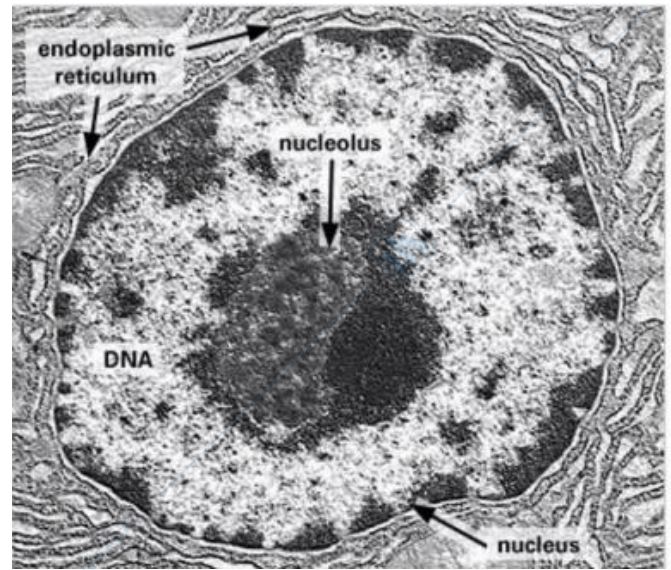


## II NUCLEO

Il nucleo è il compartimento delimitato da membrane che permette di distinguere inequivocabilmente una cellula eucariotica da una cellula procariotica: è facilmente identificabile in gran parte delle cellule durante l'interfase, in quanto presenta una **doppia membrana** che ne delimita il contorno e separa l'ambiente interno, il **nucleoplasma**, dal citoplasma.



Il nucleo racchiude il **genoma** di una cellula eucariotica, cioè tutto il DNA codificante e non codificante, oltre a molti RNA, alcuni stabilmente residenti, liberi o complessati con proteine, altri solo transitoriamente.

Contiene inoltre il **nucleolo**, una regione densa in cui sono sintetizzate le subunità ribosomiali.

La presenza di tale struttura nelle cellule eucariotiche è stata osservata fin dal XVIII da Rober Brown.

La presenza di tale struttura nelle cellule eucariotiche è stata osservata fin dal XVIII da Rober Brown.

La ragione che giustifica una separazione così netta degli ambienti citoplasmatico e nucleare va ricercata nella necessità di **proteggere il DNA**, il quale durante l'interfase, quando è sotto forma di **cromatina**, si trova in una forma relativamente **poco condensata** e quindi più **"fragile"** e facilmente danneggiabile.

Il DNA proprio per la sua fragilità si condensa, compatta assumendo la forma dei **CROMOSOMI** nel momento in cui la cellula deve replicarsi. In questo momento infatti il nucleo si è frammentato e il DNA deve essere molto resistente per poter resistere ai danni e alle intemperie del citosol.

Negli eucarioti il nucleo garantisce inoltre la possibilità di una **fine regolazione genica**, permettendo di concentrare in **prossimità** del DNA i molteplici fattori che regolano la trascrizione e di avvicinarli fra loro, in modo da rendere più efficienti le interazioni.

Possiede anche un ruolo nel controllo dell'espressione genica: il **controllo del trasporto nucleo/citoplasma**.

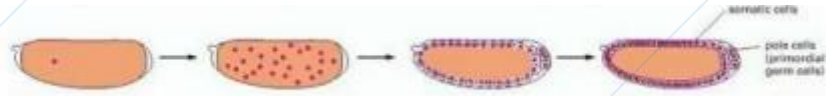
### Dimensioni:

La dimensione del nucleo varia da un diametro di circa **1  $\mu\text{m}$**  nel lievito *Saccharomyces cerevisiae* alla dimensione di **400  $\mu\text{m}$**  negli ovociti di *Xenopus laevis*; in genere, però, negli organismi pluricellulari ha un diametro compreso **fra i 5 e i 10  $\mu\text{m}$** . La percentuale di volume nucleare può variare in base al tipo di cellula (1-2% per lievito, 10% per cellule somatiche e fino al 60% per quelle tumorali)

Il rapporto volumetrico tra nucleo e citoplasma è chiamato **INDICE NUCLEOPLASMATICO (NP)** ed è costante nello stesso tipo di cellula.

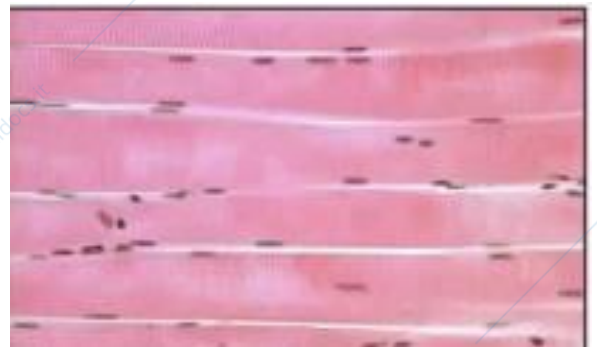
In una cellula può iniziare una seconda meiosi solo dopo che il suo NP è tornato al valore caratteristico.

## Numero:



Esistono anche tipi cellulari nei quali è presente **più di un nucleo**. In alcuni casi, esse si originano a seguito di **plurime duplicazioni nucleari (cariochinesi)** non seguite dalle corrispondenti divisioni cellulari (citodieresi), e la cellula plurinucleata che ne deriva viene detta **plasmodio**.

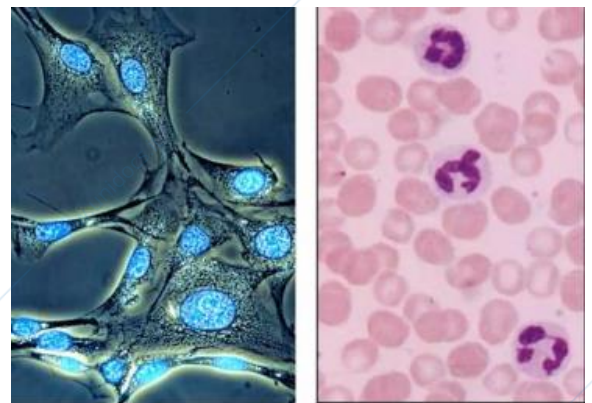
In altri casi, cellule plurinucleate si formano dalla **fusione di precursori mononucleati** e la cellula così formata è detta **sincizio**: un esempio ne è il **muscolo scheletrico**, dove le cellule mature deputate alla contrazione (le fibrocellule muscolari) sono originate dalla fusione di cellule mononucleate (i **mioblasti**). In alcune situazioni patologiche di infiammazione cronica (granulomi) i macrofagi tissutali (o istiociti) possono fondersi generando cellule plurinucleate (cellule di Langhans e cellule di Müller).



## Forma:

La forma del nucleo è per lo più **sferica o allungata** in modo da disporre di una **superficie minima** con il **massimo volume**. Esistono però nuclei con forme particolari, le quali possono, in genere, essere ricondotte alla forma della cellula o alla sua funzione.

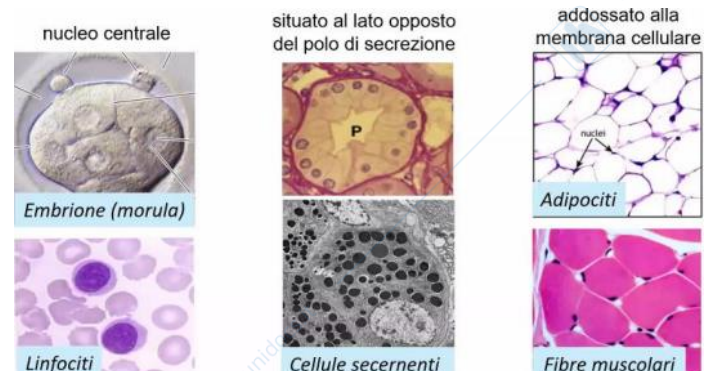
Ci sono eccezioni come i granulociti che presentano un nucleo **POLILOBATO**, cellule secernenti, adipociti, fibre muscolari che invece lo hanno **APPIATTITO**.



## Posizione:

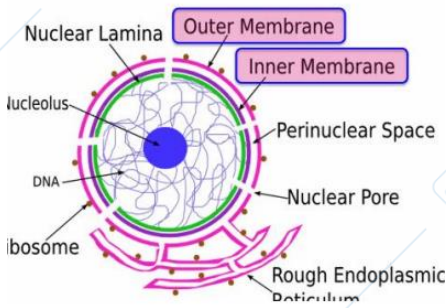
La posizione occupata dal nucleo nei diversi tipi cellulari è in genere **correlata** alla specifica **funzione** svolta da quel tipo citologico. Nelle cellule epiteliali con elevata attività secretoria il nucleo è posizionato nella porzione di citoplasma opposta alla zona di secrezione, che è invece occupata dagli

organelli deputati alla produzione delle vescicole secretorie. Nelle cellule staminali, il nucleo occupa gran parte del volume cellulare e si trova in posizione **centrale**.



## Struttura del nucleo interfascico:

### Involucro nucleare:



Il nucleo interfascico è delimitato da un involucro nucleare costituito da due membrane concentriche, la **membrana nucleare interna** e la **membrana nucleare esterna**, ciascuna costituita da un **doppio strato lipidico** e spessa circa 7-8 nm, nel quale sono inseriti o legati vari tipi di proteine. La membrana nucleare esterna è in **continuità con le membrane del reticolo endoplasmatico ruvido** e presenta sulla superficie

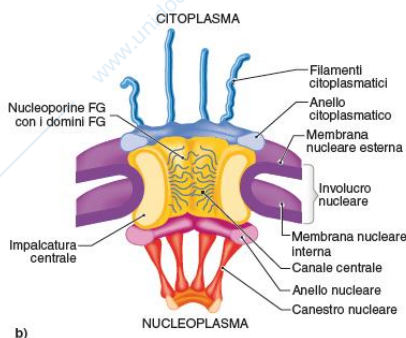
rivolta verso il citoplasma numerosi **ribosomi**, impegnati nella sintesi di proteine convogliate verso il lume del reticolo.

Lo spazio tra le due membrane, detto **spazio perinucleare**, di circa 20-40 nm, è perciò in **continuità con il lume del reticolo** endoplasmatico.

La caratteristica più evidente dell'involucro nucleare è la presenza di numerose aperture circolari, i **pori nucleari**, che ne tappezzano la superficie e **attraversano** per tutto lo spessore l'involucro stesso. Ciascuno di essi è in gran parte occupato da una grossa struttura proteica, il **complesso del poro**, che garantisce il **trasporto** di molecole in entrambe le direzioni tra il compartimento citoplasmatico e quello nucleare.

Gli studi sull'origine dell'involucro nucleare ipotizzano che esso si sia evoluto assieme al reticolo endoplasmatico da **invaginazioni** della membrana plasmatica di una cellula procariotica, infatti le **proteine del complesso del poro nucleare (NPC)** e le **proteine del mantello delle vescicole** che mediano l'endocitosi, il trasporto post-Golgi e l'ER-exit hanno tutte un'**origine comune**.

### Pori nucleari:



l'involucro nucleare è interrotto da strutture proteiche di grandi dimensioni, i **complessi del poro (CPN)**, che costituiscono la via di **scambio bidirezionale** di molecole tra il nucleo e il citoplasma. I pori nucleari sono molto **numerosi**: mediamente ce ne sono **dai 10 ai 20 per  $\mu\text{m}^2$**  di involucro nucleare e pertanto ciascuna cellula somatica di mammifero presenta, in genere, alcune **migliaia** di CPN. **Il numero di pori nucleari è**

**dipendente dall'attività trascrizionale e traduzionale** della cellula: sono più abbondanti nelle cellule con elevata sintesi proteica, data la necessità di trasportare notevoli quantità di RNA verso il citoplasma e di proteine verso il nucleo.

L'**organizzazione tridimensionale** dei CPN in tutti gli organismi eucariotici studiati finora è **molto conservata**, anche se ci sono differenze nelle proteine che li costituiscono. Le diverse proteine che formano i CPN presentano strutture rigide unite insieme da parti flessibili che garantiscono ai CPN contemporaneamente **flessibilità e resistenza**, attributi importanti per la funzione di trasporto.

I CPN sono costituiti da proteine dette **nucleoporine (Nup)**: ognuno di essi contiene almeno 456 molecole proteiche appartenenti a **30 tipi** di nucleoporine diverse.

Una caratteristica delle nucleoporine è la presenza di **ripetizioni multiple** di piccole sequenze: in

particolare, circa un

terzo contiene ripetizioni del tipo X-X-Phe-Gly (dette **ripetizioni FG**), dove X rappresenta un amminoacido qualunque. Queste ripetizioni, il cui numero varia di solito da 10 a 30, sono separate da sequenze spaziatrici di 3-15 amminoacidi. Si ritiene che le ripetizioni **FG delineino il canale centrale del poro**, dove fungono da **siti di aggancio** per le molecole di **trasporto**. L'importanza delle ripetizioni poste nel canale centrale è confermata dal fatto che la delezione di tali sequenze compromette la vitalità delle cellule.

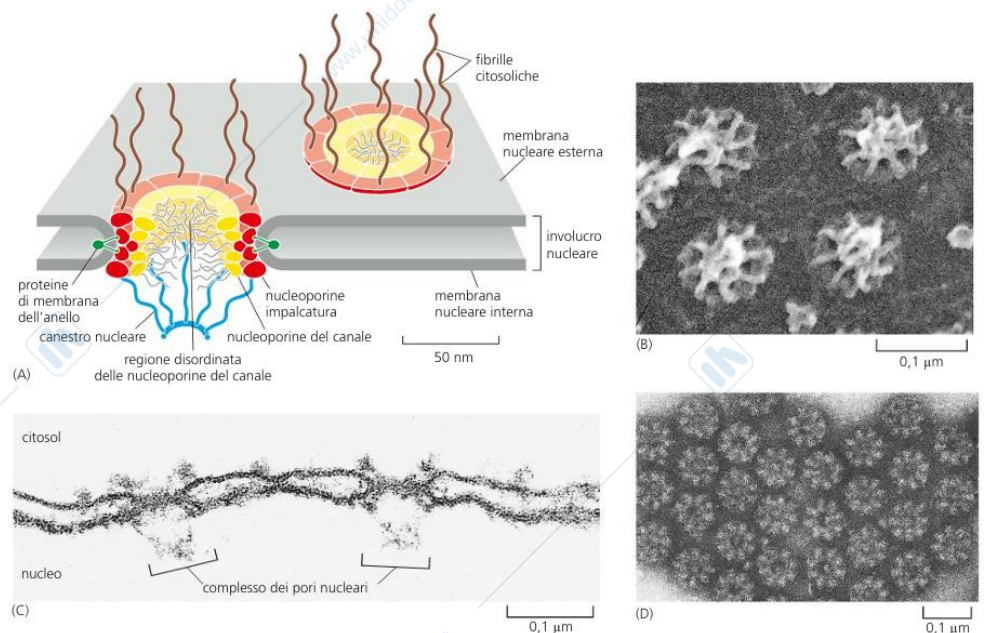
Altra caratteristica di molte nucleoporine è la presenza della **struttura proteica avvolta a spirale** detta "**coiled-coil**". Questi domini sono particolarmente adatti a **interagire** con altri domini simili, creando **grandi strutture multimeriche**.

Studi di immunoelettromicroscopia hanno permesso di **localizzare** le **diverse classi di nucleoporine** all'interno dei CPN. La maggior parte di esse si trova sia sul lato nucleare, sia su quello citoplasmatico; solo poche sono proteine transmembrana e si ritiene che queste aiutino l'ancoraggio del complesso all'involucro nucleare.

I CPN occupano la gran parte di ciascun poro nucleare, avendo uno spessore complessivo di circa 200 nm ed un diametro di 120 nm e lasciando libero solo un sottile spazio centrale, il cui diametro varia da circa 5 nm nell'uomo a circa 11 nm in *Xenopus laevis*. La massa molecolare di un CPN di mammifero è di circa 120.000 kDa.

I CPN hanno **forma cilindrica** e **attraversano l'intero involucro nucleare**, arrivando a sporgere sia nel citoplasma che nel nucleoplasma; la maggior parte di essi ha simmetria **ottagonale**, anche se talora si possono osservare CPN composti da 7 o 9 parti.

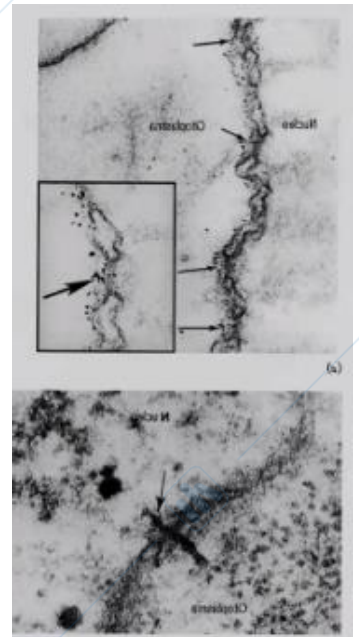
Le **strutture terminali** che sporgono dalla faccia **citoplasmatica** sono costituite da **8 fibrille** che si estendono per circa 100 nm nel citoplasma. Sulla faccia **nucleare** sono presenti **fibrille** simili che si uniscono in una caratteristica struttura a **canestro**. Queste strutture che si estendono nel nucleoplasma e citoplasma rappresentano i **siti di interazione** con le molecole che devono essere trasportate. A livello dei CPN, le membrane dell'involucro nucleare si fondono e la **lamina nucleare si interrompe**.



Tuttavia, la lamina nucleare sembra svolgere un ruolo cruciale nel legare i CPN e nel **posizionarli** sull'involucro nucleare.

Non è chiaro il **processo di formazione dei CPN**, anche se esso sembra coinvolgere specifiche proteine della famiglia delle nucleoporine. In base a studi di deplezione di specifiche proteine Nup e conseguente formazione di nuclei privi di CPN, si è giunti a ipotizzare che i **complessi Nup** siano coinvolti nella **fusione della membrana nucleare** esterna con quella interna. La completa formazione di CPN sembra richiedere **tre passaggi**:

- una iniziale interazione delle proteine **Nup con la cromatina** che le avvicina all'involucro nucleare, innescando successivamente la **fusione delle due membrane** e sostenendo la profonda curvatura della stessa. Per quest'azione esistono delle nucleoporine che condividono domini e funzioni con le proteine coinvolte nella gemmazione delle vescicole;
- la formazione di una **struttura pre-poro**, determinata dall'unione di più complessi Nup associati alla cromatina, osservati in microscopia elettronica prima della formazione dell'involucro nucleare al termine della mitosi;
- **l'aggiunta** di diversi **piccoli complessi proteici ai CPN** preesistenti.



Durante la mitosi, i CPN si disassemblano per **passaggi successivi**. Le **nucleoporine** più periferiche si **distaccano** per prime, seguite poi da quelle che compongono il cilindro centrale. Gli eventi sono probabilmente dovuti a fosforilazioni, ma gli enzimi coinvolti non sono noti. Per gli organismi in cui la **mitosi è di tipo chiuso**, ovvero senza la dissoluzione dell'involucro nucleare, i CPN **modificano** completamente la loro **permeabilità**, permettendo ai complessi **ciclina B/Cdk2** e alla tubulina di **entrare** nel nucleo.

### Trasporto attraverso i pori:

I CPN regolano il traffico bidirezionale di molecole attraverso l'involucro nucleare, permettendo il passaggio di vari tipi di **RNA** e delle **subunità ribosomali** verso il citoplasma, così come di **numeroso proteine** (ad esempio, istoni, lamine, RNA polimerasi, DNA polimerasi, fattori di trascrizione) verso l'interno del nucleo. Vista la loro funzione nell'accesso al genoma, è importante che il numero di CPN sia particolarmente elevato nelle fasi del ciclo cellulare in cui è necessaria un'abbondante trascrizione. In alcuni casi, un'aumentata richiesta di trascrizione può indurre l'assemblaggio di nuovi CPN durante l'interfase.

Le **molecole polari di peso inferiore a 5 kDa** possono **diffondere** liberamente dal nucleo al citoplasma passando attraverso piccoli **canali acquosi**, probabilmente localizzati alla periferia

dei complessi del poro nucleare, ma tutti gli scambi di molecole di **dimensioni maggiori** devono avvenire **attraverso il complesso del poro**.

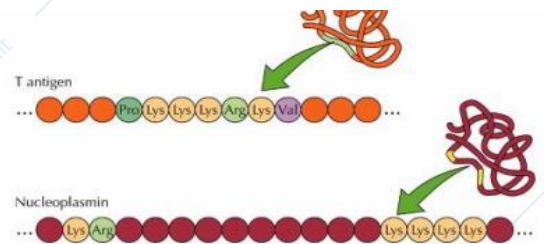
Piccole proteine con massa pari a circa **40kDa** possono attraversare CPN per **diffusione passiva**, mentre le **macromolecole** più grandi sono trasportate **attivamente**, dopo essere state riconosciute grazie a specifiche **sequenze segnale**, le quali non vengono eliminate dopo l'ingresso nel nucleo e soprattutto non è necessaria per il mantenimento della proteina all'interno del nucleo.

L'**importazione** delle proteine nel nucleo è **selettiva** e le proteine stesse contengono l'informazione necessaria per l'ingresso attraverso i pori.

Il **segnale di localizzazione nucleare (NLS, nuclear localization signal)** è **presente in tutte le proteine che entrano nel nucleo attraverso i pori nucleari**.

La sequenza più frequentemente riscontrata è costituita da una **breve sequenza basica**, ricca di **lisina e arginina** (ad esempio, PKKKRKV), che può essere anche suddivisa tra due regioni della proteina, portate una vicino all'altra nella struttura

**NLS:** sequenza breve (4-8 amminoacidi) ricca di amminoacidi basici (lisina e arginina); ad esempio: **KKKRRK**.  
Può essere presente in qualsiasi regione della proteina.



tridimensionale (si parla in tal caso di sequenza bipartita).

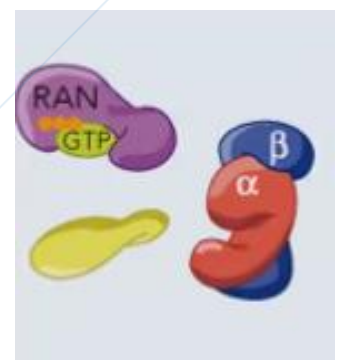
Anche per l'**esportazione** dal nucleo è necessaria una sequenza segnale, che è stata denominata **segnale di esportazione nucleare (NES, nuclear export signal)**. Le sequenze NES sono sequenze di una **decina di amminoacidi**, in cui prevalgono i **residui idrofobici**, in particolare i residui di **leucina**. Una delle prime sequenze NES caratterizzate è stata quella della proteina **Rev** del virus HIV; questa proteina presenta sia un segnale NLS sia un segnale NES e serve per trasportare efficacemente dal nucleo al citoplasma l'RNA virale.

L'importazione delle proteine dotate di NLS e l'esportazione di quelle dotate di NES sono **mediate da recettori**: presentano infatti una **cinetica di saturazione**. La funzione di tali recettori, detti in generale **carioferine**, è di riconoscere e legare la NLS o la NES e di **interagire con le nucleoporine**, che tappezzano il canale del poro, e in particolare con le loro **sequenze ricche di fenilalanina e glicina**.

Le carioferine sono distinte in **importine o esportine**, entrambe accompagnano il loro carico al di là del CPN, dopo di che lo rilasciano e sono riciclate al compartimento di origine, dove ripetono il ciclo di traslocazione con altri carichi.

Le importine possono essere **monomeriche** (importina beta) o **dimeriche** (importine alfa e beta).

- le **importine  $\alpha$**  (55-60 kDa) riconoscono e legano il **segnale di localizzazione nucleare**;
- le **importine  $\beta$**  (90 kDa) interagiscono con le **proteine del complesso del poro nucleare** e svolge anche un ruolo importante nel



trasporto delle proteine nucleari lungo i microtubuli durante la mitosi, oltre a un ruolo nell'assemblaggio del fuso mitotico e della ricostruzione del nucleo dopo la citodieresi.

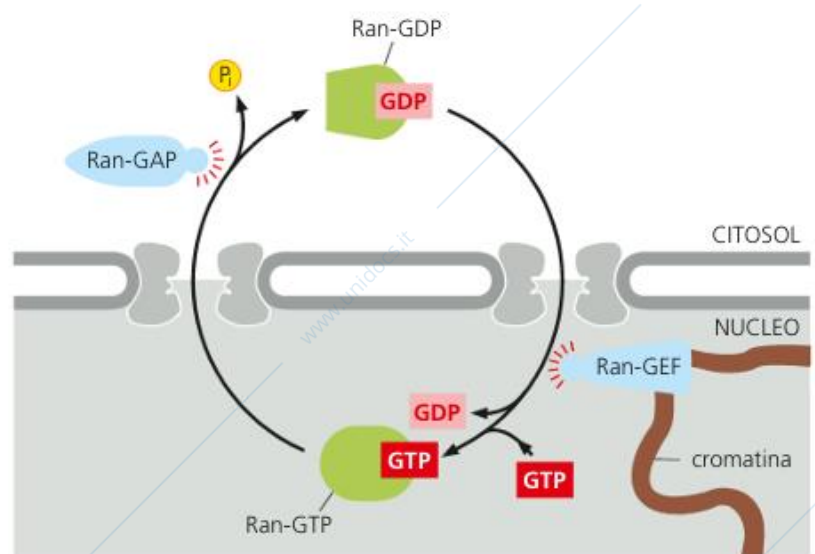
Esistono proteine che riescono ad attraversare il CPN senza l'aiuto delle carioferine: per esempio  **$\beta$ -catenina**, una molecola di segnalazione coinvolta nella via di **Wnt** interagisce direttamente con le nucleoporine.

Alcuni **virus** producono **proteine** che si **sostituiscono alla importina  $\beta$**  e mediano la traslocazione del materiale virale all'interno del nucleo; un esempio è la proteina Vpr del virus HIV.

Le **proteine da esportare** sono **riconosciute** da un membro della famiglia delle esportine, di cui **Crm1** è la principale. Un'esportina specifica, denominata **CAS** (cellular apoptosis susceptibility), ha il compito di **riportare nel citoplasma le importine**, mentre **altre esportine** sono incaricate di trasportare i diversi **RNA neosintetizzati**.

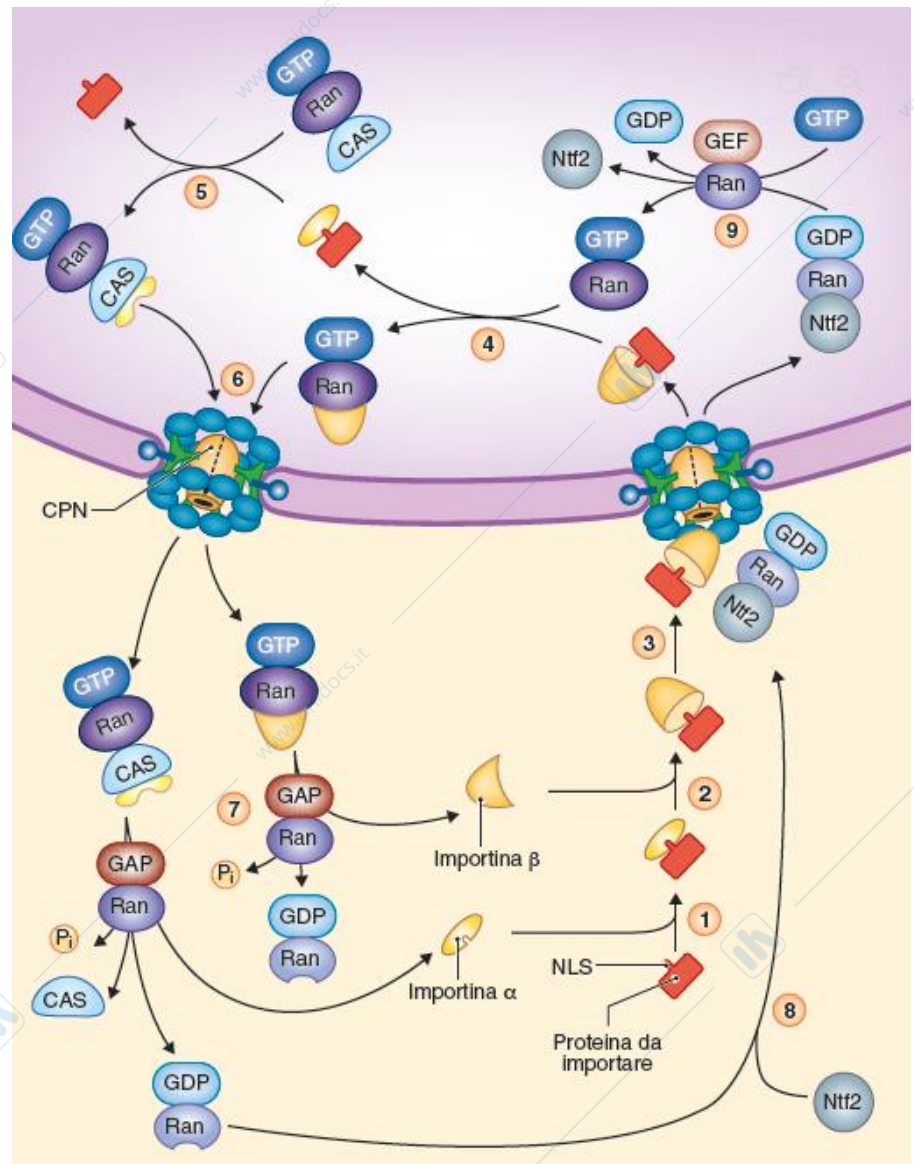
Le interazioni tra NLS o NES e le rispettive carioferine non garantiscono alcuna direzionalità specifica del trasporto; da notare, inoltre, che alcune carioferine fungono da importine per alcune proteine e da esportine per altre. La **direzionalità del trasporto dipende** da una piccola **proteina G**, la **proteina Ran**, che è stata identificata in tutti gli eucarioti e che, **interagendo** con i complessi tra **carioferine** e proteine trasportate, ne influenza **l'associazione o la dissociazione**.

**Ran è attiva** quando è associata al **GTP**, mentre **l'idrolisi del GTP a GDP** la **inattiva**. Si ricordi che l'attività GTPasica è attivata, per queste piccole proteine G, da un **fattore GAP** (proteina che **attiva l'idrolisi del GTP**), mentre lo **scambio tra GDP e GTP**, che attiva Ran, è attuato da un **fattore GEF** (fattore che scambia il GTP).



La **chiave della direzionalità** del trasporto delle carioferine sta nel **compartimento** in cui risiedono le specifiche **Ran-GAP e Ran-GEF**: poiché GAP è localizzata sul versante citoplasmatico (per lo più associata ai filamenti citoplasmatici del complesso del poro), **Ran** è allo stato **inattivo** quando è localizzata nel **citoplasma**, mentre la localizzazione nucleare di GEF fa sì che Ran sia allo stato **attivo** quando si trova nel **nucleo**.

L'affinità tra Ran e le carioferine è diversa per quanto riguarda importine ed esportine: nel nucleo, l'associazione tra **Ran-GTP** e importina **diminuisce l'affinità** tra quest'ultima e la **proteina** trasportata, consentendo all'**importina** di **dissociarsi** da essa e di ritornare al citoplasma. Viceversa, **Ran-GTP** è necessaria alle **esportine** per il **riconoscimento** delle **proteine** caratterizzate da NES e quindi per il loro ruolo di trasporto verso il citoplasma.

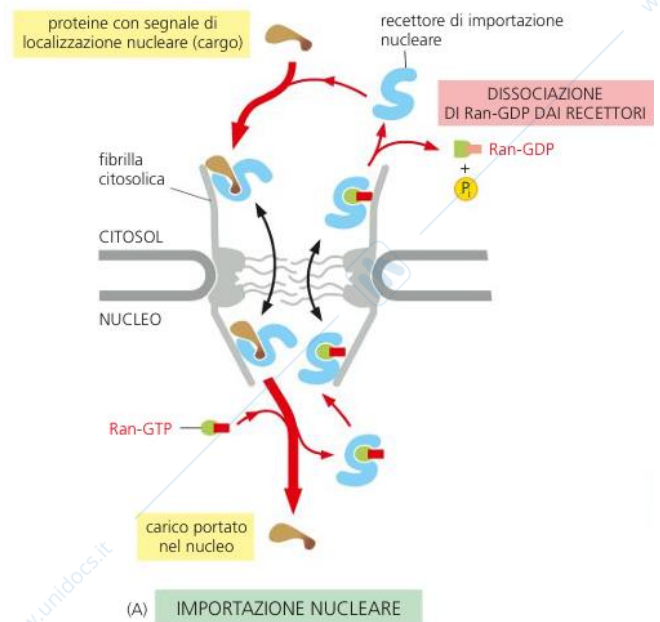


È stato calcolato che la **concentrazione di Ran-GTP nel nucleo** è circa 200 volte **maggiore** di quella di **Ran-GDP nel citoplasma**; in effetti, la quota citoplasmatica di Ran dipende dalla fuoriuscita dal nucleo di Ran-GTP associata all'esportina. Dopo l'idrolisi del GTP e il rilascio della proteina trasportata, **Ran-GDP rientra nel nucleo** grazie al suo trasportatore **Ntf2**. A sua volta, Ntf2 rilascia Ran e fuoriesce nel citoplasma dopo che GEF ha di nuovo attivato Ran. Da notare che **Ran**, come l'importina  $\beta$ , è coinvolta anche nel traffico di proteine associato agli eventi della **mitosi**.

Da quanto detto risulta evidente che le **proteine trasportate** devono essere **assistite** nel movimento attraverso il CPN, ma la **traslocazione non è direttamente dipendente da energia**. Tuttavia, la **necessità dell'idrolisi di GTP** per completare il processo comporta che questo trasporto vada considerato un trasporto attivo. A tale scopo, risulta di essenziale importanza il **gradiente di concentrazione di Ran-GTP e Ran-GDP tra nucleo e citosol**. Tale gradiente è **mantenuto** dalla differente distribuzione delle **due proteine regolatrici**: nel **nucleo** è esclusivamente presente **Ran-GEF**, che, stimolando lo scambio tra GDP e GTP, garantisce un'**elevata concentrazione di Ran-GTP** nel nucleoplasma, mentre **Ran-GAP**, che attiva l'idrolisi del GTP, si trova esclusivamente nel **citoplasma**.

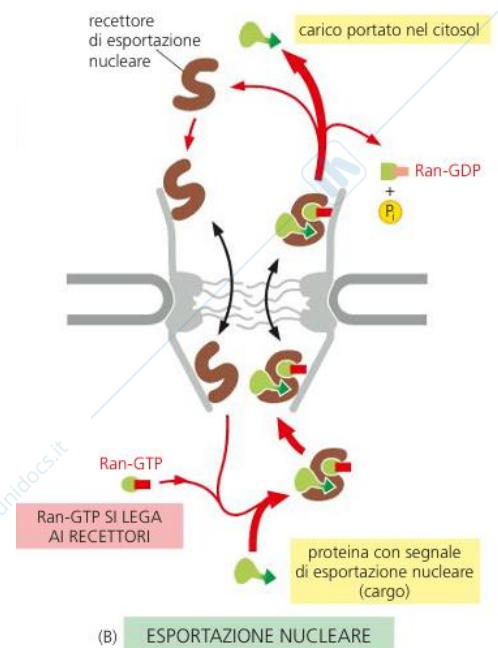
## MECCANISMO DELL'IMPORTAZIONE NUCLEARE

1. Le proteine con segnale **NLS** vengono legate da **importine alpha e beta** e trasportate nel nucleo
2. Qui **RanGTP** si lega all'importina, determinando il **rilascio del suo carico**
3. Il complesso importina/RanGTP fuoriesce dal nucleo seguendo il **gradiente di RanGTP**
4. Nel citoplasma RanGTP si lega a **Ran-GAP** che idrolizza il GTP, diventando **RanGDP** e staccandosi dall'importina
5. Nel caso di importina dimerica, l'importina beta torna nel cytosol legata a RanGTP, mentre la alpha necessita di una specifica esportina.



## MECCANISMO DI ESPORTAZIONE NUCLEARE

- 1) Proteine in uscita sono legate alle **esportine** (tipo Crm1) in un **complesso ternario** favorito dal legame con **RanGTP**.
- 2) Una volta attraversato il NPC, RanGTP viene immediatamente idrolizzato a **RanGDP** per effetto del complesso ternario e avviene il **rilascio del carico**.
- 3) L'esportina e RanGDP libero ritornano nel nucleo mediante il legame con il **fattore Ntf2**.
- 4) Nel nucleo, RanGEF determina lo scambio da RanGDP con RanGTP.



La presenza dell'involucro nucleare negli eucarioti introduce un livello aggiuntivo di regolazione dell'espressione genica e del ciclo cellulare, poiché sia l'importazione sia l'esportazione delle molecole attraverso i pori nucleari sono processi strettamente controllati. Questo trasporto è infatti regolato da una molteplicità di segnali — come ormoni, citochine, fattori di crescita, stimoli legati al ciclo cellulare, allo sviluppo, a processi infiammatori o a condizioni di stress — e può avvenire mediante diversi meccanismi. Tra questi, un ruolo centrale è svolto dalle modificazioni post-traduzionali delle proteine di segnalazione, in particolare **fosforilazioni e defosforilazioni**, che modulano l'attività di proteine regolatrici del ciclo cellulare e di fattori di trascrizione.

Il trasporto delle proteine dal citoplasma al nucleo è strettamente regolato da fattori che consentono o impediscono l'interazione tra le carioferine e le sequenze di trasporto:

- Le sequenze **NLS** e **NES** possono essere **esposte o nascoste** all'interno della molecola a seconda delle **modificazioni post-traduzionali** cui la proteina è sottoposta:
  - nei casi più frequenti tale modificazione è **reversibile** ed è **attuata da una o più fosforilazioni**.
  - In altri casi, la NLS può essere **mascherata da una proteina** (in genere definita "**inibitore**"), che ne **impedisce l'interazione con l'importina**: sarà necessario l'allontanamento o la degradazione dell'inibitore per consentire l'interazione tra la proteina e l'importina e il conseguente trasporto nel nucleo.
- Un'altra modalità per impedire in maniera reversibile il trasporto di una proteina dal citoplasma al nucleo o viceversa è il suo **confinamento in compartimenti cellulari non accessibili alle carioferine**

Esempio di NLS mascherata da fosforilazione:

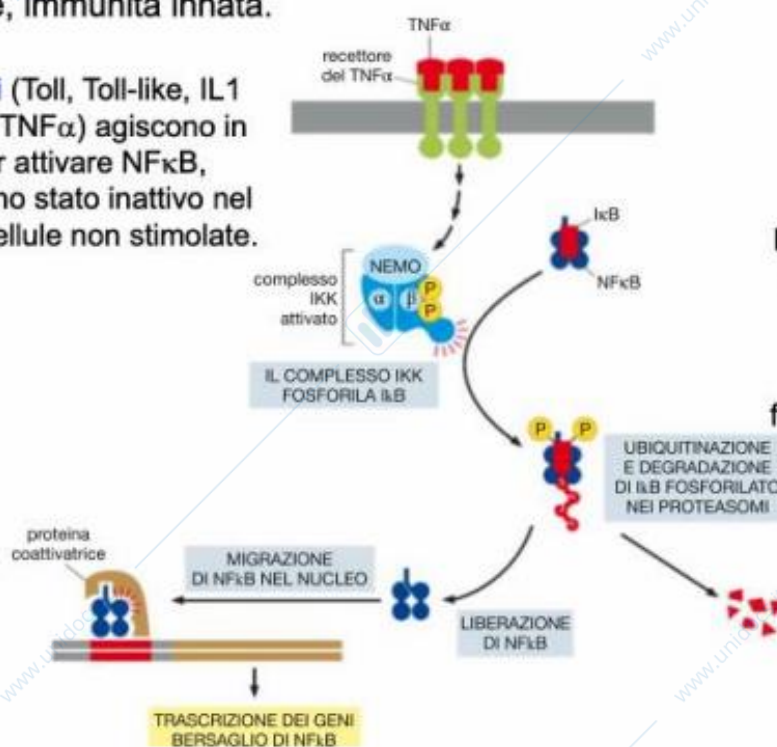
**NFAT4**: ad alte concentrazioni di calcio, la fosfatasi calcineurina lega e maschera il NES, bloccando l'esportazione; quando il calcio diminuisce, la calcineurina si dissocia e il NES viene smascherato, permettendo il ritorno nel citoplasma.

**NF- $\kappa$ B**: rimane inattivo nel citoplasma grazie al legame con l'inibitore **I- $\kappa$ B**, il quale impedisce il riconoscimento dell'NLS da parte dell'importina. Solo dopo specifici stimoli, **I- $\kappa$ B viene fosforilato e degradato**, consentendo a NF- $\kappa$ B di entrare rapidamente nel nucleo e attivare i geni della **risposta immunitaria**.

L'attivazione si spegne grazie a un feedback: **tra i geni indotti da NF- $\kappa$ B vi è quello che codifica nuovamente I- $\kappa$ B**, che rientra nel nucleo, si lega a NF- $\kappa$ B mascherandone l'NLS e ne consente l'esportazione tramite il proprio NES, riportando il fattore nel citoplasma

Le proteine **NF $\kappa$ B** sono regolatori trascrizionali latenti che si attivano in risposta a stress, infiammazione, immunità innata.

Diversi **recettori** (Toll, Toll-like, IL1 e i recettori del TNF $\alpha$ ) agiscono in modo simile per attivare NF $\kappa$ B, mantenuto in uno stato inattivo nel citoplasma di cellule non stimolate.

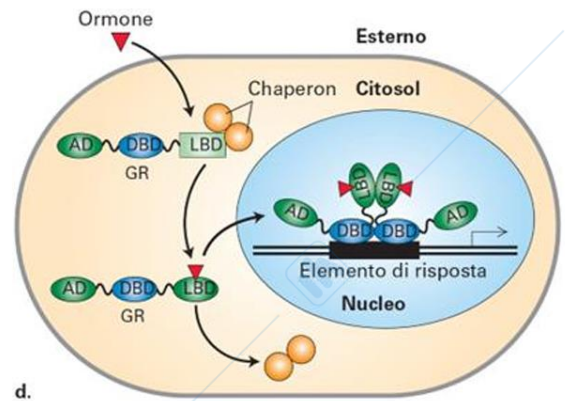


Proteine inibitorie chiamate **I $\kappa$ B** si legano ai dimeri di NF $\kappa$ B e li mantengono in uno stato inattivo nel citoplasma.

I segnali di attivazione dei recettori portano a fosforilazione e degradazione per ubiquitinazione delle proteine I $\kappa$ B.

Dimeri di NF $\kappa$ B migrano nel nucleo ed attivano geni della risposta infiammatoria e dell'immunità innata.

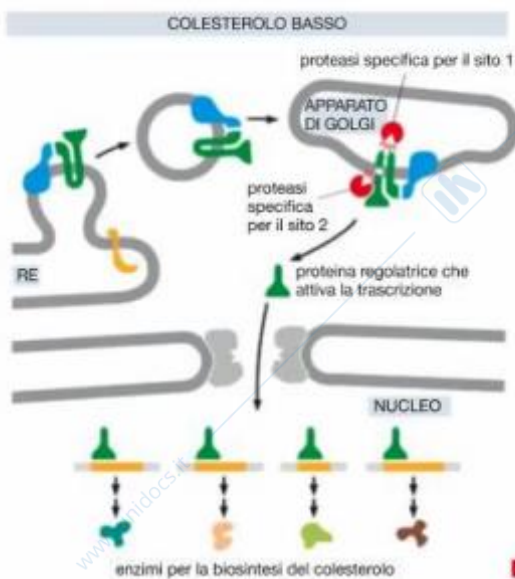
Recettore degli ormoni steroidei: In assenza di ligando, i recettori degli ormoni steroidei come i **glucocorticoidi** si trovano nel citoplasma legati a **proteine chaperon** (come Hsp70/90), che li mantengono in uno stato inattivo. Il legame dell'ormone induce un cambiamento conformazionale del recettore, che porta al distacco delle chaperon e **all'esposizione dell'NLS**. L'NLS viene riconosciuto dalle importine, che mediano il trasporto attivo del complesso recettore-ligando attraverso i pori nucleari (NPC) nel nucleo.



### SREBP (Sterol Regulatory Element-Binding Protein)



La proteina **SREBP** (*Sterol Response Element Binding Protein*) è un regolatore latente della trascrizione dei geni coinvolti nel metabolismo del colesterolo.



La proteina è prodotta e conservata in forma inattiva come proteina transmembrana nel RE

In presenza di basse concentrazioni di colesterolo, la proteina lascia il citosol ed entra nell'apparato di Golgi dove una proteasi specifica libera il suo dominio citosolico.

Il dominio citosolico è libero di essere importato nel nucleo dove attiva la trascrizione dei geni necessari per l'ingresso e la sintesi del colesterolo nella cellula.

### ESPORTAZIONE DI RNA DAL NUCLEO

Il trasporto bidirezionale attraverso i pori nucleari ha anche come oggetto gli RNA, che vengono trascritti nel nucleo e devono essere portati nel citosol per effettuare processi o maturazioni.

Le **subunità ribosomali** rappresentano i complessi di **maggiori dimensioni** che attraversano i CPN. La loro richiesta nel citoplasma è talmente alta che si stima che più del 50% di tutto il trasporto nucleare riguardi i ribosomi. Il **trasporto delle subunità ribosomali** richiede una esportina, **Crm1**, **Ran-GTP** e, nel caso della subunità maggiore **60S**, anche una proteina adattatrice, **Nmd3**.

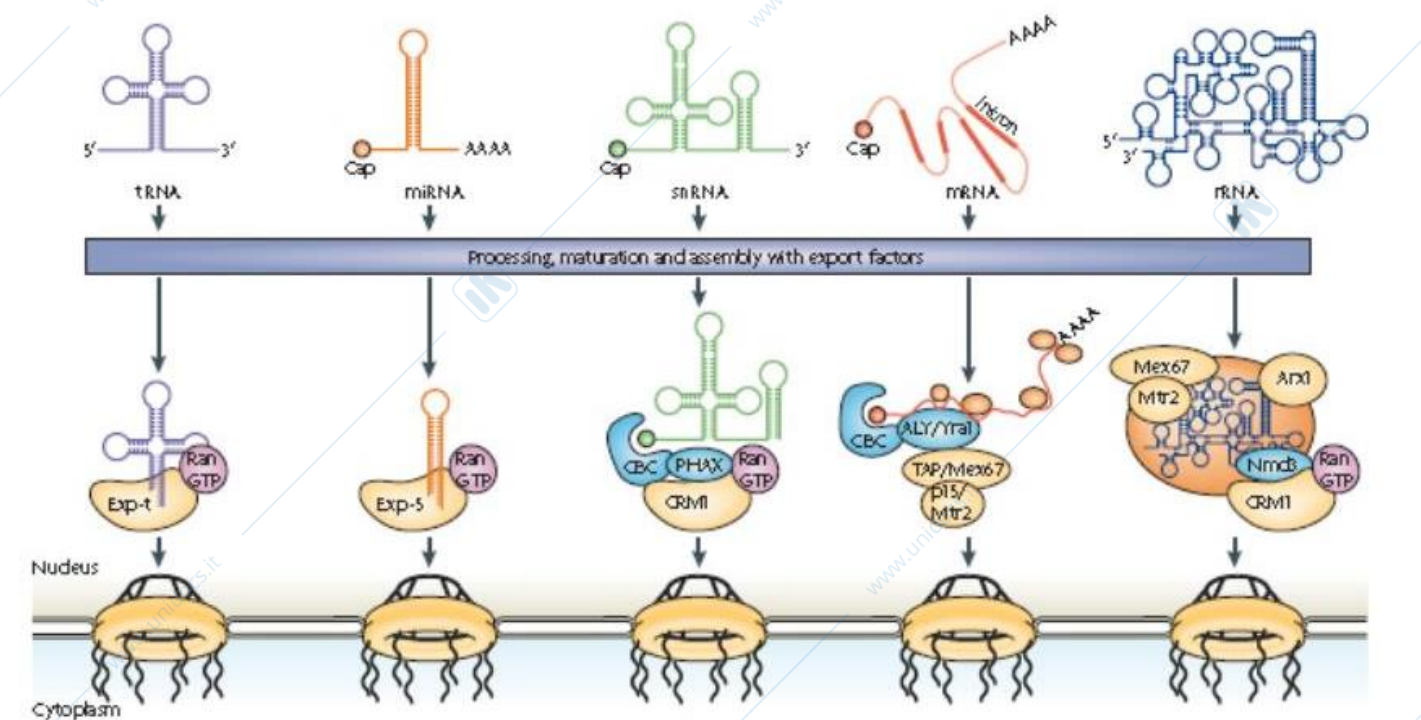
I **tRNA** e i **miRNA** possono attraversare il poro nucleare con il **legame diretto** con dei recettori di esportazione specifici. La proteina **Ran GTP media** questo tipo di trasporto.

Per il **tRNA** esiste una carioferina specifica, l'**esportina-t**, che richiede Ran-GTP e lega direttamente il tRNA **completamente maturo**, ma non quello parzialmente maturo, permettendo così un ulteriore controllo del processo di maturazione di questa classe di RNA.

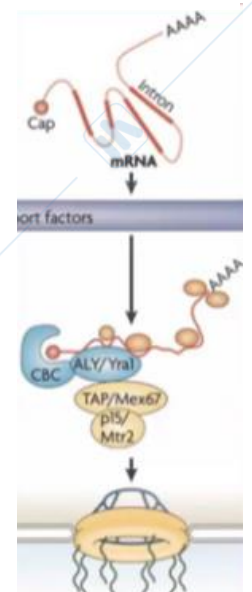
L'amminoacilazione del tRNA può avvenire anche all'interno del nucleo: in questo caso è la stessa amminoacil-tRNA sintetasi che media il trasporto del tRNA nel citoplasma.

I **snRNA** escono dal nucleo come **snRNP** (small nuclear ribonucleoproteins) per completare la loro **maturazione** e **rientrano** nel nucleo grazie a un complesso fra alcune proteine specifiche (come snurportin-1/SNUPN) e l'**importina-β**.

I **miRNA**, dopo essere stati modificati da **Drosha** producendo il **precursore a forcina** (pre-miRNA), sono legati dall'**esportina 5** che utilizza Ran-GTP.



Il trasporto nucleo-citoplasma degli **mRNA** si basa invece sul legame con un insieme di **proteine**, alcune delle quali sono fattori responsabili della **maturazione co-trascrizionale dei pre-mRNA** che deve essere portata a completamento in modo corretto prima della traslocazione. L'**insieme** di RNA e di tali fattori va sotto il nome di **hnRNP** (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins). Tra gli eventi di maturazione co-trascrizionale è stato osservato che la **struttura del cap al 5'** non è essenziale per l'esportazione dell'mRNA, ma **agevola il processo**, mentre lo **splicing** e l'aggiunta della **coda di poli-A** sono strettamente **associati** al processo di **esportazione**. Una volta avvenuto lo splicing, i complessi proteici **EJC** (exon junctional complex), che si sono assemblati sulle giunzioni esone-esone, restano associati all'mRNA e rappresentano un importante **segnale di traslocazione**.



Infatti, il complesso EJC lega un **fattore di esportazione** detto **Aly** che interagisce con **UAP56**, un componente dello spliceosoma, e con **TAP** (appartenente alla famiglia di proteine chiamate nuclear export factors, NXF), un recettore di esportazione in grado di legarsi alle ripetizioni FG delle nucleoporine.

**TAP** sembra avere perciò un ruolo simile alle **esportine**, specifico **per gli mRNA**. La rimozione delle altre proteine associate all'mRNA è probabilmente mediata da altri fattori proteici, tra i quali gioca un ruolo importante **Dpb5**, che è in grado di legare le fibrille del CPN e utilizzare l'idrolisi dell'ATP per **liberare l'mRNA**.

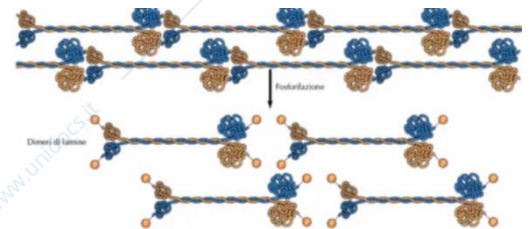
## Lamina nucleare:

In breve, le funzioni della lamina nucleare sono:

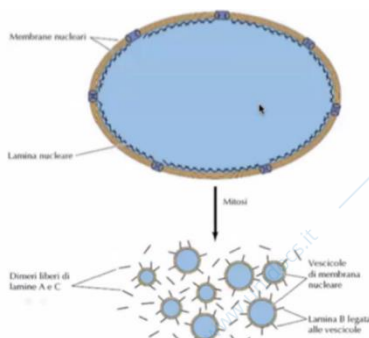
- Determinazione di forma e dimensione del nucleo
- Regola la posizione dei pori nucleari
- Fornisce supporto citoscheletrico al nucleo, rendendolo resistente alle deformazioni
- Funge da ponte fra involucro nucleare e cromatina
- Determina il processo di rottura e riformazione dell'involucro nucleare durante la mitosi. Attraverso una fosforilazione le lamine depolimerizzano, defosforilandole polimerizzano.

La lamina nucleare consiste fondamentalmente in due tipi di proteine: le **lamine** e le **proteine che legano le lamine** (lamin-binding proteins, **LBP**):

le lamine appartengono al **gruppo V dei filamenti intermedi** e hanno un peso molecolare tra i 60 e gli 80 kDa; presentano un piccolo dominio globulare all'estremità N-terminale, un dominio centrale con struttura coiled-coil e un altro dominio globulare all'estremità C-terminale.



Il dominio centrale promuove la dimerizzazione, mentre i due terminali favoriscono l'associazione testa-coda per formare polimeri; nella sequenza amminoacidica sono rilevabili **due siti di fosforilazione** che fiancheggiano il dominio centrale.



In base alla sequenza amminoacidica, alle proprietà biochimiche e al loro comportamento durante la mitosi, le lamine sono suddivise in **lamine di tipo A** (lamine A e C) e **lamine di tipo B** (B1 e B2).

Nei vertebrati, le lamine sono codificate da **3 geni** dai quali per eventi di splicing alternativo si ottengono **sette diversi polipeptidi**, alcuni dei quali presenti solo in alcuni tipi cellulari.

- La **lamina di tipo B** (codificate nell'uomo dai geni **LMNB1** e **LMNB2**) è essenziale per la vitalità cellulare, sono espresse in tutte le cellule e subiscono modificazioni post-traduzionali con aggiunta di un **gruppo isoprenilico**, che ne **media l'attacco** diretto alla **membrana nucleare interna** durante l'interfase e permette loro di rimanere legate alle membrane durante la divisione cellulare.
- Le **lamine di tipo A** (A, C, AΔ10 e C2), codificate nell'uomo da un singolo gene (**LMNA**) ed espresse in modo tessuto-specifico, durante la mitosi si dissociano come proteine solubili nel citoplasma e alla fine della divisione nucleare sono **incorporate nella lamina nucleare dopo** le lamine di tipo B;

le **LBP** sono sia proteine **integrali** di membrana, sia proteine **periferiche**.

Le più importanti sono: **LAP1** e **LAP2** (lamin-associated polypeptide 1 e 2), **emerina**, **LBR** (lamin-B receptor), **nesprina 1α** e **MAN1**.

La loro principale funzione è di **mediare il legame** della lamina nucleare all'**inviluppo nucleare**.

La lamina nucleare si organizza a partire dalla **dimerizzazione** di due catene polipeptidiche delle lamine a livello della porzione centrale, seguita dall'associazione **testa-coda** di tali dimeri. Nonostante le lamine appartengano al gruppo dei filamenti intermedi, questa modalità di associazione, assieme alla presenza del **segnale di localizzazione nucleare** e a una sequenza (**CaaX**) oggetto di modificazioni post-trascrizionali, le differenzia dagli altri filamenti intermedi citoplasmatici, che si forma per associazione laterale dei dimeri. Le strutture allungate così ottenute si **associano lateralmente** per costituire la lamina nucleare definitiva.

Oltre a fornire supporto meccanico all'inviluppo nucleare, la lamina nucleare svolge un ruolo nell'organizzazione della cromatina, nel ciclo cellulare, nella replicazione, trascrizione e riparazione del DNA, nel differenziamento cellulare e nell'apoptosi.

La gran parte della **eterocromatina** è localizzata alla **periferia del nucleo**, in stretta prossimità con la lamina nucleare. La distribuzione non casuale della cromatina all'interno del nucleo suggerisce fortemente un ruolo della lamina nucleare nella distribuzione spaziale della cromatina stessa. È stato, inoltre, provato che le lamine sono in grado di legare specifiche sequenze di DNA, dette **matrix attachment regions (MAR)**, e che le lamine A e B possono anche **legare gli istoni H2A e H2B** tramite i domini terminali.

È il disassemblaggio e riassetto della lamina nucleare che determina la disgregazione e successiva riformazione dell'inviluppo nucleare nelle diverse fasi della **mitosi**. All'inizio della mitosi, il **disassemblaggio della lamina** nucleare è promosso dal **complesso ciclina B/Cdk1 (M-Cdk)** che **fosforila le lamine** in specifici siti fiancheggiando il dominio centrale. In seguito alla fosforilazione, le lamine **A e C** diventano **solubili** nel citoplasma della cellula, mentre le **B** restano **associate alle vescicole** derivanti dalla disgregazione dell'inviluppo nucleare.

Alla fine della mitosi, la defosforilazione delle lamine induce la riorganizzazione della lamina attorno ai cromosomi separati ai due poli del fuso e, di conseguenza, la riformazione dell'involucro nucleare e il posizionamento dei complessi del poro.

Durante l'**apoptosi**, invece, i componenti della lamina nucleare (sia le lamine, sia le proteine che le legano) sono oggetto dell'azione proteolitica delle **caspasi**.

## PATOLOGIE:

Considerando il ruolo importante della lamina nucleare in diversi processi, non sorprende che mutazioni nei geni codificanti per le lamine e per le LBP siano responsabili di varie patologie che vanno sotto il nome di **lamìnopatie**.

Le malattie associate a tali mutazioni si manifestano per lo più in **organi** sottoposti a **frequenti stress meccanici**, come i muscoli scheletrici e il cuore.

Tra queste vanno ricordate la **distrofia muscolare di Emery-Dreifuss (EDMD)** e la **progeria o sindrome di Hutchinson-Gilford (HGFS)**.

Si ricorda che la progeria è una malattia responsabile di un invecchiamento precoce dei bambini affetti; l'alterazione nel gene della lamina A, oltre ad indurre grossolane alterazioni nella morfologia nucleare, causa anche un aumento dell'instabilità genomica.



Studi recenti basati su ampie comparazioni delle sequenze dei genomi nei diversi organismi hanno suggerito che le lamine siano una **struttura antica**, già presente in una forma primitiva in LECA (last eukaryotic common ancestor)

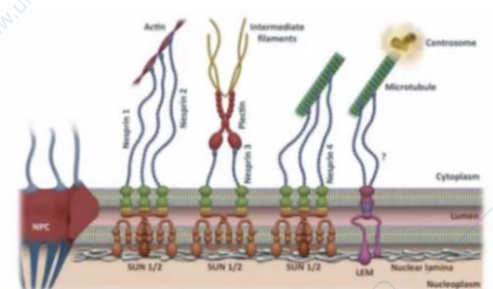
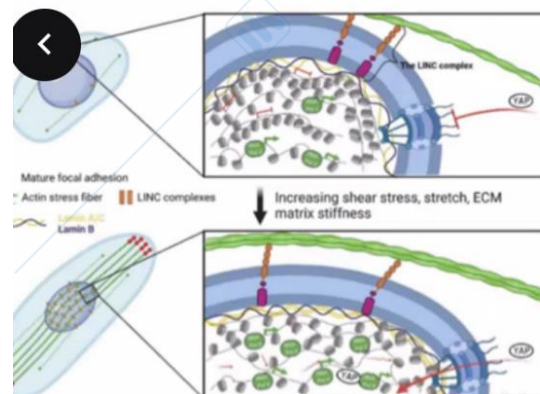
## LINC

Le forze meccaniche vengono sentite dalla cellula mediante il citoscheletro, che è legato alla lamina nucleare grazie alle LINC proteins, le quali formano un complesso (LINC complex) che entra in contatto con proteine SAN della membrana interna e vanno a contattare le nesprine (proteine

### LINC complex e meccano-trasduzione

L'involucro nucleare è in contatto con il citoscheletro.

Il **complesso LINC** trasduce stimoli meccanici.



Attraverso il complesso LINC, il nucleo risponde agli stimoli meccanici modificando:

- La sua forma/struttura;
- L'organizzazione della cromatina;
- L'espressione genica.

integrali della membrana esterna) che poi contattano i vari elementi del citoscheletro in modo specifico, alcune interagiscono con i microtubuli, altre con filamenti intermedi o microfilamenti.

Un esempio è il fattore YAP che, quando portato all'interno del nucleo può modulare l'espressione specifica di un gene.

## NUCLEOLO

Il nucleolo è l'unico sottocompartimento nucleare visibile al microscopio ottico, e **non è separato dal resto del nucleoplasma da alcuna struttura membranosa**.

È la sede delle regioni cromosomiche contenenti i **geni ripetuti per l'rRNA** e quindi della **trascrizione del pre-rRNA** (il precursore di tre dei quattro tipi di RNA ribosomale presenti nelle cellule eucariotiche: 28S, 18S e 5.8S) e della **formazione delle subunità ribosomali**.

La maggior parte delle cellule presenta un singolo nucleolo, ma in alcuni casi è possibile vederne più di uno.

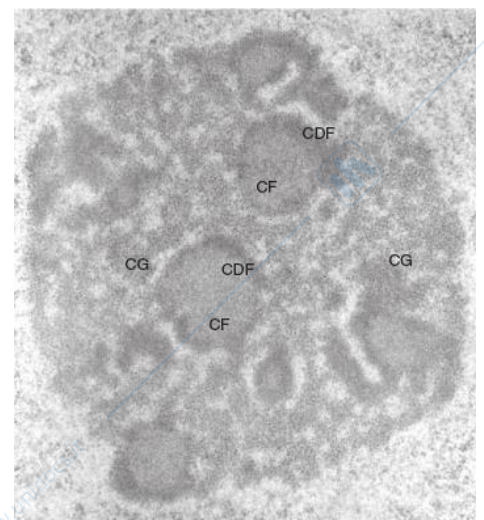
Le **dimensioni** del nucleolo sono correlate con l'**attività di sintesi** delle subunità ribosomali e quindi dell'attività traduzionale della cellula.

La formazione delle subunità ribosomali è un processo complesso e graduale, che richiede la trascrizione del pre-rRNA, la sua maturazione negli rRNA funzionanti e l'assemblaggio dei diversi rRNA con le diverse proteine ribosomali in modo da formare le due subunità, maggiore e minore.

Tale **processo** coinvolge **numerosi piccoli RNA catalitici** specifici noti come piccoli RNA nucleolari (**snoRNA**, small nucleolar RNA) e richiede il richiamo nel nucleolo **dell'rRNA 5S**, sintetizzato da geni al di fuori del nucleolo, così come l'**importazione** nel nucleo delle diverse **proteine** costituenti le due **subunità ribosomali**, sintetizzate nel citoplasma.

Dal punto di vista ultrastrutturale, il nucleolo appare costituito da **tre parti**:

- **i centri fibrillari (CF)**, che appaiono meno densamente colorati, probabilmente corrispondenti alle regioni del **DNA** contenenti i **geni ripetuti** per il grande pre-rRNA, denominate anche **DNA ribosomale** o regioni dell'organizzatore nucleolare (**NOR**);
- **i componenti fibrillari densi (CFD)**, più intensamente colorati e adiacenti ai precedenti, ricchi di una proteina denominata **fibrillarina** e coinvolti nella **maturazione** degli rRNA;
- **i componenti granulari (CG)**, costituiti dalle **subunità ribosomali** in via di formazione.



Sono state trovate all'interno del nucleolo **400 proteine differenti**, alcune delle quali ancora a funzione sconosciuta. Si sa, però, che il nucleolo regola la disponibilità di varie proteine che controllano il **ciclo cellulare**, quali **Mdm2**, che lega p53, **Cdc14**, una fosfatasi che promuove l'uscita dalla mitosi, e **Pch2**, un fattore che regola la progressione della meiosi. Queste evidenze suggeriscono che il nucleolo svolga una importante funzione di **regolatore** della proliferazione e della sopravvivenza cellulare.

**Dominanza nucleolare: fenomeno epigenetico** che si osserva nelle **cellule ibride interspecifiche**, cioè nelle cellule ottenute incrociando due specie diverse. Nelle cellule ibride, i geni rDNA provenienti da una specie sono **attivi nel nucleolo**, mentre quelli dell'altra specie sono **epigeneticamente silenziati** — da qui il termine **“dominanza nucleolare”** (una specie domina sull'altra nell'espressione dei rRNA).

Il **silenziamento** dei geni rDNA avviene attraverso **modificazioni epigenetiche**, cioè cambiamenti ereditabili dell'espressione genica **senza alterare la sequenza del DNA**.

I principali meccanismi coinvolti sono:

1. **Metilazione del DNA** → aggiunta di gruppi metilici (-CH<sub>3</sub>) su specifiche basi del DNA che inibisce la trascrizione.
2. **Modificazioni degli istoni** → variazioni chimiche delle proteine che impacchettano il DNA, rendendolo più o meno accessibile alla trascrizione.
3. **Intervento di RNA regolatori (siRNA e altri)** → piccoli RNA interferenti possono contribuire al mantenimento del silenziamento genico.
  - Nelle **piante** sono coinvolti **siRNA**;
  - Nei **mammiferi** agiscono **altri tipi di RNA non codificanti**.

Si verifica sia nel regno vegetale che in quello animale e fornisce un eccellente sistema per studiare come i geni vengono scelti per essere mantenuti silenziati epigeneticamente e come questo processo viene stabilito e regolato.

La dominanza nucleolare **non è casuale**: serve a **regolare il numero di geni rDNA attivi** in base alle **necessità della cellula**.

Questo fenomeno è interpretato come un meccanismo di **controllo del dosaggio genico**:

- La cellula **non ha bisogno di attivare tutti** i geni rRNA presenti (ce ne sono centinaia o migliaia).
- Mantiene attivi **solo quelli necessari** per produrre la quantità di ribosomi richiesta in quel momento.

In questo modo la cellula **risparmia energia** e **mantiene l'equilibrio** nella sintesi proteica.

Ricordo che anche i geni per i tRNA sono presenti nel nucleolo, dove vengono trascritti e inizialmente elaborati. Stessa cosa per la telomerasi.

## SOTTOCOMPARTIMENTI NUCLEARI

All'interno del NUCLEO sono stati individuati dei **sottocompartimenti** detti anche **corpi nucleari** e rappresentano un gruppo eterogeneo di strutture situate all'interno del nucleo, distinguibili grazie a criteri ultrastrutturali e biochimici. I corpi nucleari comprendono domini contenenti **materiale granulare e fibrillare**, organizzati in **piccole strutture** discrete, sferiche o allungate, e distinte dalla matrice nucleare.

I corpi nucleari sono coinvolti in differenti attività, quali lo **splicing**, la **sintesi**, la **maturazione** e lo **smistamento** dei diversi **RNA**. L'impalcatura della matrice nucleare risulta essere importante proprio perché guida le interazioni RNA-proteine e proteine-proteine che sono alla base della funzione di questi compartimenti.

Eccone elencati alcuni tra i più rilevanti:

- I **granuli intercromatinici** o **speckles**: distretti nei quali si localizza la maggioranza dei fattori di **splicing**. Normalmente ci sono circa 25-50 speckles per cellula, i quali svolgono la funzione di **deposito** dei componenti dello **spliceosoma**. In cellule con forte attività trascrizionale il loro numero è maggiore e sono di dimensioni minori; se la trascrizione è inibita, gli speckles diminuiscono di numero e aumentano di dimensioni.
- I **corpi di Cajal** (o **coiled bodies** per l'aspetto a gomito di fibre) sono strutture nucleari di circa 0,5  $\mu\text{m}$ . Sono presenti in molte cellule di animali e piante e contengono una proteina caratteristica, denominata **coilina**. Sono strutture **dinamiche**, altamente mobili, che si uniscono e si dividono in corpi più piccoli e più mobili. Il loro numero varia durante il ciclo cellulare ed è massimo nella **fase G1/S**; all'inizio della mitosi i corpi di Cajal non scompaiono, ma restano dispersi nel citoplasma, separati dai cromosomi condensati. Spesso sono vicini ai geni codificanti per gli istoni. Sono coinvolti nelle **modificazioni post-trascrizionali** degli snRNA e degli snoRNA, nella formazione delle particelle ribonucleoproteiche da questi costituite e nella **maturazione** degli mRNA per gli istoni.
- Gli **histone locus bodies** sono così denominati in quanto si formano unicamente attorno ai cluster dei geni codificanti per gli istoni. Sono infatti arricchiti in fattori coinvolti nella **maturazione** dell'estremità 3' dei trascritti per gli istoni e sono quindi coinvolti nella maturazione di tali **pre-mRNA**. Sono presenti solo nella fase S e sono in stretta associazione con i corpi di Cajal.
- I **corpi PML (promyelocytic leukemia bodies)** sono corpi di dimensioni comprese tra 0,5 e 1  $\mu\text{m}$ . In una cellula eucariotica ne sono **presenti 20-30**, ma all'entrata in mitosi il loro numero diminuisce in quanto si aggregano in strutture di maggiori dimensioni. Il loro nome deriva dalla presenza di una proteina identificata in pazienti affetti da leucemia promielocitica. I corpi PML sembrano implicati in processi diversi quali la **regolazione trascrizionale**, la **riparazione** del DNA, l'**apoptosi** e la **difesa** da infezioni virali.
- I **corpi GEM (gemini bodies)** non sono presenti in tutti i tipi cellulari e contengono proteine simili a quelle presenti nei corpi di Cajal. Per questo motivo si ritiene che i GEM possano svolgere funzioni simili ai corpi di Cajal.