

IL NUCLEO (L9)

Il nucleo è proprio degli eucarioti ed è la porzione della cellula dove sono localizzate le informazioni genetiche. Il nucleo è separato dal citoplasma grazie all'**involucro nucleare**.

In una cellula in interfase (che non si sta ancora dividendo) vi sono:

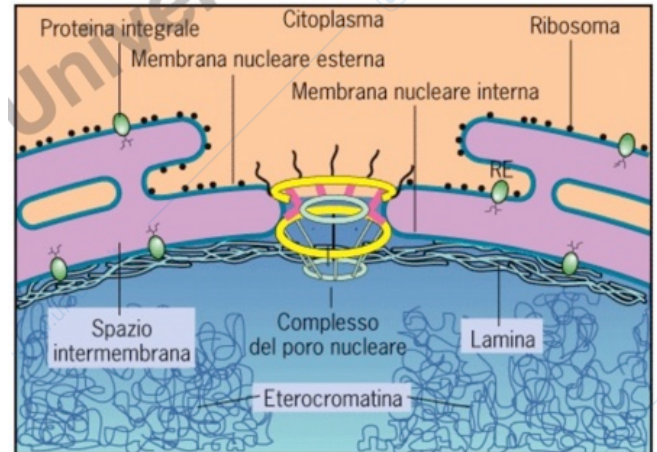
- **Cromosomi** sotto forma di cromatina.
- **Nucleoli**
- **Nucleoplasma**: sostanza fluida di natura acquosa dove sono immerse tutte le componenti.
- **Matrice nucleare**: rete di proteina che dà struttura al nucleo.

L'INVOLUCRO NUCLEARE

È costituito da **2 membrane cellulari concentriche** separate da uno spazio di 10-50 nm detto **spazio perinucleare**. Le membrane regolano il passaggio di molecole e ioni in entrambe le direzioni.

Le due membrane si fondono in alcuni punti formando **pori nucleari** contenenti dei complessi proteici che favoriscono il passaggio di sostanze. La **membrana nucleare esterna** è coperta da ribosomi ed è in continuità con il reticolo endoplasmatico rugoso. Lo spazio tra le due membrane è in continuità con il lume del RER.

La **membrana nucleare interna** è legata tramite proteine integrali di membrana alla **lamina nucleare** (sottile rete di proteine) che dà forma e sostegno al nucleo.



- Lamina nucleare

Ha una **funzione strutturale**: dà forma e sostegno al nucleo. Funge anche da **sito di attacco** per le fibre di cromatina alla periferia del nucleo.

La lamina nucleare è costituita da proteine chiamate **lamine** che sono filamenti intermedi.

Assemblaggio e disassemblaggio di queste proteine sono controllati da processi di fosforilazione e defosforilazione:

Fosforilazione → disassemblaggio dei filamenti intermedi (lamine) → durante la mitosi l'involucro nucleare si disgrega.

Defosforilazione → favorisce l'assemblaggio dei filamenti intermedi (lamine)

Mutazioni nella proteina lamina nucleare di tipo A portano ad avere una proteina più corta: e si sviluppa la malattia di **Hutchinson-Gilford**: invecchiamento precoce.

- Pori nucleari

I pori sono le vie di passaggio di sostanze attraverso il nucleo. I soluti a basso peso molecolare riescono a passare nei pori per **diffusione passiva**, mentre RNA e proteine passano nei pori attraverso **sistemi di trasporto che richiedono energia**.

Le proteine vengono sintetizzate nei ribosomi presenti nel citoplasma e alcune devono andare nel nucleo (come la DNA polimerasi).

Gli RNA messaggeri, invece, devono andare nel citoplasma per far avvenire la sintesi delle proteine, quindi escono dal nucleo.

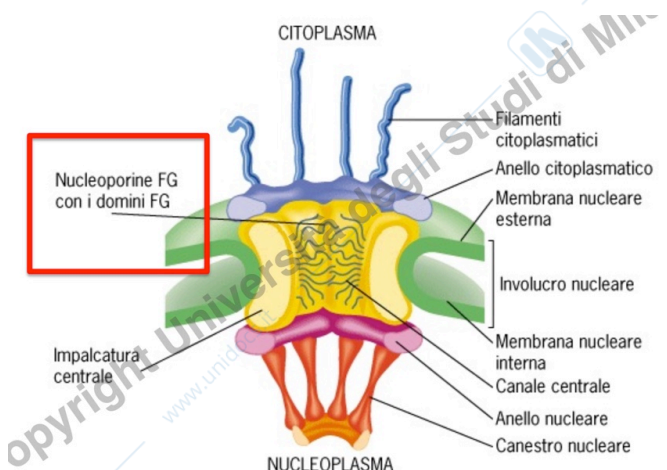
La struttura

I pori sono formati da proteine: le **nucleoporine**.

I pori hanno una struttura ottagonale costituita da 8 raggi collocati attorno ad un canale centrale. I raggi sono collegati ad anelli posti sulla superficie nucleare e citoplasmatica del poro (anello citoplasmatico e anello nucleare).

I pori sono ancorati nei punti di continuità tra le due membrane.

Abbiamo poi dei filamenti proteici che si estroflettono da entrambe le parti e nella parte



nucleare formano una struttura a canestro.

Nella porzione centrale, dove abbiamo il contatto tra le due membrane, le nucleoporine sono ricche di amminoacidi quali fenilalanina e Glicina (domini FG) → in questa zona la proteina ha una struttura disordinata che forma un grosso ingombro che ha la funzione di filtro: favorisce il passaggio solo delle molecole piccole.

Trasporto di proteine attraverso il poro

1) Le proteine che devono essere importate nel nucleo, hanno una sequenza proteica che indica che la loro destinazione definitiva è il nucleo, questo segnale è il **segnale di localizzazione nucleare (NLS)**.

2) Le proteine che devono essere esportate possiedono il **segnale di esportazione nucleare (NES)**.

1) IMPORTAZIONE NUCLEARE

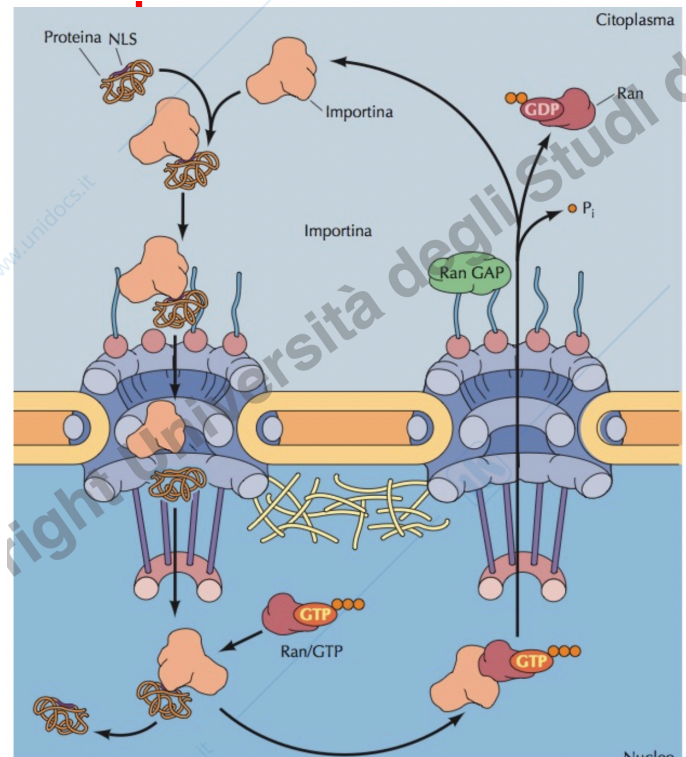
L'importazione nucleare è controllata da 2 enzimi: sul lato citoplasmatico abbiamo la **Ran GAP** (proteina che attiva la GTPasi e converte Ran GTP a Ran GDP) e a livello del nucleo troviamo la **Ran GEF**.

La proteina destinata al nucleo possiede il **segnale di localizzazione nucleare** che viene riconosciuto da un recettore: l'**importina**.

L'importina si lega alla proteina da trasportare all'interno del nucleo. L'importina è riconosciuta dal poro che si apre favorendo l'ingresso del complesso importina+proteina.

La proteina si deve poi staccare dall'importina altrimenti non potrebbe svolgere la sua funzione. Per dissociarle interviene l'enzima **Ran GTP** che si lega all'importina inducendo in essa un cambiamento conformazionale che favorisce la liberazione della proteina.

L'importina deve poi tornare nel citoplasma per importare altre proteine, quindi il complesso importina+Ran GTP esce dal nucleo e in corrispondenza del poro nucleare dobbiamo liberare l'importina dalla Ran GTP e per questo interviene la **Ran GAP** che idrolizza GTP a GDP.

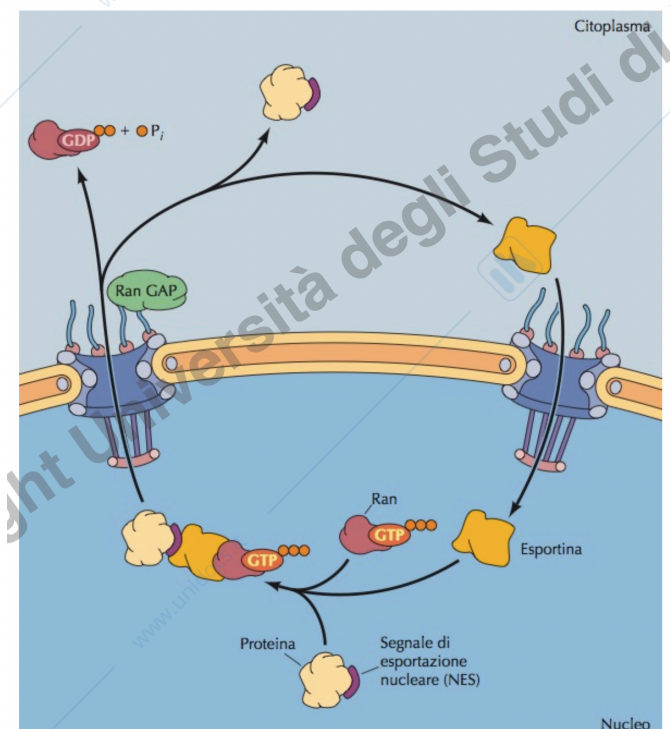


2) ESPORTAZIONE NUCLEARE

Il recettore in questione è in questo caso l'**esportina**. L'esportina riconosce il **segnale di esportazione nucleare (NES)** che la proteina che deve uscire dal nucleo possiede.

L'esportina lega la proteina da esportare solo quando c'è il **Ran GTP**. Si forma quindi un complesso trivalente formato da: proteina+**esportina**+**Ran GTP**. Il complesso viene riconosciuto dal poro ed esportato.

Sul lato del citoplasma c'è la **Ran GAP** che idrolizza e il complesso trivalente si dissocia, quindi la proteina viene liberata ed esportina e Ran GAP tornano nel nucleo.



TRASPORTO DI RNA

I filamenti di RNA vengono trasportati nel citoplasma, in particolare tRNA, rRNA e snRNA vengono trasportati da **Ran GTP** ed **esportina**.

Gli rRNA si associano con le proteine nel nucleolo a formare complessi ribonucleoproteici e vengono esportate le subunità ribosomiali, mentre gli mRNA vengono trasportati da un altro complesso.

STRUTTURA INTERNA NUCLEARE

IL GENOMA

Il nucleo contiene il genoma, il patrimonio genetico negli eucarioti è molto complesso rispetto ai procarioti:

- I genomi dei **procarioti** sono contenuti in **singoli cromosomi**, costituiti da una molecola di DNA circolare.
- I genomi degli **eucarioti** sono costituiti da **cromosomi multipli**, ciascuno corrispondente a una molecola di DNA.

La dimensione del genoma viene espressa come numero totale di coppie di basi nucleotidiche, o paia di basi (bp). Per genomi grandi si usano Kb, Mb, Gb.

Il genoma umano è costituito da 3×10^9 paia di basi ed è 1000 volte più grande di quello di E. Coli. Giglio e salamandra hanno un genoma più grande dell'uomo. Perché? La dimensione del genoma non conta tanto, ed è meno importante rispetto al numero e del tipo di geni funzionali e rispetto alle sequenze di DNA che controllano l'espressione. **NON TUTTI I CROMOSOMI PORTANO GENI CODIFICANTI.**

Le 3×10^9 paia di basi sono distribuite in 23 coppie di cromosomi omologhi: 22 coppie sono costituite da autosomi, e abbiamo due cromosomi sessuali per un totale di 46 cromosomi. È un genoma diploide (2n).

Il carotipo è la distribuzione dei cromosomi e la numerazione dei cromosomi viene fatta in base alla loro dimensione.

Colorazioni artificiali (processo di bendaggio) permettono di evidenziare differenze più fini fra i cromosomi. Questi coloranti tingono solo alcune regioni del cromosoma, lasciandone altre chiare, generando così un **BANDE** caratteristiche per ciascuna coppia di cromosomi omologhi. Ogni banda ha la sua nomenclatura che permette di ricavarne la posizione. Per ogni banda viene indicato il numero del cromosoma, il braccio, la regione, la banda e la sottobanda.

Si è scoperto che le regioni che appaiono scure con questi coloranti sono ricche di basi azotate A e T, mentre le regioni che rimangono non colorate sono ricche di G e C.

Ciascuna cellula umana contiene 2 metri di DNA e il nucleo presenta un diametro di 6µm, quindi i DNA occupa poco spazio, infatti esso si compatta grazie agli **istoni**. *

• **Frazione altamente ripetitiva (1-10% circa del DNA)**

Almeno 10^5 copie vengono ripetute in **TANDEM** e generalmente queste sequenze sono brevi. Abbiamo diversi tipi di sequenze:

DNA satellite: è una regione piuttosto ampia formata da moltissime ripetizioni di corte sequenze.

DNA minisatellite: abbiamo sequenze formate da 10-100 coppie di basi ripetute fino a 3000 volte. I minisatelliti occupano tratti molto più corti rispetto alle sequenze satellite. I minisatelliti tendono a essere instabili e il numero di copie di basi di una particolare sequenza spesso aumenta o diminuisce da una generazione alla successiva.

DNA microsatellite: abbiamo sequenze formate da 1 a 9 coppie di basi che si ripetono e queste sequenze sono distribuite in modo abbastanza omogeneo nel genoma.

La maggior parte di queste sequenze non vengono trascritte perché non portano informazioni, conferiscono un carattere strutturale e si trovano a livello dei **centromeri** e **telomeri**. Possiamo avere **MALATTIE DOVUTE A CAMBIAMENTI IN DNA MICROSATELLITI**.

• **Frazione moderatamente ripetuta (20-80%)**

In questa frazione abbiamo sequenze ripetute non codificanti e sequenze ripetute codificanti.

Nella **parte codificante** troviamo i geni codificanti per RNA ribosomiale e per gli istoni.

Nella **parte non codificante** troviamo sequenze in tandem chiamate LINE se sono lunghe o SINE se sono corte.

- **SINE** (short interspersed nuclear element):

Sono le sequenze più corte di 500bp, non contengono geni ma necessitano di enzimi codificati da altri elementi per lo spostamento (es. sequenze Alu di circa 300 bp, il loro nome ha origine dal fatto che l'enzima di restrizione AluI taglia gli elementi Alu in due parti più o meno uguali).

- **LINE** (long interspersed nuclear element):

Sono sequenze da 6000 bp che contengono i geni necessari per la copiatura degli elementi ripetuti e per il loro inserimento nel genoma. Codificano per una proteina con due attività catalitiche: trascrittasi inversa ed endonucleasi.

Alcune LINE e SINE sono state identificate come **trasposoni** che possono spostarsi nel genoma e inserirsi a caso nel DNA. Alcuni trasposoni codificano per la proteina **trasposasi** che favorisce il taglio del trasposone da un sito donatore.

Il 45% del DNA deriva da elementi trasponibili, però il 99% non sono in grado di muoversi perché colpiti da mutazioni o perché il loro movimento è soppresso dalla cellula.

Le trasposizioni talvolta possono avere un effetto negativo, infatti si stima che ogni 500 trasposizioni, una porta a una mutazione che dà origine a malattie.

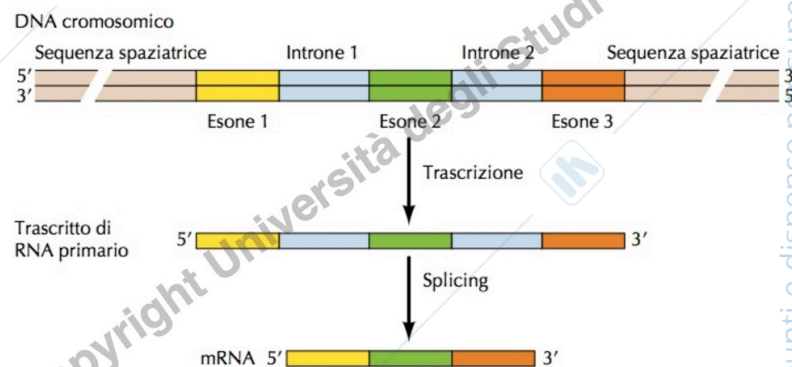
I trasposoni sono sequenze che vanno incontro a trasposizione e...

1. Possono portare con sé porzioni adiacenti del genoma;
2. I trasposoni possono aver spostato elementi regolativi;
3. Possono dare origine a nuovi geni (telomerasi);
4. Sono più abbondanti nel tessuto cellulare dei mammiferi.

Frazione non ripetitiva (è solo l'1,5% del DNA)

All'interno del genoma ci sono sequenze a copia singola che non sono ripetute e queste sequenze sono i **GENI**: porzione di DNA espressa per ottenere un prodotto funzionale RNA o proteina.

La porzione di DNA non codificante è composta dalla **sequenza spaziatrice**, ovvero il tratto di DNA tra i due geni ed è composta anche dagli **introni**. L'**esone** invece viene codificato.



* ISTONI

Gli istoni sono piccole proteine contenenti un'alta percentuale di amminoacidi basici, quindi che hanno carica positiva (Arginina e lisina) che legano facilmente il DNA che ha una carica negativa.

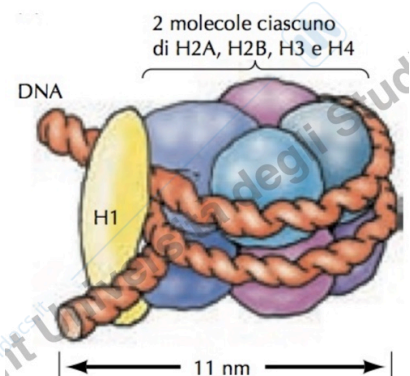
Abbiamo 5 tipi di istoni:

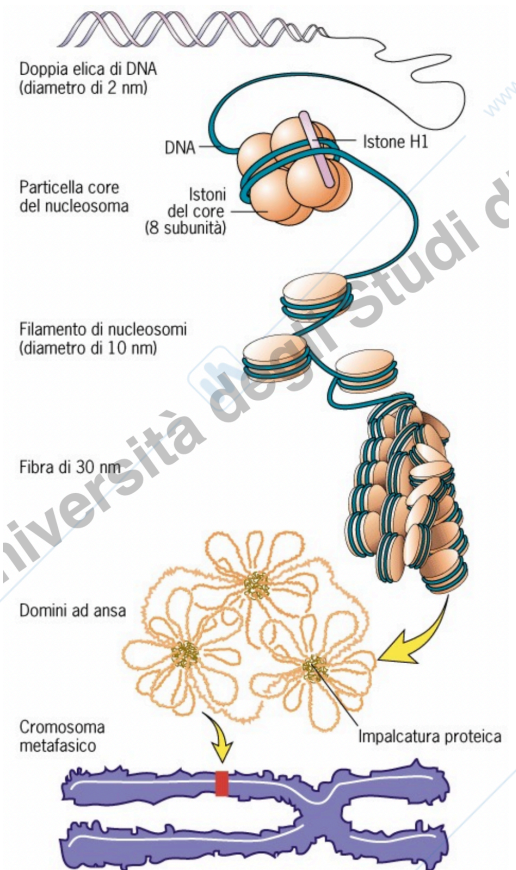
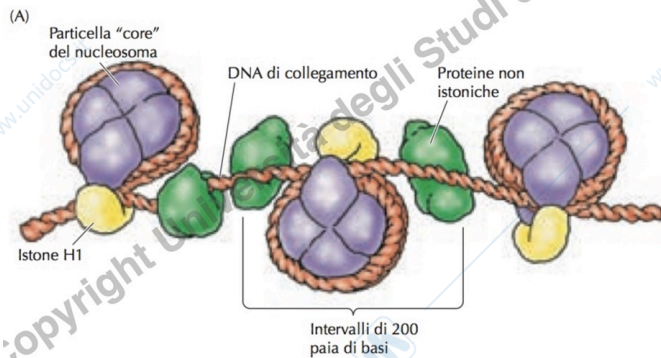
H1, H2A, H2B, H3, H4.

DNA + **istoni** + **proteine non istoniche** (circa 1000) = **cromatina**. L'unità funzionale della cromatina è il **nucleosoma**.

La cromatina è stata isolata e trattata con nucleasi. I frammenti tagliati avevano dimensioni simili e tali frammenti vennero chiamati "**core**" del **nucleosoma**.

Le core sono costituite da 146bp di DNA avvolte attorno a 8 istoni che formano un cilindro: due H2A, due H2B, due H3 e due H4 (nucleo di istoni). Abbiamo poi l'istone H1 che è attaccato al DNA nel punto in cui esso esce ed entra dal core del nucleosoma; è un istone di connessione, pinza il DNA. I nucleosomi sono fibre compatte di 11nm che riducono di 6 volte la lunghezza del DNA e i nucleosomi sono separati da sequenze spaziatrici di DNA di 50bp. Oltre al ripiegamento istonico, ciascun istone ha una coda N-terminale che si estende fuori dal complesso DNA-istoni. Queste code sono soggette a parecchi tipi di modificazioni covalenti che a loro volta controllano aspetti cruciali della struttura e della funzione della cromatina.





La cromatina può essere ulteriormente condensata dall'avvolgimento in fibre di 30nm, che riducono la lunghezza di 50 volte. La struttura della fibra da 30nm è costituita da due pile di nucleosomi (circa 6 nucleosomi).

Tali fibre da 30nm si possono ripiegare ulteriormente su se stesse formando anse superavvolte da 80-100nm che sono fibre più spesse. Le anse di DNA, a loro volta, costituiscono un'impalcatura centrale: lo scaffolo, attorno al quale si compattano le fibre. La topoisomerasi II aiuta a ridurre lo stato di compattazione.

La cromatina può essere più o meno condensata e questo dipende dal ciclo vitale della cellula.

EUCROMATINA:

Nell'interfase (cellule che non si dividono) la maggior parte della cromatina è relativamente decondensata e distribuita per tutto il nucleo. La maggior parte della cromatina appare in fibre da 30nm o a volte in fibre più condensate da 60-130nm. I geni che sono attivamente trascritti sono in uno stato maggiormente decondensato.

ETEROCROMATINA (DNA nella sua forma più compatta):

Il 10% della cromatina interfaseica è in uno stato molto condensato e la troviamo soprattutto alla periferia del nucleo, spesso in prossimità della lamina nucleare.

Eterocromatina Costitutiva: condensata in tutti gli stadi del ciclo cellulare. È trascrizionalmente inattiva, sono sequenze altamente ripetute come quelle nei centromeri e telomeri.

Eterocromatina facoltativa: varia in relazione alle particolari attività che la cellula sta compiendo. Queste porzioni di cromatina che sono state inattivate in specifiche fasi della vita della cellula o dell'organismo. Un esempio è il cromosoma X nella donna. La donna possiede due cromosomi X: uno è trascrizionalmente attivo, mentre l'altro rimane condensato e prende il nome di *Corpo di Barr*.

IL CODICE ISTONICO

Il codice istonico propone che la struttura e l'attività di una determinata regione di cromatina dipendano da modifiche sulle code degli istoni.

La cromatina può essere influenzata in due modi:

1. I residui istonici modificati servono come sito di ancoraggio per proteine non istoniche.
2. I residui istonici modificati alterano la modalità con cui le code istoniche dei nucleosimi vicini interagiscono tra loro e con il DNA al quale sono legati.

Un esempio di modifica si verifica quando rimuoviamo i gruppi acetile dagli istoni H3 e H4 e questo è uno dei primi passaggi della conversione da eucromatina a eterocromatina e quindi avremo la repressione trascrizionale.

IL CROMOSOMA

Il cromosoma viene compattato durante la profase della mitosi e assume una forma ben distinta.

CENTROMERO

In corrispondenza del centromero le superfici esterne sono fortemente incavate e questa zona è costituita da una sequenza lunga 171 copie di basi chiamata **DNA alfa satellite**.

Il centromero si associa con proteine specifiche che lo rendono diverso dal resto del cromosoma. Per esempio nei mammiferi abbiamo una variante nell'istone H3, chiamata **CENP-A** e questa variante favorisce l'organizzazione del **cinetocore**. Il cinetocore, a sua volta, serve come sito d'attacco per i microtubuli che separano i cromosomi durante la divisione cellulare.

TELOMERI

I telomeri sono costituiti da sequenze ripetute associate a proteine specializzate che formano una sorta di cappuccio di protezione che protegge i cromosomi dalle nucleasi, da altri fattori destabilizzanti e impedisce che le estremità dei cromosomi si fondano tra loro.

I telomeri svolgono un ruolo fondamentale anche nella replicazione del DNA e le **telomerasi** sono enzimi in grado di replicare queste estremità evitando l'accorciamento dei cromosomi. In molte cellule però i livelli di telomerasi sono abbassati e l'enzima non riesce a tenere il passo con la duplicazione dei cromosomi, quindi, dopo molte generazioni le cellule ereditano cromosomi difettosi.

I CROMOSOMI SESSUALI

Il cromosoma X è più grande del cromosoma Y e contiene più di 1000 geni, mentre Y ne contiene meno di 100. A fronte di ciò, nelle donne, esiste un **meccanismo di compensazione di dosaggio** che comporta l'inattivazione casuale di uno dei due cromosomi X per impedire che ci siano differenze tra i due sessi. Il cromosoma X viene inattivato attraverso la condensazione della sua cromatina ed esso prende il nome di *Corpo di Barr*, l'altro cromosoma rimane trascrizionalmente attivo.

IL NUCLEOLO

Il nucleolo è l'organulo cellulare in cui viene trascritto rRNA dalla RNA polimerasi I, avviene parte dell'assemblaggio dei ribosomi e avviene la maturazione degli rRNA.

I pre-rRNA devono essere assemblati con le proteine ribosomiali e con rRNA 5S.

Il nucleolo è associato alle regioni cromosomiche che contengono i geni per gli rRNA 5.8S, 18S e 28S.

5.8S, 18S e 28S vengono trascritti in un unico precursore dall'RNA polimerasi I, quindi abbiamo un filamento lungo (45S) che deve essere tagliato.

Il 45S produce rRNA 18S (della subunità minore 40S del ribosoma costituita da 33 proteine circa) e 5.8S e 28S (della subunità maggiore 60S dove troviamo circa 50 proteine).

La trascrizione del 5S (della subunità 60S è ad opera della polimerasi 3 e avviene fuori dal nucleolo.

Per trascrivere tanto rRNA, in tutte le cellule sono presenti copie multiple dei geni per rRNA.

I geni per 5.8S, 18S e 28S sono raggruppati in tandem su 5 cromosomi diversi (13,14,15,21,22).

I geni per 5S sono disposti in tandem solo sul cromosoma 1.

Il nucleolo non è circondato da membrane ed è costituito da tre regioni distinte:

CENTRO FIBRILLARE (DNA) deputato alla trascrizione.

COMPONENTE FIBRILLARE Densa (pre-rRNA): gli rRNA devono subire il processo di maturazione.

COMPONENTE GRANULARE (assemblaggio ribosomi).

Queste tre regioni rappresentano tre stadi diversi della trascrizione e maturazione dell'RNA.

Al termine della divisione cellulare i nucleoli si associano a zone del DNA dove sono presenti i geni per gli RNA ribosomiali, regioni organizzatrici del **nucleolo**.

