliche) + coda N-terminale fuori da disco istonico

anni '70 – trattamento cromatina con nucleasi non specifiche

- frammenti di DNA lunghi 200 paia di basi o multipli di questa lunghezza
  - invece stesso trattamento su DNA nudo dà frammenti di lunghezza casuale
- DNA cromosomale è protetto da attacco enzimatico (ad eccezione di siti specifici presenti ad intervalli regolari della sua lunghezza)

Kornberg: DNA e istoni organizzati insieme in subunità ripetute → nucleosomi

nucleosomi:

- parte centrale (core)
  - 146 paia di basi superavvolto che gira per quasi 2 volte attorno ad un complesso di 8 molecole di istoni a forma di disco
    - complesso contiene 2 molecole di ciascuno degli istoni (H2A, H2B, H3, H4) → quattro eterodimeri (2x H2A-H2B + 2x H3-H4) che legano 30 bp ciascuno → ottamero
      - i due dimeri H3-H4 sono associati al centro del core
- istone H1 localizzato fuori dal core
  - istone di connessione (lega DNA di connessione – DNA linker – che lega 2 core successivi)
  - localizzata asimmetricamente – entra in contatto con una delle estremità del DNA (20 bp) e lascia l'altra non protetta
- ottamero + H1 interagiscono con 168 paia di basi
  - legame istoni/DNA – legami ionici tra fosfati (negativi) e arginina e lisina (positivi)
  - le due molecole entrano in contatto nel punto in cui il solco minore del DNA si affaccia internamente in direzione del nucleo istonico (ogni 10 bp)
    - in regioni comprese tra questi 2 punti, separate da spazi considerevoli
      - → accesso sul DNA dei fattori di trascrizione e altre proteine leganti il DNA
- capacità di autoassemblaggio

interazione istoni-DNA:

- strutturale
- indipendente da sequenza nucleotidica
  - ma istoni non posizionati casualmente:
    - certe porzioni di geni mantengono relazione invariabile con particelle centrali dei nucleosomi
    - es.: SV40 – particelle centrali nucleosomi disposte periodicamente ad eccezione di regione priva di istoni → sito che contiene origine di replicazione del cromosoma

fattori che influenzano localizzazione di nucleosomi lungo DNA

- legame di proteina non istonica ad uno specifico sito del DNA → influenza su posizione di nucleosomi in regioni adiacenti
- diversa capacità del DNA di piegarsi intorno ad un nucleo di istoni

- segmenti ricchi in A-T – in genere presenti dove il solco minore della doppia elica si affaccia verso il nucleo di istoni
- regioni ricche in G-C sono presenti nei siti in cui il solco maggiore si affaccia all'esterno

diversa capacità di curvatura di A-T e G-C

- nucleosomi tendono a formarsi in regioni dove alternanza di regioni ricche di A-T e G-C è ottimale

localizzazione nucleosomi è importante: determina se DNA è accessibile

formazione nucleosomi → primo livello di compattamento: stato a collana di perle

- spazio tra 2 nucleotidi=0,34 nm; paia di basi in nucleosoma=200 → se estese, DNA misurerebbe 70 nm; ma diametro nucleosoma è 10 nm
  - rapporto di compattamento di 7:1

*Livelli superiori di organizzazione della cromatina*

cromatina non esiste nello stato a collana di perle

- fibre di cromatina: se tagliate trasversalmente, visibili punti di 30 nm di diametro (3 volte un nucleosoma)
- aumento del rapporto di compattazione di 6 volte → complessivamente di 40 volte

formazione fibra di 30 nm:

- interazione tra molecole istoniche di nucleosomi vicini
  - coinvolgimento sia di istoni linker che istoni del core
    - se si leva H1, struttura si svolge diventando collana di perle
    - nuclei istonici di nucleosomi adiacenti interagiscono mediante le loro code lunghe e flessibili
      - coda H4 con N-terminale entra in contatto con dimero H2A-H2B
- modello a solenoide: organizzazione regolare elicoidale (6-8 nucleosomi per giro)

stadio di organizzazione successivo: fibre di cromatina si organizzano in serie di ampie anse superavvolte → domini

- anse di DNA generalmente iniziano e terminano con sequenze ricche in A-T associate a proteine che costituiscono impalcatura nucleare
  - tra proteine, topoisomerasi II → regola grado di superavvolgimento DNA
    - svolge molecole non caso in cui DNA di un'ansa risulti aggrovigliato
- proteine localizzate alla base delle anse potrebbero agire come isolatori che agiscono come isolatori che impediscono che la trascrizione di un gene di un dominio influenzi l'espressione di un gene in un dominio adiacente

anse di cromatina distese nel nucleo → non visualizzabili

ultimo stadio compattamento: cromosoma mitotico

- 1 μm di cromosoma mitotico contiene 1 cm di DNA – rapporto di compattamento di 10000:1

Eterocromatina ed eucromatina

fine mitosi → cromatina dei cromosomi mitotici si disperde (eucromatina)

- circa il 10% della cromatina rimane però in forma condensata e compatta anche durante interfase
  - osservabile alla periferia del nucleo
  - eterocromatina

in cellule incubate con trizio-uridina, ammassi di eterocromatina non vengono marcati

- attività trascrizionale dell'eterocromatina ridotta o nulla

2 categorie di eterocromatina:

- eterocr. costitutiva
  - rimane sempre nello stato condensato in tutte le cellule → DNA permanentemente silente

- localizzata in corrispondenza del centromero (anche intorno) e in altri siti specifici (braccio distale cromosoma Y e, nelle piante, nei telomeri)
- DNA: sequenze altamente ripetute – numero relativamente basso di geni
  - anche geni trasposti o traslocati in posizioni adiacenti a eterocromatina diventano inattivi → effetto di posizione (eterocr. modifica stato dei geni)
- eterocr. facoltativa
  - porzioni di cromatina che sono state specificatamente inattivate durante determinate fasi di vita dell'organismo
    - es.: inattivazione del cromosoma X nelle femmine
      - uno dei 2 cromosomi X è condensato sotto forma di ammasso di eterocromatina (corpo di Barr)
      - → assicura che maschi e femmine abbiano stesso numero di cromosomi X attivi (sintetizzano quantità equivalenti dei prodotti codificati da geni su cromosoma X) [X e Y: pochissimi geni in comune]

#### *In attivazione del cromosoma X*

1961, M. Lyon:

- condensazione di uno dei 2 cromosomi X in eterocromatina avviene in tutte le cellule di femmine di mammifero durante i primi stadi di sviluppo embrionale → inattivazione dei geni di tale cromosoma
- in attivazione del cromosoma X nell'embrione è un processo casuale (X materno e paterno hanno stesse possibilità di venire inattivati in qualsiasi cellula). Ogni X può essere attivato o inattivato diversamente in cellule vicine, ma cellule discendenti da queste inattiveranno stesso X di loro cellula madre
- riattivazione del cromosoma X eterocromatinico avviene nelle cellule germinali prima dell'inizio della meiosi (gameti ricevono 1 cromosoma X eucromatinico)

X paterno e materno possono contenere diversi alleli per uno stesso carattere → femmine=mosaici genetici (differenti alleli attivi in differenti cellule)

- colorazione a macchie dei gatti

inattivazione è promossa da una molecola di RNA non codificante trascritta da gene XIST su cromosoma X da inattivare

- RNA di XIST non diffonde nel nucleoplasma, ma si accumula lungo cromosoma prima dell'inattivazione
- XIST necessario per inattivare, ma non per mantenere inattivazione → mantenuta da mutilazione del DNA

#### La struttura del cromosoma mitotico

stato disperso cromatina (interfase) → favorisce replicazione e trascrizione

mitosi → cromatina in stato di condensazione massimo → favorisce trasmissione intero corredo intatto a ciascuna cellula figlia

cromosoma compattato: forma ben distinta

- determinata da lunghezza DNA di quel cromosoma e da posizione centromero

osservazione cromosomi mitotici:

- tecnica: cellule in divisione sono fatte scoppiare
  - cromosomi si adagiano sul fondo
  - cromosomi colorati con coloranti fluorescenti

cromosomi mitotici ordinabili in coppie di omologhi (23 nell'uomo)

- disposti in ordine crescente in base alla loro dimensione
- cariotipo

- colorazione a bande trasversali
  - bandeggio caratteristico per ciascun cromosoma

### *I centromeri*

ciascun cromosoma contiene regione nella quale le superfici esterne sono fortemente introflesse  
→ centromeri

- contengono eterocromatina costitutiva
- nell'uomo contengono sequenza ricca in AT di circa 171bp (DNA  $\alpha$ -satellite) in tandem – ripetuta migliaia di volte
- DNA centromerico lega proteine specifiche
  - proteine che fungono da siti di attacco per i microtubuli che separano cromosomi durante la divisione cellulare
  - proteine centromeriche sono molto più conservate rispetto a DNA centromerico a cui si legano
    - sequenze di DNA potrebbero non essere importanti nel determinare la struttura e la funzione del centromero

1/2000 nell'uomo nasce con ulteriore DNA: un cromosoma in più (minuscolo) → cromosoma marcatore

- alcuni cromosomi marcatori non contengono DNA  $\alpha$ -satellite, ma hanno costrizione primaria e centromero funzionale
  - cromosomi normalmente segregati in cellule figlie

→ proteine centromeriche riescono comunque a trovare un sito di legame centromero sempre nello stesso sito in tutte le cellule dell'individuo

- sito di attacco trasmesso a cromosomi figli

→ DNA  $\alpha$ -satellite non necessario per sviluppo centromero

eredità di questo tipo è detta epigenetica

- non tutte le caratteristiche ereditarie sono dipendenti dalle sequenze di DNA
- anche inattivazione crom. X è fenomeno epigenetico
  - i due X possono avere sequenze identiche, ma uno è attivato e l'altro no

### *I telomeri*

ogni cromosoma contiene molecola di DNA a doppio filamento, singola, continua  
ognuna delle 2 estremità contiene insolito tratto di sequenze ripetute → telomero

- cappuccio a ciascuna estremità
  - uomo: sequenza TTAGGG (dalle 500 alle 5000 volte)
- stessa sequenza ripetuta in tutti i vertebrati (non varia da specie a specie come altre sequenze conservate)
  - hanno conservato la funzione in tutti gli organismi
- identificate proteine che si legano specificatamente ai telomeri

DNA polimerasi – aggiungono nucleotidi all'estremità 3' di un filamento già esistente

- non iniziano sintesi filamento DNA

replicazione:

- inizia a estremità 5' di ogni filamento
  - sintesi di breve primer RNA (successivamente rimosso)

→ estremità 5' di ogni filamento neo-sintetizzato è mancante di un breve segmento di DNA presente all'estremità 3' del filamento complementare

- estremità 3' sporge oltre estremità 5' del filamento di neosintesi
  - non rimane come estremità non protetta → filamento sporgente è ripiegato nella porzione a doppio filamento del telomero a formare un'ansa (interagisce con uno dei due filamenti in un tratto precedente, scalzando uno dei 2 filamenti dall'altro per un breve tratto)
  - estremità telomero protette da proteine che riconoscono DNA per eventuali riparazioni

problema della replicazione terminale

- ci si aspetta che i cromosomi diventino sempre più corti



1984: scoperta telomerasi

- aggiunge unità ripetute all'estremità 3' del filamento sporgente
  - agisce su 3' libere quando ancora non hanno formato ansa
- dopo allungamento 3', DNA polimerasi utilizza nuovo segmento 3' come stampo per riportare estremità 5' del filamento complementare alla precedente lunghezza

telomerasi:

- trascrittasi inversa
  - sintetizza DNA usando RNA come stampo
- contiene RNA che funziona da stampo (AAUCCC)

ruolo dei telomeri nel cromosoma:

- necessari per completa replicazione dei cromosomi
- formano cappuccio che protegge cromosomi da nucleasi e altri fattori destabilizzanti
- facilitano interazione tra estremità dei cromosomi e involucro nucleare in alcuni tipi di cellule
- impediscono che estremità dei cromosomi si fondano tra loro

dopo molte duplicazioni, riduzione lunghezza dei telomeri

- es.: in cellule somatiche (ma non germinali) di individui anziani

accorciamento dei telomeri avviene perché la maggior parte delle cellule normali di mammifero è priva di telomerasi → incapace di impedire accorciamento estremità

- con ogni divisione cellulare, telomeri si accorciano
  - accorciamento fino a punto critico, "crisi"
    - cellule mostrano notevoli anomalie cromosomiche e smettono di dividersi

invecchiamento potrebbe essere prevenuto con maggiore espressione telomerasi

- ma accorciamento telomeri protegge da tumori
- cellule tumorali maligne sono in grado di dividersi ripetutamente senza andare incontro a morte cellulare
  - 90% tumori umani è costituito da cellule che contengono telomerasi attiva
  - eccessiva espressione enzima "immortalizza" cellule, ma telomerasi da sola non è in grado di indurre le cellule a diventare maligne



### Il nucleo come organello organizzato

analisi del nucleo: masse disperse di cromatina + nucleolo/i irregolare

nuove tecniche – localizzate specifiche sequenze di DNA ed RNA all'interno del nucleo in interfase

- fibre di cromatina non sono sparse nel nucleo, ma sono concentrate in domini specifici;
  - domini di cromosomi differenti non si sovrappongono
    - es.: cromatina di cromosoma 18 vicino a periferia, di cromosoma 19 centrale

differenze di localizzazione possono essere associate a diversi livelli di attività dei cromosomi

- più cromosoma ha sequenze codificanti che vengono trascritte, più è centrale
  - es.: cromosoma X inattivo è localizzato alla periferia, cromosoma X attivo situato internamente
- parti diverse dello stesso cromosoma (centromeri, telomeri) possono essere localizzati in punti diversi

altro tipo di organizzazione nucleare - fattori proteici coinvolti nello splicing del pre-mRNA

- macchinario di splicing all'interno di 20-25 domini irregolari: speckles (macchioline)
  - speckles funzionano come depositi dinamici che forniscono i fattori di splicing necessari per impiego in siti di trascrizione vicini

rete di filamenti complessa ed interconnessa costituisce la matrice nucleare

- ordina componenti nucleo (nucleoli, speckles)

### La matrice nucleare

nuclei isolati trattati (detergenti non ionici + sali concentrati → rimozione lipidi, istoni e proteine non istoniche della cromatina)

- DNA come alone intorno a residuo nucleare
  - se filamenti DNA digeriti da DNasi → struttura rimanente con stessa forma del nucleo – composta da rete di sottili fibrille contenenti proteine che si intersecano: matrice nucleare

matrice nucleare

- funge da scheletro – mantiene forma nucleo
  - impalcatura sulla quale si organizzano le anse di cromatina
  - sito di ancoraggio per molti dei complessi coinvolti nelle diverse attività del nucleo
    - trascrizione, processamento RNA, replicazione
- cellule marcate → tutto acido nucleico appena sintetizzato è associato con fibrille della matrice

### Il controllo dell'espressione genica nei procarioti

cambiamenti in composizione chimica ambiente → determinati composti possono essere presenti o assenti

- cambiamenti in cellula batterica

es.: trasferimento di coltura batterica da mezzo minimo a:

- mezzo con lattosio
  - lattosio: disaccaride – glucosio + galattosio
  - degradazione ossidativa → intermedi metabolici + energia
  - passaggi catabolismo:
    - idrolisi legame  $\beta$ -galattosidico tra i 2 zuccheri
      - catalizzata da  $\beta$ -galattosidasi
  - in condizioni minime: no lattosio → non c'è bisogno di galattosidasi (nella cellula ci sono 5 copie enzima e 1 dell'RNA corrispondente)
  - in presenza di lattosio: indotta sintesi dell'enzima
    - in pochi minuti enzima presente 1000 volte di più
      - minuti: aggiunta lattosio → inizia sintesi mRNA → traduzione (enzima); se lattosio è sottratto dal mezzo, si blocca immediatamente sintesi mRNA, viene degradato mRNA presente, concentrazione enzima rimane costante
- mezzo con triptofano
  - triptofano: necessario per sintesi proteine
  - in assenza nel mezzo, batterio deve sintetizzarlo → spesa energetica
    - contenuti enzimi e mRNA necessari
  - disponibile nel mezzo: cellule non hanno più bisogno di sintetizzarlo
    - si blocca produzione di enzimi → geni sono repressi



### L'operone batterico

nei batteri, i geni che codificano per una determinata via metabolica sono generalmente raggruppati insieme nel cromosoma in un complesso funzionale chiamato operone

- geni di un operone sono controllati da stesso meccanismo
- struttura operone:
  - serie di geni strutturali
  - un gene regolatore
  - 2 regioni con funzioni di promotore e operatore

geni strutturali

- codificano per gli enzimi
- disposti uno dopo l'altro – RNA polimerasi si muove da uno al successivo
  - trascritti in un unico mRNA, poi tradotto in polipeptidi distinti
    - → accensione di un gene accende anche gli altri geni dell'operone

promotore

- sito in cui RNA polimerasi si lega a DNA prima della trascrizione

operatore

- accanto o sovrapposto al promotore
- sito di legame per proteina repressore

repressore:

- proteina regolatrice dei geni – in grado di riconoscere una sequenza nucleotidica specifica del DNA e di legarsi con alta affinità

gene regolatore

- codifica per la proteina repressore

il controllo dell'espressione dell'operone è dovuto al repressore

- quando il repressore si lega all'operatore → promotore non è disponibile per la polimerasi → trascrizione dei geni strutturali è spenta
- capacità del repressore di legarsi all'operatore (e inibire trascrizione) dipende da conformazione proteina
  - conformazione regolata allostericamente da composto chiave della via metabolica (es.: lattosio o triptofano); a seconda della concentrazione di questo, operone risulta attivo o inattivo

L'operone lac

regola produzione enzimi del metabolismo del lattosio

**operone inducibile** → presenza del metabolita chiave (lattosio) induce trascrizione dei geni strutturali

- 3 geni strutturali in tandem (gene z →  $\beta$ -galattosidasi; gene y → galattosio permeasi – favorisce entrata lattosio in cellula; gene a → tiogalattoside acetiltrasferasi)

se il lattosio è presente nel mezzo

- entra nella cellula → si lega al repressore
  - cambio conformazione repressore → incapace di legarsi a DNA dell'operatore
- geni strutturali vengono trascritti → lattosio catabolizzato

lattosio agisce come **induttore** (repressore si lega a DNA solo in sua assenza)

- concentrazione del lattosio in cellula comincia a diminuire → lattosio si dissocia da repressore → repressore si lega ad operatore
  - blocco polimerasi – trascrizione operone viene spenta

*Il controllo positivo mediante AMP ciclico*

operoni lac e trp sotto controllo negativo (interazione proteina-DNA inibisce espressione)

operone lac anche sotto controllo positivo – effetto del glucosio

- batteri che crescono in mezzo con glucosio e lattosio, ignorano il lattosio
  - metabolizzano solo glucosio
    - glucosio determina soppressione di altri enzimi catabolici come la  $\beta$ -galattosidasi

si scopri che concentrazione di cAMP è correlata a presenza di glucosio nel mezzo:

- maggiore concentrazione di glucosio, minore concentrazione di cAMP
  - se si aggiunge cAMP in presenza di glucosio nel mezzo → sintesi enzimi catabolici normalmente assenti
    - cAMP annulla effetto glucosio → nei procarioti agisce legando una proteina: proteina recettore del cAMP (CRP)
      - CRP da sola non lega DNA
      - complesso cAMP-CRP riconosce e lega sito nell'operone lac
        - cambio conformazionale nel DNA e trascrizione dell'operone da parte della RNA polimerasi
- cAMP-CRP necessario anche quando lattosio è presente e repressore è inattivo se i livelli di glucosio sono elevati, cAMP non è sufficiente per trascrizione

regione del promotore: sito legame cAMP-CRP → sito legame RNA polimerasi → operatore

L'operone trp

**operone reprimibile** → repressore non è in grado di legare operatore da solo

- repressore è attivo (lega DNA) quando interagisce con fattore specifico **co-repressore**  
→ triptofano
  - in assenza di triptofano, operatore disponibile per legare RNA polimerasi  
→ produzione enzimi per sintesi triptofano (diventano non necessari quando triptofano è presente nel mezzo → co-repressore → blocco trascriz)

## Il controllo dell'espressione genica negli eucarioti

genoma possiede molte informazioni e ampia varietà di stati differenziativi

molti tipi differenti di cellule → ogni tipo richiede diverse proteine per attività specifiche

- ma differenziamento non porta perdita di informazioni: cellule differenziate mantengono anche i geni necessari per formazione di altri tessuti
  - singole cellule isolate da piante possono essere indotte a riformare pianta completa con tutti i tipi cellulari

nuclei di cellule animali possono sostenere sviluppo di un nuovo individuo

- 1997 Wilmut – clonazione pecora Dolly
  - fusione cellulare di:
    - cellula uovo non fecondata privata dei suoi cromosomi
    - cellule in coltura derivanti da ghiandola mammaria di pecora adulta  
→ trapianto di nucleo di cellula adulta a cellula uovo senza materiale genetico
      - cellula uovo si sviluppa normalmente (agnello possiede tutte cellule differenziate)

→ nuclei contengono tutta l'informazione necessaria per il differenziamento

- differenziamento non fa perdere materiale genetico → repressione dei geni caratteristici degli altri tipi cellulari

cellula umana: 6 mld di bp → diversi milioni di polipeptidi

- ma in realtà codifica solo per 30000 proteine
  - di questi, 5000 sono sintetizzati in ogni momento in ogni cellula del corpo (geni house-keeping)
  - in più ogni cellula contiene proteine specifiche del suo stato differenziativo
    - es: globulo rosso – emoglobina è il 95% della composizione proteica, ma geni per subunità emoglobina sono meno di un milionesimo del DNA della cellula
      - compito cellula: trovare questa minima quantità nel DNA e regolare espressione per far sì che produzione di questi pochi polipeptidi sia maggiore attività sintetica della cellula

regolazione dell'espressione genica negli eucarioti – 3 livelli

- controllo a livello della trascrizione
  - quando e quanto spesso un particolare gene è trascritto
- controllo a livello della maturazione (processing)
  - determinano via attraverso la quale il pre-mRNA matura e viene tradotto
- controllo a livello della traduzione
  - quando, quanto frequentemente e per quanto tempo un particolare mRNA deve essere tradotto



### Controllo a livello della trascrizione

trascrizione differenziale geni

- geni differenti espressi in ogni momento e in ogni stadio dello sviluppo
- geni differenti in tessuti differenti e in cellule sottoposte a diversi stimoli

studi condotti con il DNA microarray (DNA chips)

- consente immagine dei geni espressi in popolazione cellulare in un dato momento

preparazione DNA microarray

- frammenti di DNA (PCR, clonaggio DNA) → singoli geni, ognuno in ogni pozzetto piastra
- trasferimento DNA (singoli geni) su un vetrino

preparazione cDNA:

- mRNA nelle cellule vengono purificati → convertiti in cDNA marcati con fluorescenza
  - cDNA provenienti da un tipo di terreno (es. glucosio) marcati in verde
  - cDNA provenienti da altro terreno (es. etanolo) marcati in rosso
- due popolazioni di cDNA sono unite e incubate con il vetrino

analisi del vetrino

- ogni punto (spot) del microarray che mostra fluorescenza rappresenta un gene trascritto nelle cellule in analisi

cellule di lievito

- in glucosio → energia da glicolisi e fermentazione; glucosio convertito in etanolo
- in etanolo → fosforilazione ossidativa

necessitano di enzimi diversi

- spot verdi o rossi: enzimi specifici; spot non colorati: geni non trascritti; spot gialli: geni trascritti in entrambi
- intensità del segnale di fluorescenza indica quantità di mRNA presente nelle cellule (proporzionale) – concentrazione di mRNA può variare di 100 volte
- variazioni delle concentrazioni nel corso dell'esperimento:
  - glucosio è rapidamente metabolizzato → scomparsa zucchero in poche ore
  - etanolo prodotto da fermentazione glucosio; gradualmente metabolizzato nei giorni successivi (induzione e poi repressione enzimi ciclo degli acidi tricarbos.)

Ruolo dei fattori di trascrizione nella regolazione dell'espressione genica

controllo trascrizionale regolato da molte proteine → fattori di trascrizione

2 classi

- fattori di trascrizione generali
  - si legano a regione del promotore in associazione con RNA polimerasi
- fattori di trascrizione specifici
  - si legano a diversi siti regolatori di particolari geni e ne stimolano o inibiscono trascrizione

difficile visione unitaria dei meccanismi di controllo

- un singolo gene può essere controllato da molti siti regolatori diversi (→ differenti proteine regolatorie)
- singola proteina di legame al DNA può legarsi a numerosi siti nel genoma (→ controlla espressione di diversi geni)

controllo è influenzato da molti fattori

- affinità dei fattori di trascrizione per particolari sequenze di DNA
- capacità dei fattori di trascrizione legati a sequenze vicine di agire in maniera cooperativa
- cellule esposte a differenti stimoli rispondono sintetizzando diversi fattori di trascrizione che si legano a differenti siti del DNA
  - grado di trascrizione di un gene dipende da combinazione dei fattori legati e elementi di regolazione a monte

gene PEPCK – fosfoenilpiruvato carbossichinasi → enzima della gluconeogenesi (da piruvato a glucosio) – sintetizzato nel fegato quando i livelli di glucosio sono bassi

- livello di sintesi mRNA controllato da diversi fattori
  - inclusi ormoni coinvolti nella regolazione del metabolismo dei carboidrati

3 punti nella regolazione del gene PEPCK: 1- funzioni di sequenze regolatorie 2- fattori di trascrizione 3- via di segnalazione che attiva espressione selettiva

- numerose sequenze regolatorie del DNA a monte del gene
  - sequenza regolatoria più vicina: TATA Box (componente più importante promotore)
    - da TATA box a sito inizio trascrizione: rate fondamentale del promotore
      - sito di assemblaggio del complesso di pre-inizio (RNA polimerasi II + fattori generali)
  - a monte di TATA box, altre 2 sequenze promotrici: CAAT box e GC box legano fattori di trascrizione
    - TATA → determina sito inizio
    - CAAT e GC → regolano frequenza con cui polimerasi trascrive il gene vicinanza a sito di inizio (100-150 bp) → elementi prossimali del promotore
- individuazione sequenze regolatorie tramite:
  - mappatura per delezione: delezioni in diversi punti promotore
    - o effetto ridotto o nullo, oppure trascrizione si riduce notevolmente → delezione ha toccato uno dei 3 box
  - DNA footprinting: fattori di trascrizione legati a DNA → protezione da digestione
    - DNA trattato con DNasi → distruzione parti non protette da fattori → identificate sequenze che legano fattori
- fattori di trascrizione → attivatori o repressori; possono stimolare o inibire trascrizione

#### Attivazione della trascrizione negli eucarioti

ormoni che influenzano gene PEPCK: insulina, ormone tiroideo, glucagone, glucocorticoidi

- svolgono azione attraverso specifici fattori di trascrizione che legano il DNA
  - fattori si legano a regioni accanto a PEPCK → siti: elementi di risposta glucocorticoidi → ormoni steroidei (cortisolo) sintetizzati da ghiandola surrenale in risposta a stress
- stimolano espressione PEPCK legandosi a elementi di risposta ai glucocorticoidi (GRE)
  - ormoni entrano in cellula → si legano a recettore → cambiano conformazione recettori → esposizione segnale di localizzazione nucleare → traslocazione del recettore nel nucleo
    - complesso recettore-ormone lega sequenza GRE → attivazione gene
    - stessa sequenza GRE si trova a monte di geni diversi su diversi cromosomi → aumento concentrazione glucocorticoidi attiva simultaneamente tutti i geni necessari per risposta a stress

GRE e altri elementi di risposta sono considerati parte del promotore → elementi del promotore distali

espressione geni può essere controllata anche da elementi molto più distanti: enhancer

- possono essere spostati da una zona all'altra del DNA e essere invertiti (ruotati di 180°) senza che fattori a loro legati perdano capacità di stimolare trascrizione
- rimozione enhancer → riduzione trascrizione di 100 volte
- localizzati a migliaia di basi a monte o a valle del gene (es.: geni  $\beta$ -globina)
- stimolano trascrizione influenzando eventi che si verificano nella parte fondamentale del promotore
  - portati vicino a queste parti grazie a formazione ansa del DNA
    - anse si formano per interazione con proteine di legame
- enhancer interagisce con suo promotore e non con altri nonostante anse
  - complessi enhancer/promotori sono isolati gli uni dagli altri mediante sequenze insulator → legano proteine che impediscono all'enhancer di interagire con sequenze da una certa distanza in poi

fattori di trascrizione legati a enhancer – 3 modelli di azione:

- fattore può reclutare fattori di trascr. generali (GTF) e RNA pol II alla parte fondamentale del promotore → assemblaggio complesso pre-inizio
- fattore può stabilizzare macchinario di trascrizione già assemblato su promotore e stimolare inizio continuo di trascrizione
  - TFIID (un GTF) costituito da diverse subunità TAF → fattore influenza eventi sul promotore grazie a interazione con TAF
- maggior parte dei fattori non interagisce direttamente con proteine del macchinario di trascrizione → influenzano promotore grazie a intermediario: coattivatore che non lega DNA
  - coattivatori sono presenti nel nucleo; enormi, costituiti da 15-20 subunità
  - es. di coattivatori: DRIP/TRAP, SRB/MED, CRSP, p160/NCoA, NAT, CBP/p300
  - alcune subunità condivise da più coattivatori, altre sono specifiche
  - ciascun coattivatore è in grado di operare con diversi fattori di trascrizione
  - alcuni coattivatori necessari per convertire cromatina da stato inaccessibile a uno più accessibile

### La struttura dei fattori di trascrizione

fattori di trascrizione contengono almeno 2 domini

- dominio di legame al DNA – lega specifica sequenza
- dominio di attivazione – attiva trascrizione interagendo con altre proteine
- molti contengono superficie che promuove legame con altra proteina identica o simile → formazione dimero

### *Il recettore per i glucocorticoidi*

glucocorticoidi promuovono conversione aminoacidi in glucosio e sua captazione da parte del cervello → situazioni di stress

recettore per i glucocorticoidi (GR) – di famiglia di recettori con origine comune

3 domini distinti:

- dominio per il ligando → ormone steroideo
- dominio di legame a DNA → riconosce e lega sequenza specifica
- dominio di attivazione → si lega ad altre proteine e attiva trascrizione

sequenza che lega GR: 5'-AGAACAnnnTGTTCT-3'

(GRE) 3'-TCTTG TnnnACAAGA-5'

- sequenza simmetrica → palindromo (stessa sequenza in direzione 5'→3')
- 2 precise sequenze separate da 3 nucleotidi non definiti
- natura doppia GRE importante → GR legano DNA per formare dimeri – ciascuna subunità dimero si lega ad una metà della sequenza

ciascuna subunità GR contiene 2  $\alpha$ -eliche perpendicolari tra loro

- una delle due è l'elica di riconoscimento (verso solco maggiore DNA → riconosce e lega sequenze GRE)
  - altra  $\alpha$ -elica media legame con altra subunità → formazione dimero
- dimero con 2 eliche di riconoscimento in 2 solchi maggiori adiacenti del DNA

### I motivi dei fattori di trascrizione

domini che legano DNA raggruppabili in classi – membri delle classi possiedono motivi simili che interagiscono con DNA

maggior parte dei motivi contiene  $\alpha$ -elica inserita nel solco maggiore dove riconoscono sequenza legame tra proteina e DNA → forze di Van der Waals, legami ionici e ponti idrogeno

motivi più comuni: zinc finger (dita di zinco), helix-loop-helix (elica-ansa-elica), leucine zipper (chiusura lampo a leucina), HMG box

### *Il motivo zinc finger*

ione zinco in ciascun dito – coordina a 2 cisteine e 2 istidine

- residui di cisteina fanno parte di foglietto  $\beta$  a due filamenti
- residui di istidina fanno parte di  $\alpha$ -elica sul lato opposto del dito

proteine posseggono un certo numero di dita che agiscono indipendentemente

- distanziate tra loro per estendersi all'interno di solchi maggiori successivi

TFIIA → 9 zinc finger (anche Egr e GATA sono zinc finger)

intelaiatura strutturale per molte sequenze aminoacidiche diverse in grado di riconoscere diversi tipi di sequenze nel DNA

*Il motivo helix-loop-helix (HLH)*

2 segmenti  $\alpha$ -elica separati da ansa interposta tra essi

- un'elica lega DNA
- altra elica forma dimero

dominio HLH preceduto da tratto di aminoacidi basici (bHLH)

- catene laterali positive contattano DNA → determinano specificità di sequenze del fattore di trascrizione
- bHLH sono presenti come dimeri
  - 2 subunità codificate da geni differenti → eterodimero (aumenta la quantità di fattori diversi che possono essere generati da numero limitato di polipeptidi → da 5 polipeptidi, 32 eterodimeri:  $2^5=32$  sequenze diverse riconoscibili) – probabilmente combinazioni sono più limitate (vedi formazione eterodimeri di integrina)

fattori di trascrizione con motivo HLH – ruolo nel differenziamento di alcuni tessuti (muscolo scheletrico) e ruolo nel controllo della proliferazione cellulare (implicazione in formazione certi tumori → traslocazione cromosomica)

*Il motivo leucine zipper*

residui di leucina presenti ogni 7 aminoacidi lungo  $\alpha$ -elica di 30-40 residui

- $\alpha$ -elica: passo di 3,5 residui → tutte le leucine si affacciano su stesso lato
- 2  $\alpha$ -eliche si possono unire a formare colied-coil con leucine addossate
  - leucine zipper presenti come dimeri

lega DNA mediante tratto di aminoacidi basici su un lato dell'elica → bZIP

- eliche importanti per formare dimero
- tratti basici importanti per legami con DNA

es.: AP1 – eterodimero (c-fos + c-jun) ruolo in proliferazione cellulare

*Il motivo HMG box*

scoperto in gruppo di proteine detto High Mobility Group

3  $\alpha$ -eliche in struttura a boomerang in grado di legare DNA

fattori di trascrizione che contengono HMG sono definiti "architetonici"

- attivano trascrizione legando DNA e promuovendo interazione con altri fattori vicini

SRY – ruolo chiave nel differenziamento sessuale dell'uomo (mutazioni → inversione sessuale)

UBF – attiva trascrizione di rRNA svolta da RNA polimerasi I

- si lega a RNA sotto forma di dimero (10 HMG box)
- HMG distorcono elica (inserimento di catena laterale di residuo di isoleucina tra una specifica coppia di basi) → formazione ansa attorno a proteina
- due sequenze di DNA lontane sono avvicinate → possono essere legate in modo cooperativo da più fattori di trascrizione

La repressione della trascrizione negli eucarioti

meccanismi regolatori negativi

- proteine repressori → si legano a elementi del promotore, bloccando assemblaggio complesso di pre-inizio

alcuni fattori di trascrizione agiscono come repressori per alcuni geni e come attivatori per altri

- GR può legare GRE negativi (nGRE) che inibiscono la trascrizione del gene associato



trascrizione di un particolare gene dipende da bilancio tra fattori regolatori positivi e negativi in ogni momento (sia nei procarioti che negli eucarioti)

regolazione della trascrizione (oltre ai fattori di trascrizione) può avvenire anche attraverso modificazioni del DNA o mediante cambiamento organizzazione DNA nei nucleosomi

#### *Il ruolo della metilazione del DNA*

1 nucleotide ogni 100 contiene gruppo metile aggiunto legato a carbonio 5 di citosina

- aggiunta catalizzata da metiltrasferasi codificati da geni DNMT

metilazione → etichetta: identificazione e particolare utilizzo regione DNA

nei mammiferi, i gruppi di metilcisteina fanno parte di un dinucleotide 5'-CpG-3' all'interno di sequenze simmetriche

- sequenze concentrate in isole ricche di CG, spesso all'interno o in vicinanza di un promotore

metilazione fortemente correlata a repressione genica

- metilazione del DNA serve a mantenere gene in stato inattivo piuttosto che come meccanismo per inattivazione iniziale
  - inattivazione cromosoma X avviene prima dell'onda di metilazione del DNA che mantiene represso cromosoma
  - proteine MeCP2 e MBD1 riconoscono e legano citosine metilate → inibizione trascrizione: richiamano altre proteine che convertono cromatina in stato inattivo

inibizione di trascrizione non è irreversibile → variazione di livelli di metilazione durante la vita di un mammifero

- primo cambiamento nello stato di metilazione:
  - prime divisioni zigote → enzimi scorrono lungo DNA e rimuovono gruppi metilici ereditati
- embrione si impianta nell'utero
  - onda di nuove metilazioni – stabilito schema di metilazione in ogni cellula trasmesso a cellule figlie (mantenimento della metilazione)
  - promotori per geni tessuto-specifici (come  $\gamma$ -globina) vengono selettivamente demetilati prima di differenziamento

metilazione non è universale (no in lievito e invertebrati)

#### *Imprinting genomico*

peculiare dei mammiferi

cromosomi ereditati dal padre e dalla madre non sono funzionalmente equivalenti

- durante lo sviluppo precoce, determinati geni sono attivi o inattivi a seconda che provengono da spermatozoo o da oocita
  - fattore di crescita fetale IGF2 attivo solo nel cromosoma trasmesso dal padre
  - gene per canale potassio (KVLQT1) attivo solo nel cromosoma trasmesso dalla madre

→ geni imprinted in base a loro origine materna o paterna

- fenomeno epigenetico (differenze tra alleli ereditati da un genitore o dall'altro non sono basate su sequenza DNA)
- nei mammiferi almeno 100 geni imprinted soggetti a espressione differenziale

geni diventano imprinted grazie a metilazione selettiva del DNA di uno dei 2 alleli

- versioni materna e paterna differiscono di molto nel grado di metilazione
- topi senza metiltrasferasi non mantengono lo stato imprinted dei geni ereditati

stato di metilazione dei geni imprinted non è alterato da demetilazioni e rimetilazioni nell'embrione

- stessi alleli inattivi da uova a tessuto adulto

eccezione: cellule germinali → imprinting ereditato dai genitori viene eliminato durante lo sviluppo precoce e ristabilito quando l'individuo produce i propri gameti

alterazioni nel modello di imprinting (soprattutto su cromosoma 15) → malattie genetiche rare

- sindrome di Prader-Willi (PWS) – delezione nel cromosoma paterno di regione contenente geni imprinted
  - cromosoma paterno: delezione geni
  - cromosoma materno: versione imprinted inattiva di stessi geni  
→ individuo manca di copia funzionale del gene
- allele non subisce imprinting durante formazione gameti → ambedue gli alleli della progenie sono attivi

#### *Struttura della cromatina e trascrizione*

nucleo di cellula eucariote: DNA non nudo ma all'interno dei nucleosomi

- come interagiscono proteine non istoniche (fattori di trascrizione, polimerasi..) con DNA strettamente associato a nuclei istonici?
- incorporazione di DNA in nucleosomi inibisce trascrizione

inizio trascrizione → assemblaggio grande complesso proteico (GTF + RNA pol) → nucleosomi bloccano assemblaggio del complesso a livello della parte fondamentale del promotore

esistono proteine che scrutano regioni bloccate da nucleosomi → consentono accesso a DNA  
geni attivamente trascritti sono associati ad istoni più acetitati rispetto agli istoni associati a geni inattivi

- ogni molecola istonica possiede coda N-terminale flessibile al di là dell'elica di DNA
- i gruppi acetile vengono aggiunti a specifici residui di lisina al N-terminale da enzimi istone acetiltransferasi (HAT)

acetilazione – 2 funzioni:

- neutralizzazione della carica positiva della lisina
  - riduzione forza di interazione tra DNA e istone
- destabilizzazione delle interazioni tra estremità istone e proteine coinvolte nel mantenimento della struttura altamente ordinata della cromatina  
→ aumento accesso a DNA → assemblaggio complesso pre-inizio facilitato

coattivatori (legano fattori trascrizione a monte a macchinario trascrizionale) possiedono attività HAT

- in questo modo fattori di trascrizione (come recettori dei glucocorticoidi) si possono legare a elementi di risposta anche quando DNA è avvolto in nucleosomi
  - GR legato a GRE → recluta coattivatore (CBP)
  - attività HAT coattivatore → acetilazione nucleo istonico legato a promotore DNA → rilascio o indebolimento
  - il promotore è ora accessibile a GTF e RNA polimerasi (complesso pre-inizio)
  - dopo inizio trascrizione, RNA polimerasi può trascrivere DNA impacchettato nei nucleosomi

CBP: coattivatore nella trascrizione di un'ampia varietà di geni

- alcuni virus tumorali inattivano CBP
- traslocazioni cromosomiche che coinvolgono CBP → leucemia mieloide

oltre all'acetilazione, presenti altri meccanismi per rendere più accessibile DNA

- complessi di rimodellamento della cromatina
  - utilizzano energia rilasciata da idrolisi ATP per rompere nucleosomi e consentire il legame promotore/fattori trascrizione
  - membri famiglia SWI/SNF – complesso reclutato su promotore grazie a fattori di trascrizione legati a regioni a monte dei siti regolatori

agiscono in 2 modi

- cambiano conformazione di particella centrale nucleosoma (rottura legami DNA-istone) → DNA parzialmente svolto, siti di riconoscimento più accessibili
- promuovono mobilità ottamero istonico → scorre lungo DNA esponendo sequenze prima coperte

- movimento istoni inibito da istoni linker → rimosso da cromatina dai complessi di rimodellamento
    - reclutati dagli attivatori trascrizionali (GR) e dai coattivatori (CBP) per rendere promotore più accessibile a macchinario trascrizionale
- acetilazione o rimodellamento cromatina – cromatina trascrizionalmente attiva

proprietà:

- maggiormente accessibile a enzimi che digeriscono DNA (DNasi)
  - tagliano DNA in siti specifici: siti di ipersensibilità a DNasi I
  - siti di ipersensibilità in regioni regolatorie di geni attivamente trascritti
    - regioni in cui i nucleosomi sono stati rimossi
- stato di acetilazione cromatina è proprietà dinamica: enzimi che aggiungono o rimuovono gruppi acetile
  - rimozione: enzima istone deacetilasi (HDAC)
  - HAT → attivazione trascrizionale
  - HDAC → repressione trascrizionale
    - subunità di grandi complessi – corepressori (Sin3, N-CoR) [simili a coattivatori, ma funzione opposta → repressione gene bersaglio]

metilazione DNA associata a repressione

- HDAC vengono guidati verso particolare regione da stato di metilazione
- proteine leganti DNA mutilato (MeCP2) reclutano corepressori contenenti HDAC → compattamento cromatina e repressione gene
  - cromosoma X inattivo: istoni deacilati
  - cromosoma X attivo: istoni acetitati



Controllo a livello della maturazione dell'mRNA

varietà a livello proteico

- formazione famiglie multigeniche
- all'interno del singolo organismo: splicing alternativo

splicing alternativo

- singolo gene può codificare per due o più proteine fra loro correlate
- geni e trascritti primari contengono introni ed esoni
- in molti casi esistono più modi di sottoporre trascritto primario a splicing
  - via di processamento può dipendere da
    - stadio di sviluppo
    - da cellula o tessuto in considerazione
  - almeno 35% dei geni umani possono essere soggetti a splicing alternativo
  - numero funzionale di geni molto superiore rispetto a numero ottenuto solo da sequenziamento DNA

proprietà splicing alternativo:

- segmento può essere eliminato da trascritto oppure mantenuto
  - sintesi fibronectina (plasma sanguigno e matrice) – prodotta da fibroblasti – contiene due polipeptidi in più rispetto a proteina prodotta da cellule del fegato e secrete nel plasma
    - i 2 polipeptidi sono mantenuti nell'mRNA dei fibroblasti ma non del fegato
- maggior parte di proteine prodotte da un certo gene sono identiche per maggior parte della lunghezza, ma differiscono per regioni chiave → proprietà diverse
  - localizzazione cellulare, tipo di substrati che legano, cinetica di attività catalitiche
    - anticorpi: o associati alle membrane o solubili a seconda di 2 esoni alternativi a estremità 3' dell'mRNA

- diversi fattori di trascrizione possono andare incontro a splicing alternativo → cambia regolazione espressione
- può permettere ampia varietà di combinazioni possibili di esoni differenti nell'mRNA
  - inclusione o esclusione esoni dipende da riconoscimento di sito di splicing a 3' o a 5' come sito da tagliare
  - siti di splicing "deboli" → possono essere superati dal macchinario di splicing in determinate condizioni
  - riconoscimento e uso dei siti di taglio sono regolati da sequenze nell'RNA chiamate amplificatori di splicing (all'interno di esoni la cui inclusione è regolata)

amplificatori di splicing: siti di legame per specifiche proteine regolatorie (SR)

- se proteina regolatoria specifica è prodotta nella cellula, legherà sito di amplificatore di splicing
  - dopo legame, SR recluta fattori necessari per splicing vicino o al livello del sito debole di splicing a 3' o 5'
    - U2AF in sito di taglio 3'
    - U1 snRNP in sito di taglio 5'
  - uso di questi siti di taglio determina inclusione nell'mRNA
- se nella cellula non è prodotta proteina regolatoria, i siti di taglio vicini non vengono riconosciuti
  - esone eliminato insieme a introne fiancheggiante



#### Controllo a livello della traduzione

meccanismi che agiscono su traduzione mRNA già trasportati dal nucleo al citoplasma

- localizzazione mRNA in determinati siti nella cellula
- capacità cellula di controllare se mRNA deve essere tradotto e quanto frequentemente
- longevità mRNA – per quanto tempo va tradotto

questi meccanismi operano tramite interazioni tra specifici mRNA e proteine presenti nel citoplasma

- mRNA contengono a estremità 5' e 3' dei segmenti non codificanti (UTR – regioni non tradotte)
  - segmento 5' UTR si estende dal cappuccio di metilguanossina fino a codone di inizio AUG
  - segmento 3' UTR si estende da codone di stop alla fine della regione codificante fino a coda di poli(A)
- regioni UTR contengono sequenze usate dalla cellula per attuare controllo a livello della traduzione

#### Localizzazione citoplasmatica degli mRNA

localizzazione mRNA determina posizione di strutture tradotte

- Drosophila: asse antero-posteriore – localizzazione mRNA specifici lungo asse
  - gene bicoid in estremità anteriore (→ testa, torace)
  - gene oskar in estremità opposta (cellule germinali)
- localizzazione mRNA più efficace di localizzazione proteine → mRNA può essere tradotto in numero elevato di proteine
- informazione che controlla localizzazione citoplasmatica di mRNA si trova in regione 3' UTR
  - localizzazione mediata da specifiche proteine che riconoscono sequenze di localizzazione (zipcodes) su mRNA

microtubuli e proteine motrici → necessari per trasporto degli mRNA in punti precisi

- depolimerizzazione microtubuli dovuta a colchicina blocca trasporto microfilamenti ancorano mRNA dopo che hanno raggiunto destinazione

mRNA si ancorano a citoscheletro mediante stessa proteina Staufen che si lega a regione presente in 3' UTR

### Il controllo della traduzione dell'mRNA

mRNA mascherati: accumulati nell'uovo non fecondato per usi successivi, non vengono tradotti

- mantenuti inattivi dall'associazione con proteine inibitorie
- bassa incorporazione di aminoacidi

se uovo non fecondato è unito con spermatozoi → fecondato

- incorporazione aminoacidi aumenta in poco tempo

cambiamento rapido da stato inattivo a stato attivo

- non dipende da sintesi di mRNA nuovo
- traduzione di mRNA già presenti nell'uovo
  - attivazione mRNA – 2 eventi distinti
    - rilascio proteine inibitore
    - aumento lunghezza coda poli(A) → enzima nel citoplasma

meccanismi usati da cellule per regolare frequenza di traduzione in base a differenti condizioni ambientali

- alcuni di tipo globale → influenzano traduzione di tutti mRNA
  - cellula sottoposta a stimoli come infezione virale, mancanza di nutrienti, shock termico → chinasi fosforila fattore di inizio eIF2 – blocco ulteriori sintesi proteiche
    - forma fosforilata di eIF2 non è in grado di scambiare il GDP con il GTP, necessario per inizio nuovo ciclo
  - durante mitosi livello sintesi di proteine si abbassa notevolmente
    - eIF4E inibito a legarsi con il cappuccio mutilato presente all'estremità 5'
    - invece mRNA che continuano a essere tradotti durante mitosi contengono siti all'interno del 5' UTR che reclutano subunità minore ribosoma e iniziano traduzione mediante meccanismo che non coinvolge il cappuccio 5'
- altri meccanismi agiscono alterando la sequenza di traduzione di mRNA specifici
  - mRNA che codifica per ferritina: ferritina è proteina che cattura ferro nel citoplasma – protegge cellula da effetti tossici
  - traduzione regolata da specifico repressore, proteina regolatrice del ferro IRP
    - attività dipende da concentrazione ferro nella cellula
    - bassa concentrazione ferro → IRP si lega a sequenza in 5' UTR, chiamata elemento di risposta al ferro (IRE); IRP legato interferisce con ribosoma inibendo inizio traduzione (forma ansa a forcina)
    - alta concentrazione ferro → repressore perde affinità per IRE, si dissocia e mRNA è disponibile per ribosoma: sintesi proteina che lega il ferro

### Il controllo della stabilità dell'mRNA

più a lungo mRNA è presente in cellula, più volte sarà tradotto

nei procarioti mRNA inizia a essere degradato a estremità 5' ancora prima che estremità 3' sia stata completata

mRNA eucariote ha vita relativamente lunga (mRNA emoglobina vive più di un giorno)

cellula è in grado di riconoscere diversi mRNA e di sottoporli a trattamenti diversi

- mRNA privi di coda poli(A) → rapidamente degradati
- mRNA con coda di poli(A) → relativamente stabili

quando esce da nucleo → poli(A) lunga circa 200 adenosine

- coda legata a proteina che lega il poli(A) (PABP)
  - ogni PABP lega circa 30 residui di adenosina

- duplice funzione PABP
  - protegge coda da attività nucleasica
  - aumenta sensibilità coda all'azione di specifica poli(A)-ribonucleasi

se coda si riduce a meno di 30 adenosine → perde stabilità

- troppo ridotta per poter legare PABP
- mRNA rapidamente degradato

degradazione:

- rimozione coda di poli(A) a 3'
  - poi degradazione mRNA a 5' (dopo rimozione cappuccio)
- coda di poli(A) protegge cappuccio in 5'
- estremità di mRNA mantenute vicine tra loro

longevità mRNA dipende anche da differenti sequenze nucleotidiche della regione 3' UTR

- sequenze hanno un ruolo nel determinare la velocità con cui la coda di poli(A) viene accorciata
  - es.: 3' UTR di  $\alpha$ -globina contiene ripetizioni CCUCC → siti di legame per proteine che stabilizzano messaggero
  - mRNA con emivita breve contengono sequenze ricche in AU in 3' UTR → legame con proteine che destabilizzano messaggero (es.: in c-fos) → promuovono accorciamento coda poli(A)

altri fenomeni genetici

- spostamento del modulo di lettura a livello tradizionale (ribosoma si sposta avanti o indietro di un nucleotide) → 2 diversi polipeptidi generati da stesso mRNA
- lettura del messaggio oltre codone di terminazione (ribosoma continua a tradurre)
- editing mRNA → specifici nucleotidi vengono convertiti in altri post-traduzionalmente (avviene principalmente nei mitocondri oppure apolipoproteina B, accorciata enzimaticamente)
- siti di inizio alternativi della traduzione – differenti codoni AUG nello stesso mRNA utilizzati come inizio (versione corta o lunga di stesso polipeptide, oppure i due AUG si trovano in diversi moduli di lettura e quindi si generano polipeptidi differenti)
- sorpasso tradizionale (ribosoma salta sequenza nucleotidi in uno specifico mRNA e non traduce una porzione)
- splicing proteina in cui uno specifico polipeptide è tagliato via e i due estremi liberi covalentemente

### **Controllo post-traduzionale: determinazione della stabilità delle proteine**

cellule possiedono anche meccanismi che controllano il tempo di sopravvivenza delle proteine una volta che diventano funzionali

degradazione proteine svolta da proteasomi

- struttura a barile
- presenti sia nel nucleo che nel citoplasma
- 4 subunità a forma di anello impilate una sull'altra
- cappuccio attaccato a ogni estremità
- anelli centrali – subunità  $\beta$  – enzimi proteolitici
  - siti attivi si affacciano verso parte centrale del complesso (ambiente protetto separato da citosol)

proteasomi digeriscono proteine marcate per essere eliminate

- proteine marcate se riconosciute come anormali (struttura errata o associazione non corretta)

ogni proteina possiede emivita: periodo di tempo in cui ha il 50% di probabilità di essere distrutta

- a seconda dell'attività, da minuti a giorni
- tutte vengono poi degradate da proteasomi

aminoacido presente a estremità N-terminale: fattore che determina durata vita

- se terminano con arginina o lisina → emivite brevi

anche fosforilazione di alcuni residui può funzionare da marcatura  
possono essere presenti anche sequenze interne che garantiscono breve emivita  
marcatura:

- proteina da degradare legata con ubiquitina
  - ubiquitina trasferita enzimaticamente (enzimi E1, E2, E3) su un residuo di lisina
  - formazione catena poliubiquitinica
  - riconosciuta da cappuccio proteasoma → rimuove catena poliubiquitinica e svolge struttura della proteina
  - polipeptide lineare infilato nella camera centrale attraverso apertura in anello α
  - digerito in piccoli peptidi
    - rilasciati nel citosol dove vengono degradati nelle loro unità aminoacidiche

## Una panoramica della risposta immune

risposte: capacità del corpo di riconoscere self da non self patogeni

- all'interno di cellula ospite (virus)
- compartimenti extracellulari dell'ospite (batteri)



## Risposte immuni innate

prodotte immediatamente dal corpo senza bisogno di contatto con patogeni → prima linea di difesa

- mancanza di specificità
- verso i batteri → infiammazione
  - cellule e soluti fuori da circolo sanguigno nei tessuti
    - concentra agenti di difesa nel sito in cui sono necessari

diversi tipi:

- verso patogeni extracellulari (batteri)
  - neutrofili, macrofagi (attività fagocitaria)
    - migrano nel sito di infezione in risposta a sostanze chimiche chemioattrattive
    - riconoscono e fagocitano i patogeni
  - proteine complemento del sangue
    - si legano a patogeni perforando la membrana: batteri muoiono per lisi
- verso patogeni intracellulari (→ contro cellule già infette da virus)
  - linfociti NK (natural killer)
    - riconoscono cellule infettate e ne causano apoptosi
    - cellule normali hanno proteine di superficie contro attacco NK
  - risposta di cellule infettate
    - producono interferoni di tipo 1 ( $\alpha$  e  $\beta$ ) → secreti in spazio extracellulare
    - interferonio si legano a superficie cellule non infettate → inattivano fattore traduzione eIF2 (fosforilato da via di traduzione segnale)
    - virus non possono usare cellula per sintesi proteine
    - → cellule resistenti a infezione



## Risposte immuni acquisite

richiedono tempo per organizzazione risposta

- altamente specifiche
- solo nei vertebrati

2 categorie

- immunità umorale → patogeni extracellulari
  - assicurata da anticorpi (famiglia delle immunoglobuline Ig)
- immunità cellulo-mediata → patogeni intracellulari
  - assicurata da cellule

entrambi i tipi di immunità mediati da linfociti

- leucociti nucleati
- circolano tra sangue e organi linfoidi
  - linfociti B → immunità umorale
    - attivazione: si differenziano in cellule che secernono anticorpi
    - anticorpi contro patogeni extracellulari
      - impediscono ingresso in cellula ospite
      - oppure marcano patogeno per distruzione da parte di fagocita o da complemento
  - linfociti T → immunità cellulo-mediata
    - riconoscono e uccidono cellula infetta o estranea
- linfociti B e T originano da stesso precursore (cellula staminale ematopoietica pluripotente) ma si differenziano lungo vie alternative



- B → nel fegato o nel midollo osseo
- T → nel timo
- immunità umorale e cellulo-mediata sono indipendenti

cellula staminale ematopoietica pluripotente del midollo osseo  
 origina 2 differenti progenitrici

- cellula mieloide
  - cellule del sangue
    - eritrociti, basofili, neutrofilii, eosinofili, piastrine
  - monociti → macrofagi
  - mastociti
  - cellule dendritiche
- cellula linfoide
  - linfociti NK
  - linfociti T → migrano verso timo
  - linfociti B → si differenziano nel midollo (→ plasmacellule)

### La teoria della selezione clonale applicata alle cellule B

anticorpi reagiscono con antigene presente su sostanza estranea

- antigeni: polisaccaridi o proteine (a volte lipidi e acidi nucleici)

corpo produce piccola quantità di anticorpi strutturati a caso in assenza di antigene

- tutti questi anticorpi possono combinarsi con ogni antigene
- quando si è esposti ad un antigene → si combina con specifico anticorpo → anticorpo prolifera

teoria della selezione clonale – applicata a cellule B:

- ogni cellula B è destinata a produrre un tipo di anticorpo
  - cellula staminale → cellula B: riarrangiamento DNA
    - → differenti cellule B con differenti anticorpi
- cellule B vengono destinate alla produzione di anticorpi in assenza di antigene
  - intero repertorio di cellule che producono anticorpi è presente prima della stimolazione da parte dell'antigene
  - ogni cellula B con anticorpo rivolto all'esterno → cellula ricoperta da recettori per antigene
- produzione di anticorpi segue la selezione delle cellule B provocata dagli antigeni
  - attivazione cellule B spesso richiede cellule T
  - quando T non sono richieste, antigene attiva da solo cellule B → antigeni timo-indipendenti
    - interazione specifica antigene-anticorpo
    - antigene seleziona quel particolare linfocita B
    - linfocita specifico prolifera → formazione cloni con stesso anticorpo
  - linfociti B si differenziano in plasmacellule – esteso RER → grande sintesi e secrezione anticorpi
- la memoria immunologica produce immunità a lungo termine
  - linfociti B che non si differenziano rimangono nei tessuti come linfociti B della memoria
    - risposta rapida a seconda infezione dello stesso tipo
      - rapida proliferazione: risposta immune secondaria
    - possono persistere tutta la vita
- tolleranza immunologica previene la produzione di anticorpi contro se stessi
  - anticorpi generati da ricombinamento casuale DNA → anche autoanticorpi autoanticorpi:
    - morte per apoptosi → delezione clonale

- inattivate e incapaci di rispondere ad antigeni → anergia clonale  
possibili malattie autoimmuni



### Vaccinazione

Jenner → vaiolo non colpisce contadine che avevano preso vaiolo bovino (innocuo)

1796: inocula vaiolo bovino e poi vaiolo classico → nessun segno di malattia

vaccinazione

- stimolando cellule T → vaiolo di Jenner
- stimolando cellule B → tetano

immunizzazione passiva: inoculati anticorpi in grado di legarsi a tossina

- effettiva per breve periodo di tempo
- non è in grado di proteggere da successiva infezione

### **I linfociti T: attivazione e loro meccanismo d'azione**

anche le cellule T sono attivate da selezione clonale

- T: proteina di membrana – recettore della cellula T (TCR) → interazione specifica con antigene
  - ogni cellula T, un solo tipo di TCR
  - adulto:  $10^{12}$  cellule T →  $10^7$  TCR

cellule B sono attivate da antigeni solubili e intatti (extracellulari), mentre cellule T sono attivate da frammenti di antigeni presentati da cellule presentanti l'antigene (APC)[cellule T → patogeni intracellulari]

- APC mostra porzioni di proteine virali su superficie → legame con TCR di cellula T

APC:

- cellule infette
- professionali: cellule dendritiche (DC) e macrofagi

DC – sentinelle del sistema immunitario

- nei tessuti periferici (pelle, vie respiratorie → entrata patogeni) e nei siti di infiammazione
- immature (nei tessuti)
  - assunzione materiale – endocitosi
  - antigene internalizzato e processato
    - frammentato enzimaticamente e frammenti portati su superficie
- migrano nel linfonodo – si differenziano in DC mature
  - presentano antigene a T con TCR specifico → T prolifera (ingrossamento linfonodi)

antigene eliminato da cellule T

- T muoiono – restano poche T della memoria

T interagiscono con altre cellule

- APC
- cellule B (o altre T)

interazioni mediate da citochine (a basse concentrazioni)

citochine – piccole proteine prodotte da cellule

- interferoni (IFN)
- interleuchine (IL)
- fattori di necrosi tumorale (TNF)
- chemochine
  - chemioattraenti per migrazione dei leucociti, linfociti e macrofagi (diversi recettori → controllati separatamente)

si legano a recettori su superficie cellule bersaglio → segnale interno: modificano attività cellule

sottoclassi di linfociti T

- T citotossici – CTL o Tc

- controllano presenza anomalie
  - non attaccano cellule sane
  - inducono apoptosi in cellule vecchie o infette
- 2 percorsi di morte cellulare
  - rilascio perforine (creano canali nelle membrane delle cellule bersaglio) e granzimi (entrano nei canali e attivano capsasi, enzimi proteolitici che iniziano risposta apoptotica)
  - si legano a recettore su superficie di cellula bersaglio e attivano apoptosi mediata da recettore (domini di morte → procapsasi → capsasi)
- CTL eliminano patogeni presenti dentro cellule → non più accessibili a anticorpi circolanti
- possiedono proteina di superficie della CD8
- T helper – Th
  - cellule regolatorie e non killer
  - proteina CD4 e non CD8
  - attivate da APC professionali (presentano frammento di antigene digerito su superficie → legame con TCR)
  - Th attiva interagisce con cellula B che ha legato stesso antigene solubile intatto
    - attivazione B stimolata da citochine rilasciate da Th
  - proliferazione cellule B in plasmacellule