

NUCLEO

Il **nucleo** è un organello fondamentale presente all'interno delle cellule eucariotiche, a differenza della cellula procariotica che non contiene il nucleo al suo interno. Inoltre il patrimonio genetico, all'interno dei procarioti, non è racchiuso da una struttura delimitata da membrana.

Il nucleo e i mitocondri sono gli unici due organelli a possedere un doppio sistema di membrane, una membrana interna ed una membrana esterna. Tra le due membrane vi è uno spazio detto **spazio intermembrana**. Tutti i processi che avvengono all'interno dei sistemi membranosi, avvengono in maniera più controllata. La trascrizione e la traduzione sono due processi che decodificano l'informazione contenuta nel materiale genetico, nei procarioti avvengono contemporaneamente mentre negli eucarioti avviene in spazi e tempi differenti.

La trascrizione, la copia dell'informazione contenuta nel DNA in una molecola di RNA, avviene nel *nucleo*, attraverso dei processi particolari, la molecola di RNA viene esportata dal nucleo e nel citoplasma viene sottoposta a traduzione e si forma poi la proteina. Nei procarioti entrambi questi processi avvengono in contemporanea.

I mitocondri e i cloroplasti sembrano essersi originati per endosimbiosi, essi contengono un DNA circolare simile a quello dei procarioti, alcuni dei geni propri delle proteine mitocondriali e dei cloroplasti vengono trascritti e tradotti all'interno dei mitocondri o dei cloroplasti. All'interno dei mitocondri e dei cloroplasti sono presenti anche i **ribosomi**, strutture importanti per il processo di traduzione.

Nei procarioti, il DNA è ancorato alla membrana in maniera da rimanere in una posizione fissa. In seguito a processi di cambiamenti ambientali sono avvenute delle invaginazioni della membrana plasmatica che avvolge il nucleo. Si pensa che in questo modo sia nato il nucleo ed anche il RE. Un'altra ipotesi è che esso si possa essere formato per endosimbiosi: è stata endocitata una cellula procariotica con il suo DNA, il DNA della cellula ospite è stato perso e quindi sostituito dal DNA della cellula endocitata.

In passato sono stati identificati dei particolari organelli, i **mesosomi**. Essi sono dovuti all'invaginazione della membrana e sono stati conseguenze di cambiamenti ambientali. Il nucleo e il RE si sono quindi formati per invaginazioni dovute a cambiamenti ambientali. Si è formato infine un nucleo definito.

L'**involucro nucleare** racchiude il DNA e definisce il *compartimento nucleare*. Questo involucro consiste di due membrane concentriche attraversate dai complessi dei pori nucleari. Le membrane nucleari esterne sono in continuità tra loro però non presentano le stesse composizioni proteiche. La **membrana nucleare interna** contiene proteine specifiche che servono dai siti di attacco per i cromosomi e per la **lamina nucleare**, un reticolo di proteine che garantisce supporto strutturale all'involucro nucleare; la lamina è anche un sito di ancoraggio per i cromosomi e per il citoscheletro citoplasmatico, mediante complessi proteici che attraversano l'involucro nucleare. La membrana interna è circondata dalla **membrana nucleare esterna**, che è in continuità con la membrana del RE. Come la membrana del RE, la membrana nucleare esterna è costellata di ribosomi impegnati nella sintesi proteica. Le proteine su questi ribosomi sono trasportate nello spazio fra la membrana nucleare interna e quella esterna (*spazio perinucleare*) che è in continuità con il lume del RE.

Nelle cellule eucariotiche il nucleo contiene il materiale genetico sotto forma di DNA, suddiviso in segmenti detti **cromosomi**. L'essere umano possiede 46 cromosomi, di cui 22 coppie sono detti *autosomi* mentre la restante coppia sono detti *cromosomi sessuali*, che determinano il sesso dell'individuo. I cromosomi sessuali dell'uomo sono X e Y, mentre quelli della donna sono due cromosomi X. All'interno del nucleo, i cromosomi durante l'interfase appaiono come un groviglio disordinato ma in realtà esso possiede un'organizzazione definita, poiché nel nucleo ogni cromosoma occupa una zona particolare chiamato *territorio cromosomico*, tra i vari territori cromosomici ci sono i *domini intercromosomici*. A livello del dominio intercromosomico avvengono i processi di trascrizione.

Nel nucleo ci sono altre zone organizzate, dei sottocompartimenti, non delimitati da membrana (all'interno del nucleo non ci sono altre membrane esclusa la membrana dell'involucro nucleare).

È possibile identificare, in seguito a colorazione, diverse zone specializzate:

- **Nucleolo**, appare come una zona circolare, in cui avviene la sintesi degli rRNA. I ribosomi sono formati da rRNA e proteine ribosomiali che poi si assemblano insieme a formare le subunità dei ribosomi. Quindi a livello del nucleolo avviene la trascrizione degli rRNA, l'assemblaggio della subunità minore e maggiore. A questo livello, le proteine ribosomiali si uniscono agli rRNA per formare le due subunità separate. Essi si uniscono solo nel momento in cui deve avvenire il processo di traduzione e in seguito avviene la trascrizione e la maturazione dei tRNA (l'RNA transfer che serve per la traduzione delle proteine).
- **Speckle** sono zone del nucleo dove avviene lo splicing dell'RNA.
- **Corpi di Cajal** sono modificazioni post-trascrizionali degli snRNA con formazione delle particelle del ribonucleo.
- **Corpi Gemini**, funzioni simili ai corpi di Cajal.
- **Corpi PML**, regolazione trascrizione, riparazione del DNA, apoptosi e difesa da infezioni virali.

Un traffico bidirezionale scorre fra il citosol e il nucleo. Le proteine che entrano in funzione nel nucleo (istoni, DNA e RNA-polimerasi, proteine che regolano la trascrizione e proteine che elaborano l'RNA) sono importate selettivamente dal citosol, dove sono prodotte nel compartimento nucleare. Contemporaneamente, quasi tutti gli RNA compresi mRNA, rRNA, tRNA, miRNA e snRNA, sono sintetizzati nel compartimento nucleare e poi esportati nel citosol. Al pari del processo di importazione, anche il processo di esportazione è selettivo. Gli mRNA sono esportati soltanto dopo essere stati modificati in modo appropriato da reazioni che elaborano l'RNA nel nucleo. Le proteine ribosomiali sono prodotte nel citosol, importate nel nucleo, dove si assemblano in particelle di RNA ribosomiale appena prodotto, e sono quindi esportate di nuovo nel citosol dove si assemblano in ribosomi. Ognuno di questi passaggi richiede un trasporto selettivo attraverso l'involucro nucleare.

L'involucro a doppia membrana è attraversato da pori nei quali sono posizionati i complessi dei pori nucleari. La membrana nucleare esterna è in continuità con il RE. I ribosomi sono attaccati alla superficie citosolica della membrana del RE e alla membrana nucleare esterna. La **lamina nucleare** è un reticolo fibroso sottostante alla membrana esterna. È costituita dalle **lamine**, filamenti intermedi uguali per tutte le cellule. La lamina nucleare è ancorata alla membrana nucleare attraverso interazioni con lipidi o con proteine. La lamina contiene un set di *proteine associate alla lamina* o **LAP**, alcune delle quali mediano l'interazione tra la lamina e la membrana nucleare. La lamina nucleare si interrompe laddove si apre il poro nucleare, dove sono presenti le proteine del poro nucleare.

La *lamina nucleare*, posta sul lato nucleare della membrana nucleare interna, è un reticolo di subunità proteiche interconnesse, le lamine nucleari. Le lamine sono una classe speciale di proteine dei filamenti intermedi che polimerizzano in un reticolo bidimensionale. La lamina nucleare conferisce forma e stabilità all'involucro nucleare a cui è ancorato, dall'attacco sia agli NPC che a proteine integrali di membrana della membrana nucleare interna. La lamina interagisce direttamente anche con la cromatina, che interagisce a sua volta con proteine integrali di membrana della membrana nucleare interna. Insieme alla lamina, queste proteine di membrana forniscono collegamenti strutturali fra il DNA e l'involucro nucleare. Quando un nucleo si disassembla durante la mitosi, anche gli NPC e la lamina nucleare si disassemblano e l'involucro nucleare si frammenta. Il disassemblaggio è in parte una conseguenza della fosforilazione diretta delle nucleoporine e delle lamine nucleari da parte della *chinasi dipendente da ciclina* (Cdk), attivata all'inizio della mitosi. Durante questo processo, alcune proteiche degli NPC si attaccano ai recettori di importazione nucleare che hanno un ruolo importante nel riassetto degli NPC alla fine della mitosi. Le proteine della membrana dell'involucro nucleare, non più legate ai complessi dei pori, alla lamina o alla cromatina, diffondono in tutta la membrana del RE.

Il complesso del poro nucleare è costituito da componenti modulari, proteine associate tra di loro a formare il complesso, con una parte attiva nel trasporto per o dal nucleo, tutto ciò che attraversa il nucleo, può passare solo se viene riconosciuto dalle proteine del complesso del poro nucleare, altrimenti esso rimarrà nel citoplasma o nel nucleoplasma.

L'involucro nucleare degli eucarioti è quindi attraversato da strutture note come **complessi dei pori nucleari (NPC, nucleolar pore complexe)**. Ogni NPC è formato da una serie di circa 30 proteine diverse o **nucleoporine**.

Le nucleoporine sono disposte a gruppi di 8 con una notevole simmetria circolare. Studi di microscopia immuno-elettronica hanno dimostrato che le proteine che formano la parte centrale dell'NPC sono orientate simmetricamente attraverso l'involucro nucleare in modo tale che i lati nucleare e citosolico appaiano identici. La simmetria circolare a base otto e quella trasversale a base due degli NPC spiegano come una struttura di queste dimensioni possa essere formata solamente da circa 30 proteine diverse, molte nucleoporine sono presenti in 8, 16 o 32 copie. Sulla base della loro localizzazione approssimativa nella parte centrale dell'NPC, le nucleoporine possono essere classificate in:

1. Proteine transmembrana dell'anello che attraversano l'involucro stesso.
2. Nucleoporine impalcatura che formano strutture a strati dell'anello. Alcune nucleoporine impalcatura sono proteine che piegano la membrana e ne stabilizzano la stretta curvatura nel punto di attraversamento dell'involucro nucleare.
3. Nucleoporine del canale che rivestono il poro centrale.

Molte nucleoporine del canale contengono estese regioni non strutturate, dove le catene polipeptidiche sono intrinsecamente disordinate. Il poro centrale è riempito da una rete intricata di tali domini disordinati che impediscono la diffusione di grandi macromolecole. Le regioni disordinate contengono un gran numero di ripetizioni fenilalanina-glicina (FG). Questi amminoacidi sono importanti perché costituiscono i siti di riconoscimento delle molecole che passano attraverso il NPC. Delle fibrille sporgono sia sul lato citosolico che da quello nucleare dell'NPC. Invece della simmetria trasversale doppia del nucleo dell'NPC, le fibrille che si affacciano sul citosol e sul nucleo hanno un comportamento diverso: sul lato nucleare, le fibrille convergono a livello delle loro parti distali formando una struttura a forma di canestro. Alcune delle nucleoporine impalcatura sono strutturalmente correlate ai complessi proteici che rivestono le vescicole, come la clatrina e la proteina di rivestimento COPII, che modellano la forma delle vescicole di trasporto. Una di queste proteine è un elemento strutturale comune sia negli NPC che nel rivestimento delle vescicole. Queste somiglianze suggeriscono che gli NPC e i rivestimenti delle vescicole abbiano avuto un'origine evolutiva comune, potrebbero derivare da un modulo proteico che ripiegava la membrana ancestrale, esso contribuiva a modellare l'elaborato sistema di membrane delle cellule eucariotiche, che nelle cellule odierne stabilizza i ripiegamenti della membrana necessari per formare un poro nucleare. Ciascun NPC può trasportare fino a 1000 macromolecole al secondo e può funzionare contemporaneamente in entrambe le direzioni. Ciascun complesso contiene uno o più canali acquosi attraverso i quali piccole molecole solubili in acqua possono diffondere passivamente. Le dimensioni effettive di questi canali sono state delimitate iniettando nel citosol molecole marcate solubili in acqua di differenti dimensioni e quindi misurando la loro velocità di diffusione del nucleo. Le piccole molecole diffondono nel nucleo così rapidamente che l'involucro nucleare può essere considerato liberamente permeabile a esse. Grandi proteine diffondono all'interno più lentamente, poiché più grande è una proteina, più lentamente passa attraverso gli NPC. Si pensa che la dimensione limite per la diffusione libera derivi dalla struttura degli NPC. Le nucleoporine del canale con regioni non strutturate formano un groviglio disordinato, bloccando la diffusione di grandi macromolecole ma permettendo la diffusione delle molecole più piccole. Poiché molte proteine cellulari sono troppo grandi per diffondere passivamente attraverso i complessi dei pori nucleari, il compartimento nucleare e il citosol mantengono una composizione proteica differente. I ribosomi maturi, hanno un diametro di circa 30nm e così non possono diffondere attraverso gli NPC, confinando la sintesi proteica nel citosol. I ribosomi sono costituiti da rRNA e proteine ribosomiali, le proteine vengono prodotte nel citoplasma. L'mRNA per queste proteine viene trascritto nel nucleo attraverso NPC, questi messaggeri escono nel citoplasma e avviene la traduzione delle proteine nucleari. Le proteine ribosomiali, una volta tradotte, devono rientrare nel nucleo, a livello del nucleolo avviene l'assemblaggio delle subunità minore e maggiore del ribosoma. Le subunità minore e maggiore separate, dovranno uscire dal nucleo per andare nel citoplasma e svolgere la loro funzione e passeranno attraverso NPC. Le particelle con diametro di 9nm o inferiore, possono entrare e uscire per **diffusione passiva** attraverso i pori nucleari.

Le proteine con dimensioni maggiori non possono diffondere liberamente e vengono trasportate **attivamente** ed in maniera selettiva con consumo di ATP.

Per il trasporto nel nucleo ci sono delle **sequenze segnale**, intersperse nella struttura primaria della proteina. La selettività del processo attivo di importazione nucleare è dovuta ai **segnali di localizzazione nucleare (NLS)**. Questi segnali sono stati definiti per numerose proteine nucleari e per proteine che entrano soltanto transitoriamente nel nucleo, usando il DNA ricombinante. In molte proteine nucleari i segnali consistono in brevi sequenze ricche di amminoacidi lisina e arginina che possiedono carica positiva, la cui sequenza precisa varia nelle diverse proteine nucleari. I recettori per gli NLS sono proteine citoplasmatiche solubili. Per identificare questi recettori venne usata la **digitonina**, molecola che forma dei pori sulla membrana.

La digitonina permeabilizza la membrana plasmatica permettendo al materiale citoplasmatico di uscire fuori ma non viene alterata l'integrità dell'involucro nucleare. Quando a queste cellule vengono aggiunte proteine contenenti NLS, queste non sono in grado di attraversare l'involucro nucleare a meno che non venga aggiunto un estratto citoplasmatico. L'estratto citoplasmatico ha due proprietà:

- lega la proteina di carico ed il poro nucleare,
- aiuta la traslocazione.

Una volta identificate le NLS, presero le cellule e vennero trattate con la digitonina, molecola capace di bucare la membrana plasmatica (ma non la membrana nucleare). In seguito smontarono la cellula dal contenuto citosolico, presero le proteine con NLS ed insieme alla soluzione fisiologica, ricostituirono il citosol. Il risultato aspettato era che la proteina dal citoplasma entrasse nel nucleo. Ripresero quindi l'estratto citoplasmatico, lo misero insieme alle proteine NLS e notarono che dal citoplasma passavano dal nucleo.

La presenza delle NLS quindi è una condizione necessaria ma non sufficiente al passaggio delle proteine dal citoplasma al nucleo, ma è indispensabile qualcosa che era presente nell'estratto citoplasmatico. Sono stati individuati dei recettori, altre proteine che devono essere trasportate nel nucleo e permettono il passaggio attraverso NPC.

I segnali di localizzazione nucleare possono essere posizionati quasi ovunque nella sequenza amminoacidica, si pensa che formino anse o zone sulla superficie della proteina. Il trasporto delle proteine nucleari attraverso i complessi dei pori nucleari inizia quando le particelle si legano a fibrille che si estendono dalle nucleoporine impalcatura sul bordo degli NPC nel citoplasma e quindi procede attraverso il centro degli NPC. Le regioni non strutturate delle proteine degli NPC che formano una barriera di diffusione di grandi molecole sono allontanate per permettere alle particelle di passare attraverso il poro. Il meccanismo del trasporto di macromolecole attraverso i complessi dei pori nucleari è differente dai meccanismi di trasporto coinvolti nel trasferimento di proteine attraverso le membrane di altri organelli, in quanto avviene attraverso un grande poro acquoso espandibile invece che mediante un trasportatore proteico che attraversa uno o più strati lipidici. Le proteine nucleari completamente ripiegate possono essere trasportate nel nucleo attraverso un NPC e subunità ribosomiali, appena formate, sono trasportate fuori dal nucleo come particelle assemblate. Le proteine devono essere disavvolte durante il loro trasporto nella maggior parte degli organelli.

Da sole le proteine non riescono a passare attraverso NPC e hanno bisogno di specifici **recettori**.

I recettori per l'NLS sono:

- quelli che possono legare direttamente il poro,
- quelli che richiedono un adattatore per mediare l'attacco al poro.

I **recettori di importazione** sono di due tipi:

- **Monomerici**, proteina che riesce a riconoscere la sequenza NLS ed essere riconosciuta dal complesso del poro.
- **Eterodimerici**, sono due proteine: **alfa** con 1 subunità che riconosce la proteina da trasportare. Da sola non riesce ad attraversare NPC, lo può fare solo se associata all'altro monomero, alla subunità **beta**. La alfa riconosce il carico che riconosce a sua volta le NLS e la beta riconosce il complesso (alfa e il carico) e può essere riconosciuta dalle proteine del complesso del poro, quindi trasporta questa proteina all'interno del nucleoplasma, qui la proteina viene rilasciata e i recettori di importazione verranno riportati fuori per svolgere la loro funzione.

Questo processo prevede il *consumo di energia*.

Per iniziare l'**importazione nel nucleo**, la maggior parte dei segnali di localizzazione nucleare deve essere riconosciuta da **recettori di importazione nucleare**, chiamati *importine*, la maggior parte dei quali è codificata da una famiglia di geni correlati. I recettori di importazione nucleare non sempre si legano direttamente alle proteine nucleari. Altre proteine adattatrici possono formare un ponte tra i recettori di importazione e i segnali di localizzazione nucleare presenti che devono essere trasportate. I recettori di importazione sono proteine citosoliche solubili che si legano sia al segnale di localizzazione nucleare sulla proteina da trasportare che alle ripetizioni fenilalanina-glicina (FG) presenti nei domini non strutturati delle nucleoporine del canale che rivestono il poro centrale. Ripetizioni di FG si trovano anche nelle fibrille citoplasmatiche e nucleari. Esse interagiscono tra loro debolmente, fornendo una barriera di permeabilità alle macromolecole e servono da siti di attracco per i recettori di importazione nucleare. Le ripetizioni FG rivestono il passaggio attraverso gli NPC in cui transitano i recettori di importazione e il loro carico. I complessi recettore-carico si muovono lungo una via legandosi, dissociandosi e quindi rilegandosi ripetutamente a sequenze FG ripetute adiacenti. In questo modo, i complessi possono saltare da una nucleoporina all'altra per attraversare, secondo un percorso casuale, l'interno dell'NPC. I recettori di importazione, legandosi alle ripetizioni FG, dovrebbero rompere le interazioni tra le ripetizioni stesse e dissolvere localmente il groviglio proteico che riempie il poro, permettendo il passaggio del complesso recettore-carico. Una volta nel nucleo, i recettori di importazione si dissociano dal loro carico e vengono riportati nel citosol. Questa dissociazione avviene solo sul lato nucleare dell'NPC, conferendo quindi direzionalità al processo di importazione.

L'**esportazione dal nucleo** di grosse molecole come nuove subunità ribosomiali e molecole di RNA, avviene anch'essa attraverso i complessi dei pori nucleari e dipende dal sistema di trasporto selettivo. Questo si basa su **segnali di esportazione nucleare (NES)** presenti sulle macromolecole da esportare, oltre che su **recettori di esportazione nucleare** complementari, detti anche *esportine*. Questi recettori si legano sia al segnale di esportazione che a proteine degli NPC per guidare il loro carico attraverso l'NPC fino al citosol. Molti recettori di esportazione nucleare sono strutturalmente correlati ai recettori di importazione nucleare e sono codificati dalla stessa famiglia di geni di **recettori di trasporto nucleare o carioferine**.

I recettori di importazione legano le loro molecole nel citosol, le rilasciano nel nucleo e vengono quindi esportati nel citosol per essere riutilizzati, mentre i recettori di esportazione funzionano alla rovescia. L'esportina riconosce le NES, lega la proteina per essere trasportata e viene trasportata all'esterno. Le esportine quindi legano le NES e portano le proteine all'esterno del nucleo.

NF-κB

Un fattore importante per la cellula soprattutto in condizioni di stress è **NF-κB** (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) è un complesso proteico funzionante come fattore di trascrizione.

NF-κB si può trovare in tutti i tipi di cellule ed è coinvolto in tutte le reazioni delle cellule agli stimoli, quali stress, citochine, radicali liberi, irradiazione con ultravioletti e attacco proveniente dagli antigeni dei batteri o virus. NF-κB funge da fattore di trascrizione, esso attiva la trascrizione di geni particolari. Quando è in uno stato inattivato, l'NF-κB si trova nel citosol, legato ad una proteina inibitoria IκB. Nel momento in cui la cellula è sotto stress (anossia, aumento della temperatura, aumento della salinità, tutti i processi che fanno spostare la cellula dalle sue condizioni fisiologiche), l'inibitore di NF-κB viene fosforilato, questo determina un cambiamento conformazionale della proteina che non riconosce più NF-κB. In seguito, IκB si distacca da NF-κB e si lega a livello del NLS. Nel momento in cui l'IκB è legato a NF-κB, nasconde il segnale. Quando viene fosforilato, questo segnale viene scoperto e riconosciuto dall'**importina eterodimerica**. L'importina riconosce e lega NLS, portandolo all'interno. NF-κB entra e si stacca dall'importina. NF-κB si lega al DNA e fa trascrivere i geni che servono a superare il momento di stress. Tra i geni e le proteine che vengono trascritti da NF-κB c'è anche il suo inibitore. IκB avrà la sequenza di esportazione nucleare, viene riconosciuta da un'esportina e l'intero complesso, NF-κB, IκB vengono esportati. Una volta fuori:

- Se lo stress continua, verrà attivato;
- Se le proteine che sono state attivate da NF-κB hanno recuperato il momento di stress, NF-κB viene inattivato e rimane in attesa di essere attivato quando servirà di nuovo alla cellula.