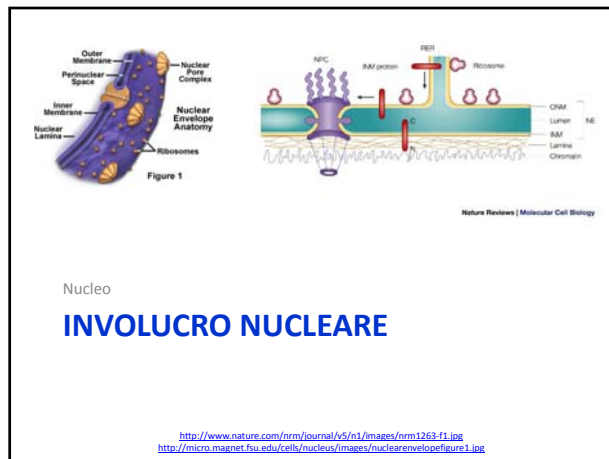


Nucleo

Organello che *contiene il materiale genetico di una cellula eucariote*

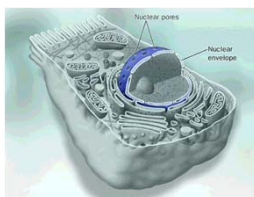


Nucleo

INVOLUCRO NUCLEARE

<http://www.nature.com/nrm/journal/v5/n1/images/nrm1263-f1.jpg>
<http://micro.magnet.fsu.edu/cells/nucleus/images/nuclearenvelopefigure1.jpg>

INVOLUCRO NUCLEARE (1)

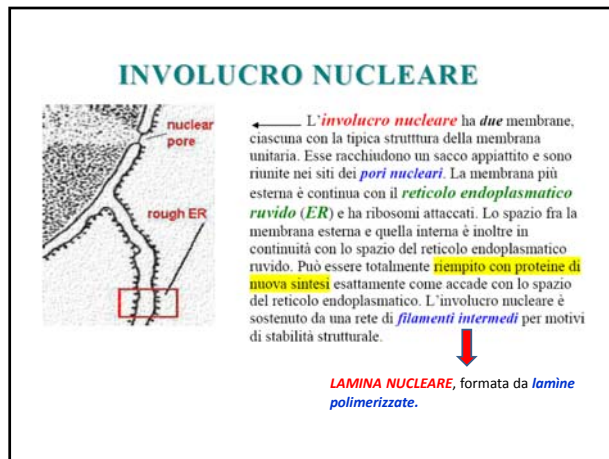
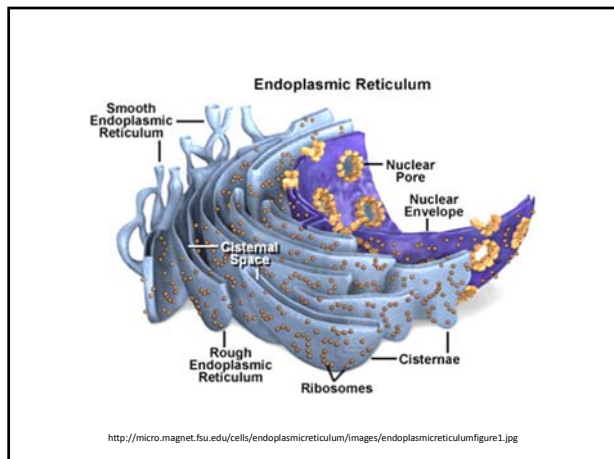


- ✚ L'involucro nucleare, l'interfaccia tra il citoplasma e il nucleo, è una **doppia membrana** con un **foglietto interno** e un **foglietto esterno**.
- ✚ Il foglietto interno e quell'esterno si riuniscono all'altezza dei **pori nucleari**
- ✚ L'involucro si **frammenta all'inizio della prometafase** della mitosi o della meiosi e **si riforma di nuovo nella telofase**.

Geoffrey M. Cooper: The Cell: A Molecular Approach

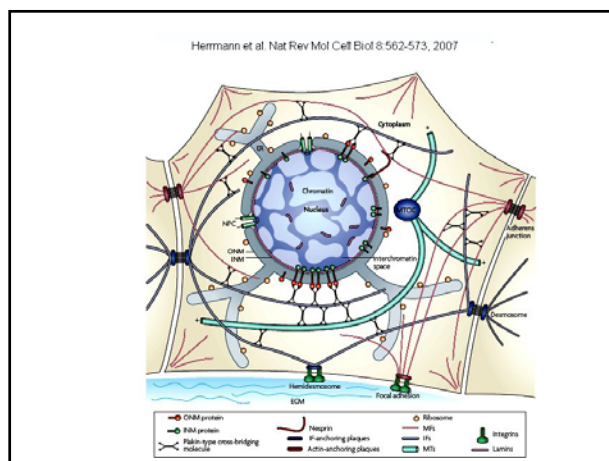
INVOLUCRO NUCLEARE (2)

- ✚ Caratteristica esclusiva delle cellule **eucariotiche**.
- ✚ E' costituito da una doppia membrana che racchiude il genoma.
- ✚ La **membrana nucleare esterna** è in **diretta continuità con il reticolo endoplasmatico** ma contiene proteine specializzate (ad es. quelle dei pori nucleari) in concentrazione molto superiore a quella del reticolo.
- ✚ La **membrana interna** è rivestita all'interno dalla **lamina nucleare**, una rete di filamenti intermedi che stabilizza la cisterna nucleare ed è coinvolta nell'organizzazione e funzione della cromatina.



Inviluppo nucleare -3

- ⚡ La scorsa decade ha visto un completo **ripensamento** della tradizionale visione dell'inviluppo nucleare come **soltanto un involucro passivo per i cromosomi**.
- ⚡ La convergenza di diverse linee di ricerca di base e clinica ha rivelato **ruoli addizionali** sia nel **segnalamento** che nella **progressione mitotica**.
- ⚡ Sta diventando evidente che l'**inviluppo nucleare** definisce non solo l'**organizzazione nucleare** ma anche quella del **citoscheletro** e perciò **integra morfologica e funzionalmente l'architettura nucleare con quella citoplasmatica**.



PORI NUCLEARI

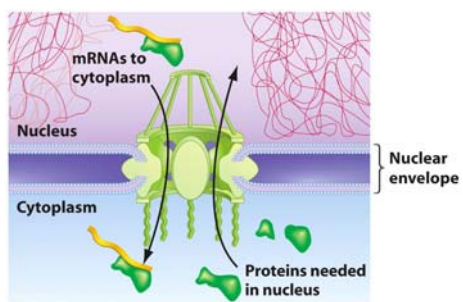


Figure 7-23 Biological Science, 3/e © 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.

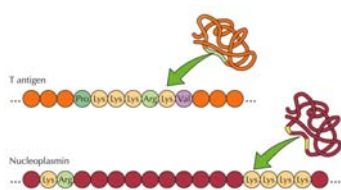
http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lectures/nuclear_pores.jpg

Trasporto verso e dal nucleo (1)

- Il trasporto di proteine dal citoplasma verso il nucleo e il movimento di macromolecole, incluso gli mRNAs, i tRNAs e le subunità ribosomiali, dal nucleo, si svolge attraverso i pori nucleari, che attraversano entrambe le membrane dell'involucro nucleare.
- L'importazione delle proteine nel nucleo condivide alcuni aspetti fondamentali con l'importazione delle proteine verso gli altri organelli.
- Ad esempio, le proteine nucleari importate contengono sequenze aminoacidiche specifiche di indirizzamento: SEQUENZE DI LOCALIZZAZIONE NUCLEARE.
- In molte proteine nucleari i segnali consistono in una o due corte sequenze di aminoacidi che sono ricche degli aminoacidi carichi positivamente lisina e arginina.
- Tuttavia, le proteine sono importate nel nucleo nello stato ripiegato e quindi il sistema di importazione differisce da quello per l'importazione nei mitocondri, cloroplasti, perossisomi o RE, in cui le proteine si trovano non ripiegate durante la traslocazione.

Lodish et al., 7^a ed.

SEGNALI DI LOCALIZZAZIONE NUCLEARI



Il segnale di localizzazione nucleare dell'**antigene T** è una lunga stringa di aminoacidi. Viceversa, il segnale di localizzazione nucleare della **nucleoplasmina** è bipartito, e consiste in una sequenza Lys-Arg, seguita da una sequenza Lys-Lys-Lys-Lys localizzata 10 aminoacidi più a valle.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9927/figure/A1334/>

Table 12-3 Some Typical Signal Sequences

FUNCTION OF SIGNAL SEQUENCE	EXAMPLE OF SIGNAL SEQUENCE
Import into nucleus	-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-
Export from nucleus	-Leu-Ala-Leu-Lys-Leu-Ala-Gly-Leu-Asp-Ile
Import into mitochondria	*H ₂ N-Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe-Phe-Lys-Pro-Ala-Thr-Arg-Thr-Leu-Cys-Ser-Ser-Arg-Tyr-Leu-Leu-
Import into plastid	*H ₂ N-Met-Val-Ala-Met-Ala-Met-Ala-Ser-Leu-Gln-Ser-Ser-Met-Ser-Ser-Leu-Ser-Leu-Ser-Ser-Asn-Ser-Phe-Leu-Gly-Gln-Pro-Leu-Ser-Pro-Ile-Thr-Leu-Ser-Pro-Phe-Leu-Gln-Gly-
Import into peroxisomes	-Ser-Lys-Leu-COO-
Import into ER	*H ₂ N-Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser-Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala-Thr-Glu-Ala-Glu-Gln-Leu-Thr-Lys-Cys-Glu-Val-Phe-Gln-
Return to ER	-Lys-Asp-Glu-Leu-COO-

Some characteristic features of the different classes of signal sequences are highlighted in color. Where they are known to be important for the function of the signal sequence, positively charged amino acids are shown in red and negatively charged amino acids are shown in green. Similarly, important hydrophobic amino acids are shown in yellow and hydroxylated amino acids are shown in blue. *H₂N indicates the N-terminus of a protein; COO⁻ indicates the C-terminus.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26907/table/A2150/Treport-objectonly>

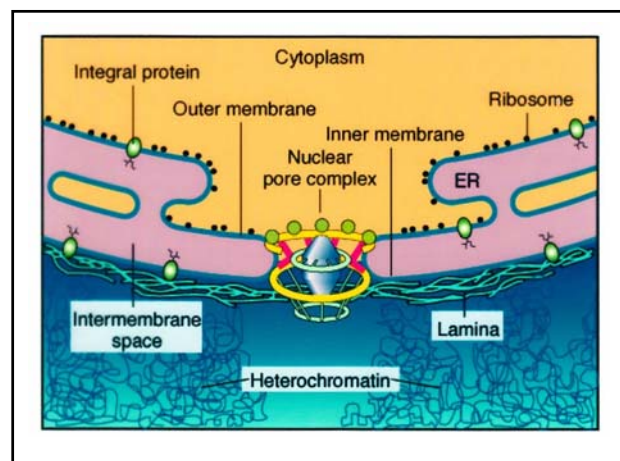
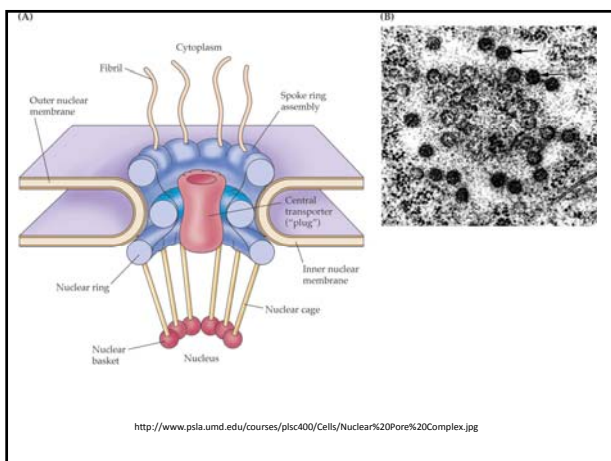
Complesso dei pori nucleari (1)

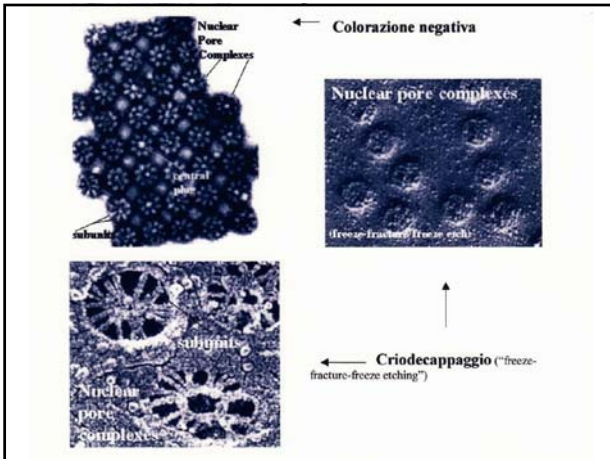
- ✚ L'involucro nucleare è attraversato da numerosi pori.
- ✚ Ogni poro è formato da una struttura elaborata, il **COMPLESSO DEI PORI NUCLEARI («Nuclear Pore Complex, NPC», NPC)**, uno dei più grandi complessi proteici della cellula (60-80 MDa nei Vertebrati, circa 16 volte maggiore di un ribosoma).
- ✚ Un NPC contiene molteplici copie di circa 30 proteine diverse: **nucleoporine**.
- ✚ Al ME si vede che i NPCs hanno una **struttura ad anello di forma ottagonale** inserita nella struttura dell'involucro nucleare che circonda un poro in gran parte acquoso

Lodish et al., 7^a ed.

Complesso dei pori nucleari (2)

- ✚ Otto filamenti lunghi circa 100 nm si estendono verso il nucleoplasma; le loro estremità distali sono collegate da un anello terminale, formando una struttura detta «canestro nucleare» («nuclear basket»).
- ✚ Dei filamenti citoplasmatici si estendono dal versante citoplasmatico del NPC verso il citosol.

Lodish et al., 7^a ed.



Come fa il complesso del poro nucleare a trasportare materiale dal e verso il nucleo?

Il poro funge da canale pieno d'acqua e ha un diametro effettivo di 10 nm. Perciò il trasporto dal e verso il nucleo può avere luogo in diversi modi:

Diffusione passiva

Trasporto attivo

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9927/figure/A133/>

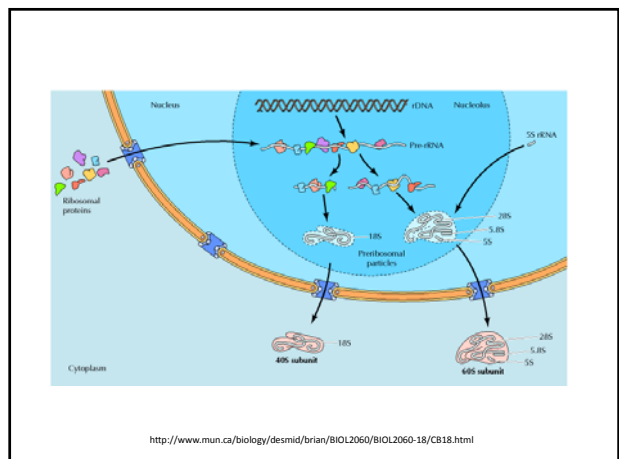
• Diffusione

Aggiungendo molecole di dimensioni diverse si è visto che le molecole di:

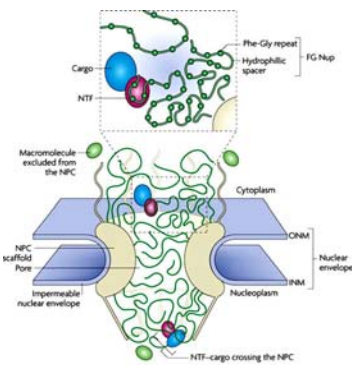
MW: 5,000	Diffondono liberamente
MW: 17,000	2 min per ristabilire l'equilibrio
MW: 44,000	30 min per ristabilire l'equilibrio
MW: 60,000	Non si possono muovere per diffusione

MW: "molecular weight"; peso molecolare

Questo concetto è importante perché significa che i ribosomi maturi (con le due subunità riunite) non possono rientrare nel nucleo. Perciò la sintesi delle proteine (traduzione del mRNA) deve avere luogo fuori dal nucleo.



Il complesso dei pori nucleari funziona come un «cancello virtuale»



The outer and inner nuclear membranes (ONM and INM, respectively) of the nuclear envelope join to form a ring-shaped pore where the nuclear pore complex (NPC) resides. At the NPC, the nucleus and cytoplasm are connected by a channel, which is filled with flexible, filamentous Phe-Gly nucleoporins (FG Nups). Spurious macromolecules are physically excluded from entering the densely packed FG Nup meshwork. Nuclear transport factor (NTF)-bound cargo can enter the channel from either its cytoplasmic or nucleoplasmic side and hop between binding sites on the FG Nups until they return to the original compartment or reach the opposite side of the NPC.

Strambio-De-Castilla C, Niepel M, Rout MP. The nuclear pore complex: bridging nuclear transport and gene regulation. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010 Jul;11(7):490-501.

Nature Reviews | Molecular Cell Biology

Trasporto attraverso il complesso dei pori nucleari (1)

- ⚡ Gli ioni, i piccoli metaboliti e le proteine globulari fino a circa 40 kDa possono diffondere passivamente attraverso la regione centrale acquosa del CP.
- ⚡ Tuttavia, le proteine di grandi dimensioni e i complessi ribonucleoproteici **non possono diffondere** verso o fuori dal nucleo.
- ⚡ Invece, queste molecole vengono **trasportate attivamente** attraverso il NPC con la **collaborazione di proteine di trasporto solubili che si legano alle macromolecole e inoltre interagiscono con le nucleoporine**.
- ⚡ Ogni minuto ogni NPC trasporta 60.000 molecole di proteine verso il nucleo, 20-250 molecole di mRNA, 10-20 subunità ribosomali e 1000 tRNAs fuori dal nucleo.

Lodish et al., 7^a ed.

SEMINARIO

Trasporto attraverso il complesso dei pori nucleari (2)

- ⚡ Tre tipi di nucleoporine: **Nucleoporine strutturali**, **Nucleoporine di membrana** e **FG-Nucleoporine**.
- ⚡ Le **nucleoporine strutturali** formano l'impalcatura del poro, che è un anello con un asse di simmetria ottagonale che attraversa entrambe le membrane dell'involucro nucleare creando un anello.
- ⚡ Le membrane interna ed esterna dell'involucro sono collegate al NPC mediante una regione altamente incurvata di membrana in cui sono inserite le **nucleoporine di membrana**.
- ⚡ Un insieme di sette nucleoporine strutturali forma una struttura a forma di Y che ha circa la dimensione di un ribosoma: **complesso Y**.
- ⚡ Sedici copie di complessi Y formano la struttura base di impalcatura del poro, che ha simmetria bilaterale attraverso l'involucro nucleare e simmetria di rotazione ottagonale nel piano dell'involucro.

Lodish et al., 7^a ed.

SEMINARIO

Trasporto attraverso il complesso dei pori nucleari (3)

- ⚡ Le **FG-nucleoporine** che rivestono il canale del CPN e che si trovano associate al canestro nucleare e ai filamenti citoplasmatici, **contengono molteplici ripetizioni di corte sequenze idrofobiche ricche in residui di fenilalanina (F) e di glicina (G)**.
- ⚡ Si ritiene che le ripetizioni FG, idrofobiche, si trovino inserite in estese regioni, altrimenti idrofiliche, delle catene polipeptidiche che riempiono il canale il canale di trasporto centrale.
- ⚡ Le FG-nucleoporine sono fondamentali per la funzione dei NPC: si pensa che formino una struttura gelificata flessibile che permette la diffusione di piccole molecole mentre esclude le proteine idrofiliche di dimensioni superiori a 40 kDa se non sono associate a proteine chaperone.

Lodish et al., 7^a ed.

SEMINARIO**IMPORTAZIONE attraverso il complesso dei pori nucleari (1)**

- Tutte le proteine nucleari (istoni, fattori di trascrizione, DNA pol e RNAPol, ecc) sono sintetizzate nel citoplasma ed importate verso il nucleo attraverso i NPCs.
- Queste proteine contengono un **segnale di localizzazione nucleare (NLS)** che indirizza il loro trasporto selettivo verso il nucleo.
- Il loro trasporto richiede due componenti citoplasmatiche: le proteine **Ran** e un **recettore per il trasporto nucleare**.
- Ran**: piccola proteina G monomerica che esiste sia nella conformazione legata a GTP che legata a GDP.
- Il **recettore per il trasporto nucleare** si lega sia al NLS sulla proteina da trasportare che, temporaneamente, alle ripetizioni FG delle nucleoporine, attraversando rapidamente la matrice ricca di ripetizioni FG del canale centrale del poro.

Lodish et al., 7^a ed.**SEMINARIO****IMPORTAZIONE attraverso il complesso dei pori nucleari (2)**

- Una volta traslocato attraverso il poro, il recettore per il trasporto nucleare interagisce con Ran-GTP, subendo una modificazione conformazionale che lo distacca dal NLS, rilasciando la proteina trasportata nel nucleoplasma.
- Il complesso recettore per il trasporto nucleare-Ran-GTP allora ritorna al citoplasma per diffusione attraverso il NPC.
- Nel lato citoplasmatico Ran interagisce con la «GTPase-activating protein, Ran-GAP», un componente dei filamenti citoplasmatici del NPC.
- Ciò stimola l'idrolisi a GDP del GTP legato a Ran; Ran prende una conformazione a bassa affinità per il recettore per il trasporto nucleare che viene rilasciato nel citosol, pronto per un altro giro.

Lodish et al., 7^a ed.**SEMINARIO****IMPORTAZIONE attraverso il complesso dei pori nucleari (3)**

- Il Ran-GDP viaggia indietro tramite i pori verso il nucleoplasma dove trova un fattore specifico di scambio «Guanine nucleotide exchange factor, Ran-GEF» che induce Ran a rilasciare il GDP legato e a scambiarlo con GTP.
- Il risultato finale di questa serie di reazioni è **l'accoppiamento dell'idrolisi del GTP al trasferimento di una proteina contenente un NLS dal citoplasma al nucleoplasma**, così fornendo la forza motrice per il trasporto nucleare.

Lodish et al., 7^a ed.**SEMINARIO****ESPORTAZIONE attraverso il complesso dei pori nucleari (1)**

- Diverse proteine, tRNAs e subunità ribosomiali usano le per passare dal nucleo al citoplasma un meccanismo simile a quello per l'importazione delle proteine dal citoplasma al nucleo.
- Le proteine che fanno da navetta tra il citoplasma e il nucleo contengono, oltre al NLS, un «**Nuclear Export Signal, NES**». Il più noto ha una sequenza ricca di leucine.
- Un recettore di trasporto nucleare, **esportina-1**, prima forma un complesso con Ran-GTP e in seguito si lega al NES ricco di leucina di una proteina da trasportare. Il legame provoca un'alterazione conformazionale dell'esportina-1 che aumenta la sua affinità verso il NES: si forma un complesso di carico trimolecolare.
- Anche l'esportina-1 forma legami temporanei con le ripetizioni FG delle FG-nucleoporine e diffonde lungo il NPC.
- Il complesso si dissocia quando trova il Ran-GAP dei filamenti citoplasmatici del NPC che stimola Ran a idrolizzare il GTP legato, spostandolo verso una conformazione a bassa affinità per l'esportina-1.
- A sua volta, l'esportina-1 passa ad una conformazione a bassa affinità per il NES, rilasciando la proteina trasportata nel citosol.

Lodish et al., 7^a ed.

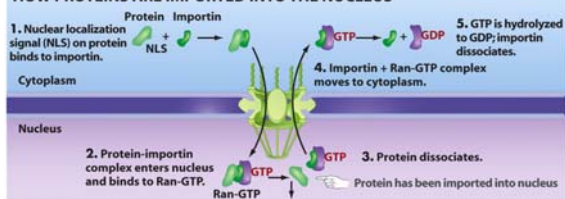
SEMINARIO

ESPORTAZIONE attraverso il complesso dei pori nucleari (2)

- Un simile meccanismo di navetta, esportina-1, Ran e GTP-dipendente, esporta **tRNAs**, le **subunità dei ribosomi dal nucleo** ed alcuni mRNA.
- La maggior parte degli **mRNA** tuttavia viene esportato in modo Ran-indipendente.
- Questi mRNA sono associati a proteine specifiche hnRNP formando un «messenger ribonuclear protein complex, mRNP» che è riconosciuto da un «mRNP exporter», che non richiede legame con Ran.
- Nel lato citoplasmatico il trasportatore si dissocia dal complesso mediante interazione con un enzima, la RNA helicase, che si muove lungo le molecole di RNA, separando catene di RNA a doppio filamento e dissociando i complessi RNA-proteine mediante idrolisi dell'ATP.

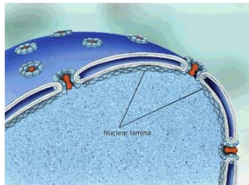
Lodish et al., 7^a ed.

HOW PROTEINS ARE IMPORTED INTO THE NUCLEUS



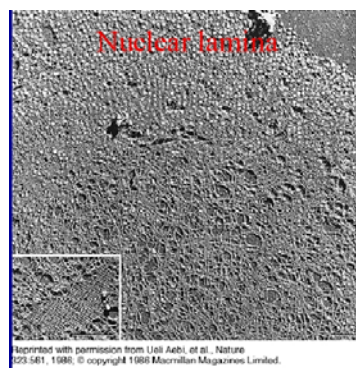
<http://www.uic.edu/classes/bios/bios100/lectures/nls.jpg>

LAMINA NUCLEARE



- Negli Eucarioti la **lamina nucleare riveste dall'interno il foglietto interno dell'involucro nucleare**.
- E' costituita da filamenti intermedi (citoscheletro) intrecciati. Essi appartengono alla famiglia delle **lamine nucleari**.
- La degradazione della lamina nucleare precede la scomparsa dell'involucro nucleare all'inizio della prometafase.**

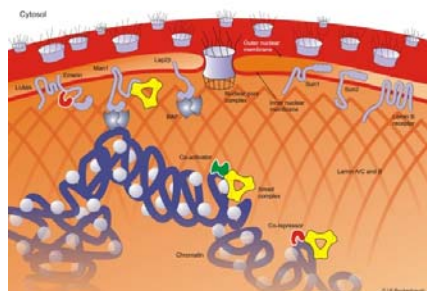
Geoffrey M. Cooper: The Cell: A Molecular Approach



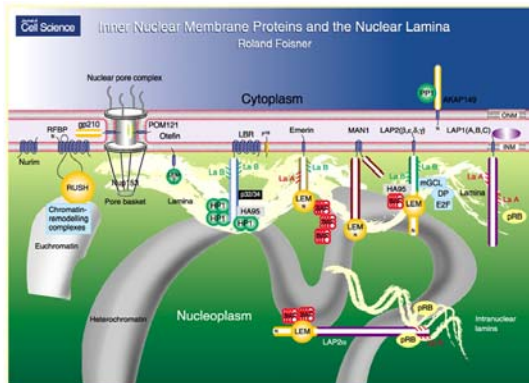
Reprinted with permission from Liell Aebi, et al., Nature 225:561, 1980. © copyright 1980 Macmillan Magazines Limited.

[http://ge.lf1.cuni.cz/heslo/prikлады/files/tmp/2.jpg](http://ge.lf1.cuni.cz/heslo/prikklady/files/tmp/2.jpg)

Lamina nucleare



<http://userpage.chemie.fu-berlin.de/biochemie/agknaus/SNE.html>



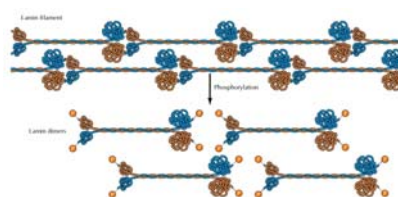
<http://npl.hgu.mrc.ac.uk/images/full/lamina.jpg>

Lamina nucleare

La membrana interna della cisterna nucleare sta vicino ad uno strato di filamenti sottili che circonda il materiale nucleare ovunque tranne che nei pori nucleari. Questi filamenti possono fungere da filamenti di stabilizzazione. Questa struttura è chiamata "lamina nucleare" ed ha le seguenti caratteristiche strutturali e funzionali:

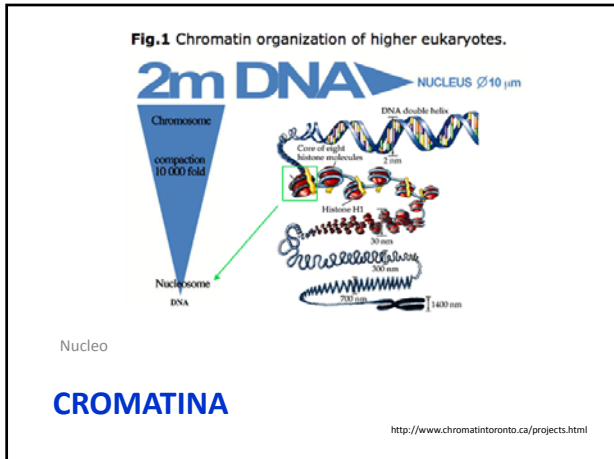
- Consiste di **filamenti intermedi**, spessi 30-100 nm.
- Questi filamenti intermedi sono polimeri di **lamine**, proteine con peso molecolare da 60-75 kD
- **Lamine di tipo A** si trovano all'interno, vicino al nucleoplasma (materiale nucleolo-proteico). Le **lamine di tipo B** si trovano vicino alla membrana nucleare interna; si possono legare a proteine integrali all'interno di questa membrana.
- Si ritiene che le lamine siano coinvolte nell'**organizzazione funzionale del nucleo**.
- Possono giocare un ruolo sia nell'**assemblaggio** che nel **disassemblaggio** della lamina nucleare prima e dopo la mitosi. La loro **fosforilazione** scatena il disassemblaggio della lamina nucleare e induce lo smembramento della cisterna nucleare in vescicole. La **defosforilazione** ha l'effetto contrario e permette al cisterna nucleare di riformarsi. (N.B. Se vengono iniettati nelle cellule anticorpi contro le lamine i nuclei non si riformano dopo la divisione cellulare. Quindi queste lamine sono essenziali per l'assemblaggio).

Dissoluzione della lamina nucleare nella profase della mitosi



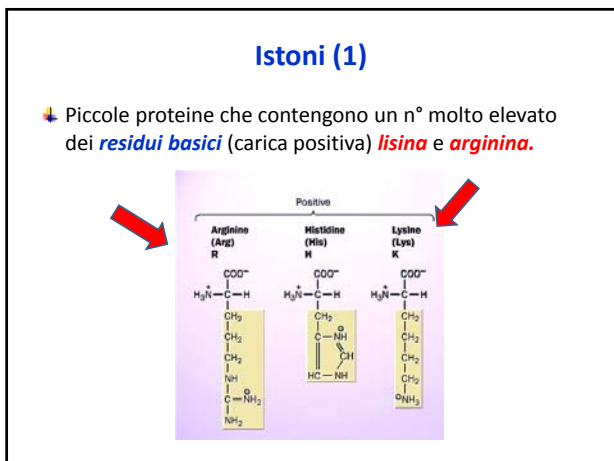
La lamina nucleare consiste in una rete di **filamenti di lamina**. Nella mitosi, la Cdc2 ed altre proteina chinasi fosforilano le lamine, provocando la dissociazione dei filamenti in dimeri di lamina liberi.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9890/figure/A1377/>



Nucleosomi: unità fondamentali della struttura dei cromosomi (1)

- Le **proteine che si legano al DNA per formare un cromosoma eucariotico** si dividono tradizionalmente in due classi:
 - Istoni**
 - Proteine non istoniche**
- Il **complesso** formato da entrambe le classi di **proteine con il DNA nucleare** è detto **CROMATINA**.
- Gli **istoni** sono presenti in tale quantità nelle cellule (circa 60 milioni di molecole di ogni tipo per cellula umana) che la loro **massa totale nella cromatina è circa uguale a quella del DNA**.



Istoni (2)

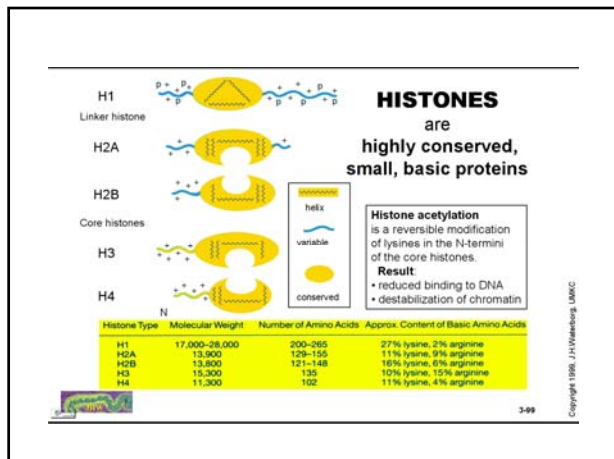
Gli istoni sono suddivisi in 5 classi in base al **rapporto arginina/lisina**:

Table 24-3

Histone	Molecular weight	Number of amino acid residues	Content of basic amino acids (% of total)	
			Lys	Arg
H1*	21,130	223	29.5	1.3
H2A*	13,960	129	10.9	9.3
H2B*	13,774	125	16.0	6.4
H3	15,273	135	9.6	13.3
H4	11,236	102	10.8	13.7

*The sizes of these histones vary somewhat from species to species. The numbers given here are for bovine histones.

<http://www.siumed.edu/~bbartholomew/images/Lehninger/Table%2024-03.GIF>



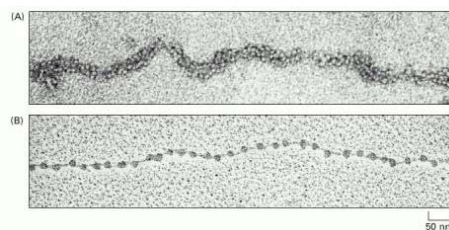
Istoni (3)

Le sequenze AA degli istoni (soprattutto H3 e H4) sono state estremamente conservate nell'evoluzione:

- Una ragione è che **gli istoni interagiscono con il DNA che ha una struttura simile in tutti gli organismi.**
- Un'altra è che **quasi tutti gli AA di un istone sono coinvolti con interazioni con altre molecole** (DNA e altri istoni).
- Solo pochi AA di un istone possono essere sostituiti senza compromettere seriamente la loro funzione.

Nucleosomi: unità fondamentali della struttura dei cromosomi (2)

- ⚡ Gli istoni sono i responsabili del 1° livello (il più elementare) dell'organizzazione dei cromosomi: **NUCLEOSOMA**
- ⚡ Nei nuclei interfasici la maggior parte della cromatina si trova sotto forma di una **fibra** con **diametro di circa 30 nm**.
- ⚡ Sottoposta a trattamenti per svolgere parzialmente, la fibra si presenta al ME come una serie di «**collana di perle**».
- Il filo è il DNA.
- Ogni perla è una particella di nucleosoma.



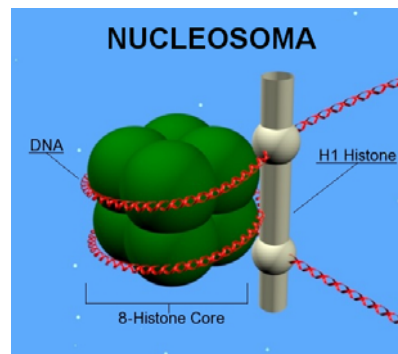
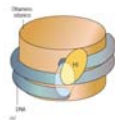
Nucleosomi osservati al microscopio elettronico

- (A) La cromatina isolata direttamente da un nucleo in interfase appare come un filamento di spessore 30 nm.
- (B) Questa immagine al microscopio elettronico mostra una porzione di cromatina che è stata sperimentalmente disimpaccata, o decondensata, dopo isolamento per mettere in evidenza i nucleosomi. (A, gentilmente ceduta da Barbara Hamkalo; B, gentilmente ceduta da Victoria Foe.)

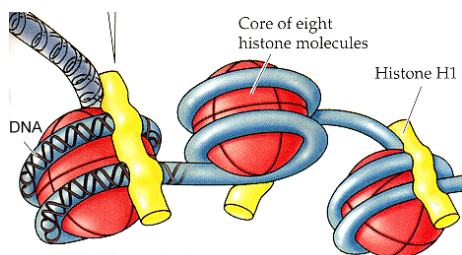
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26834/figure/A631/?report=objectonly>

Struttura del nucleosoma

- Ogni **nucleosoma** contiene una particella centrale; «core» formata da **146 coppie di basi di DNA superavvolto** che gira per quasi 2 volte **attorno ad un complesso** a forma di disco **formato da 8 molecole di istoni (due di ciascuno degli istoni H2A, H2B, H3 e H4)**.
- L'ultimo istone, **H1**, è localizzato fuori dal «core»:
 - Istone di connessione** – in quanto **lega e stabilizza una parte del DNA di connessione (DNA linker) che unisce due particelle centrali (core) successive**.

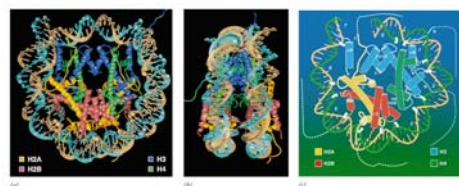


<http://www.molecularstation.com/molecular-biology-images/502-dna-pictures/60-nucleosome.html>

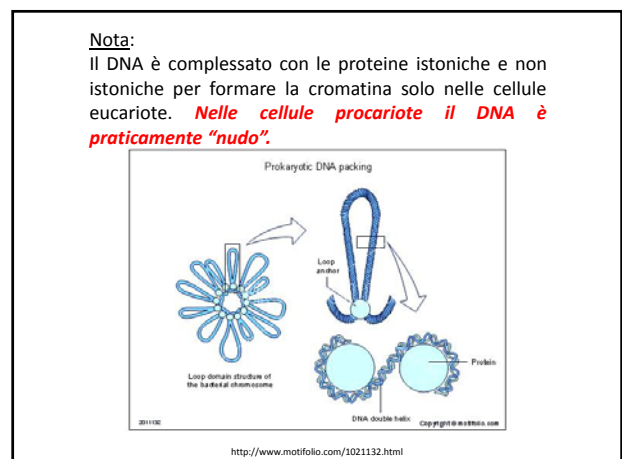
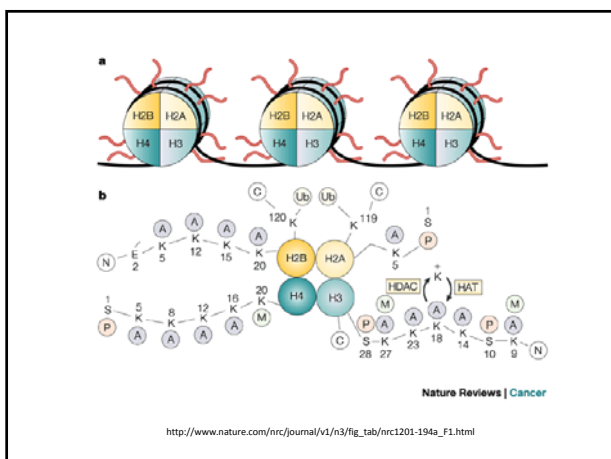
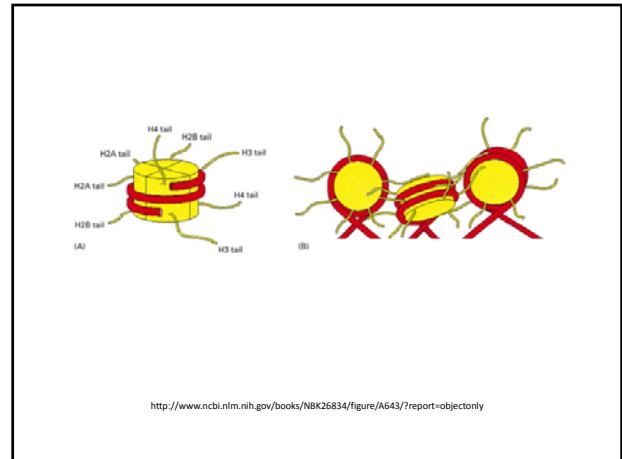
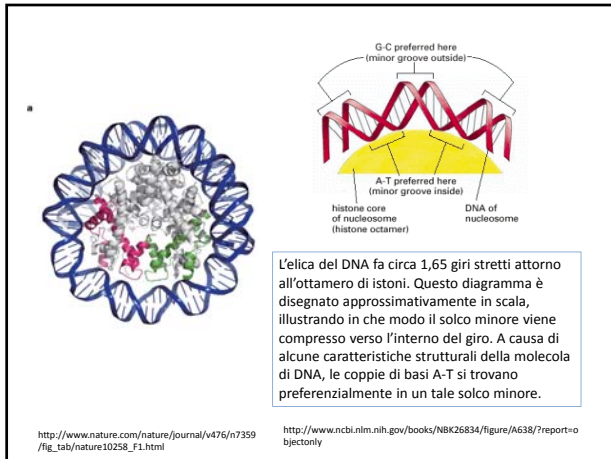


http://biology.kenyon.edu/courses/biol114/Chap01/chrom_struct.html

Struttura tridimensionale di un nucleosoma



- Le 8 molecole istoniche che formano il «core» del nucleosoma sono organizzate in 4 eterodimeri: due dimeri H2A-H2B e e due dimeri H3-H4.
- La dimerizzazione è mediata dai domini C-terminali, che consistono principalmente di regioni ad α -elica, ripiegati in una massa compatta nel core del nucleosoma.
- Invece, **il segmento N-terminale di ogni istone** (ed anche il segmento C-terminale dei H2A) **ha la forma di una lunga coda flessibile che si estende al di fuori della doppia elica di DNA**.
 - Queste **coda** sono sottoposte ad una serie di modificazioni covalenti che hanno funzioni importantissime per la struttura e funzionamento del DNA



Cromatina

LIVELLI SUPERIORI DI ORGANIZZAZIONE

Livelli di organizzazione della cromatina (1)

- ✚ 1° livello: avvolgimento della molecola di DNA intorno alla particella core del nucleosoma: **10 nm** di diametro.
- ✚ 2° livello: Fibra di circa **30 nm**: aumenta di 6x il grado di compattazione del DNA (2 modelli suggeriti, in base alla posizione dei nucleosomi lungo la fibra):
 - La formazione della fibra da 30 nm dipende dall'interazione tra istoni dei nucleosomi vicini (sia istoni linker che istoni del core).

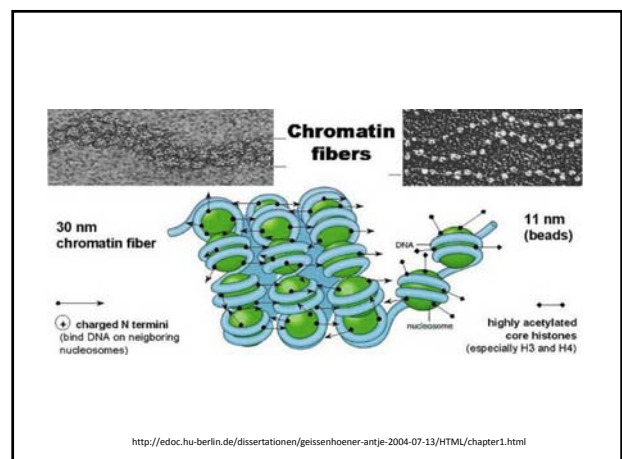
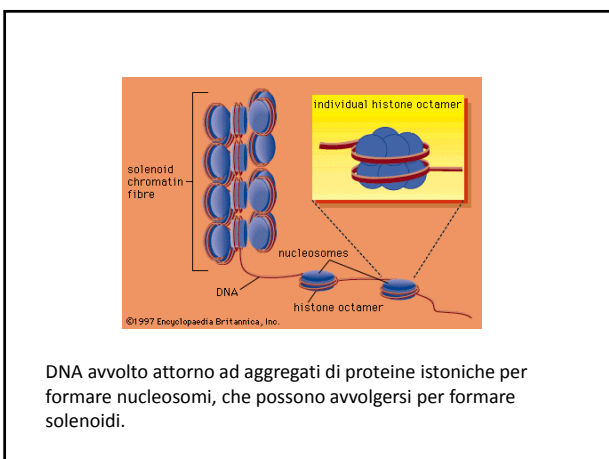
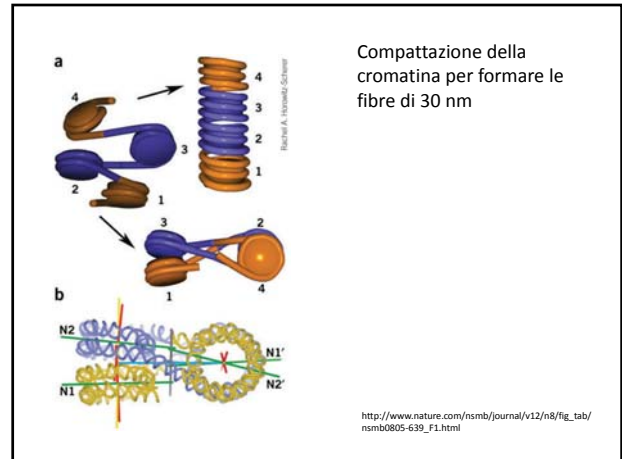
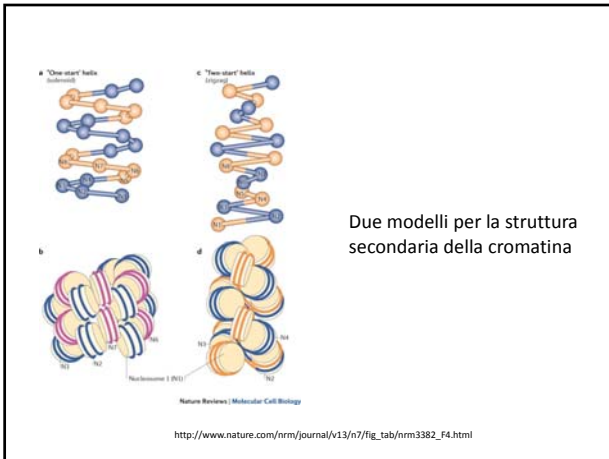
Livelli di organizzazione della cromatina (2)

- ✚ La cromatina nelle regioni dei cromosomi che non vengono trascritte o replicate si trova predominantemente nella forma condensata della fibra di 30 nm e in strutture di ordine superiore di ripiegamento.
- ✚ Viceversa, si ritiene che le regioni della cromatina attivamente trascritte della cromatina assumano la forma distesa de «collanina di perle».

Lodish et al., 7ª ed.

Struttura della fibra di 30 nm

- ✚ Gli studi attuali suggeriscono che la fibra di 30 nm abbia una struttura a nastro avvolto a zig-zag nel quale il DNA linker è presente in uno stato lineare e disteso che cambia direzione tra nucleosomi successivi, portando alla formazione di due file di nucleosomi adiacenti.

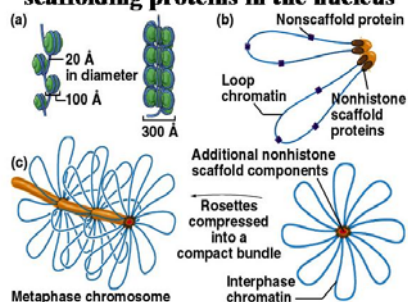


Livelli di organizzazione della cromatina (3)

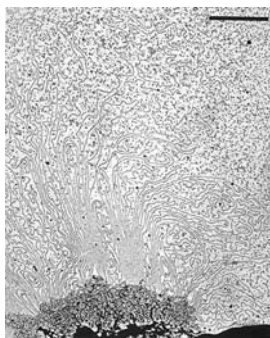
- + **3° livello:** Organizzazione della fibra di cromatina da 30 nm in una serie di ampie **anse superavvolte** – domini – che possono essere compattate in fibre più spesse (**80 – 100 nm**). Le anse di DNA sono apparentemente agganciate alla loro base a proteine che formano un'impalcatura organizzata: matrice.
- + **4° livello:** cromosoma mitotico: 1 µm di cromosoma contiene circa 1 cm di DNA (compattazione di 10,000:1).

 - Modalità di compattazione poco nota.

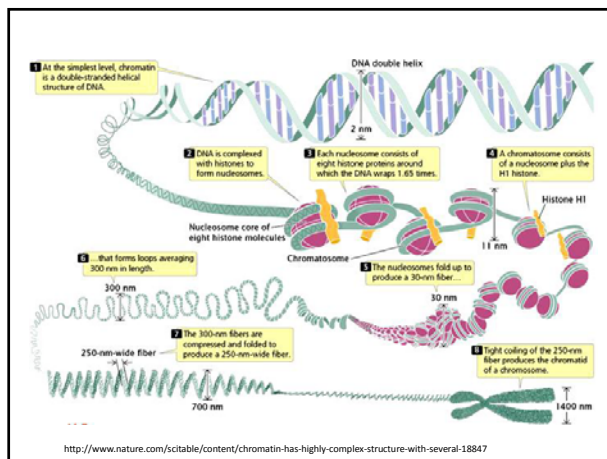
DNA is organized into chromosomes by scaffolding proteins in the nucleus



Anse di cromatina: un livello superiore di struttura della cromatina.



<http://cngm.stanford.edu/biochem201/Slides/Chromatin%20structure/03%20Loops%20of%20Chromosome%20DNA.JPG>



<http://www.nature.com/scitable/content/chromatin-has-highly-complex-structure-with-several-18847>

DNA packaging into chromatin and chromosome

DNA wraps around histones, forming nucleosomes. Nucleosomes condense into a chromatin fibre. The chromatin fibre condenses further to form a chromosome.

© 2008 Encyclopaedia Britannica, Inc.

Il DNA si avvolge attorno a proteine chiamate *istoni* per formare unità note come *nucleosomi*. Queste unità si condensano in una *fibra di cromatina*, la quale si condensa ulteriormente per formare un *cromosoma*.

Studi di epigenetica hanno rivelato che modificazioni chimiche degli istoni possono essere ereditate e definiscono come l'informazione dei geni viene espressa ed usata dalle cellule.

(<http://www.britannica.com/Ebchecked/topic-art/167063/846/DNA-wrapped-around-clusters-of-histone-proteins-to-form-nucleosomes>)

Short region of DNA double helix (200 bp) → "Beads-on-a-string" form of chromatin (11 nm) → 30-nm chromatin fiber of packed nucleosomes → Extended scaffold-associated form (300 nm) → Condensed scaffold-associated form (700 nm) → Metaphase chromosome (1400 nm).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21576/figure/A2272/>

The "Histone Code" Hypothesis
(Strahl and Allis, 2000, Nature, vol. 403, 41-45)

Histone tails can be modified in many different ways...

- Lysine acetylation (HAT/HAC)
- Lysine/Arginine Methylation (HMT)
- Serine/Threonine phosphorylation (Kinase/phosphatase)

Ubiquitination is also observed, as well as modification of DNA or of transcription factors.

...and these modifications are associated with many different cellular functions ...

... probably because modifying enzymes, nucleosome remodeling complexes (NuRcs) and downstream effector complexes "read" each others' "marks" on the histone tails.

Le code degli istoni possono essere modificate in molti modi diversi ...

... e queste modificazioni sono associate a molte e diverse funzioni cellulari...

... probabilmente a causa di enzimi che modificano la cromatina, complessi di rimodellamento dei nucleosomi (NuRCs) e complessi effettori a valle dei geni, «leggono» le impronte lasciate dagli altri sulle code degli istoni.

http://www.biochem.umd.edu/biochem/kahn/teach_res/

Cromatina

ETEROCROMATINA E EUCROMATINA: DEFINIZIONE FUNZIONALE

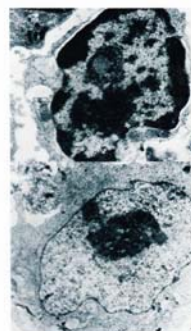
http://missinglink.ucsf.edu/lm/ids_101_histo_resource/images/cell_structure_lab_micrograph_8.jpg
http://medcell.med.yale.edu/histology/cell_lab/images/euchromatin_and_heterochromatin.jpg

Eterocromatina e eucromatina (1)

- Alla fine della mitosi, la maggior parte della cromatina che compone i cromosomi mitotici altamente condensati torna ad una condizione più distesa, tipica dell'interfase.
- Circa il 10% della cromatina tuttavia rimane in una **forma condensata e compatta** anche durante l'interfase, chiamata **ETEROCROMATINA**, per distinguerla dall'**EUCROMATINA** che invece ritorna ad uno stadio disperso, che **permette la trascrizione**.
- **L'eterocromatina ha un'attività trascrizionale ridotta o nulla.**

EUCROMATINA ED ETEROCROMATINA

Electron Micrographs, Tables, Figures, and Links of: "Ultrastructure and Function of Heterochromatin and Euchromatin", John H. Traneer, Division of Oncology, Department of Medicine, Stanford University School of Medicine, Stanford, California

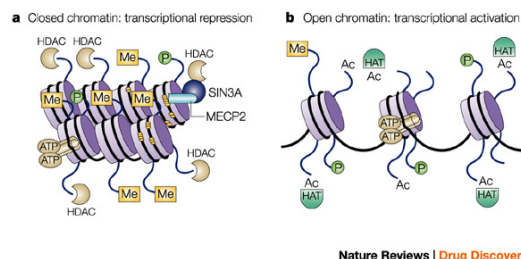


Microscopia elettronica a trasmissione (EM) di un linfocita di sangue umano normale, incubato in vitro in assenza di fitoemagglutina per 48h. Il citoplasma è scarso e composto predominantemente da ribosomi singoli. Il nucleolo è compatto e una parte predominante del DNA è contenuta all'interno delle masse di eterocromatina condensate disposte sotto la membrana nucleare. Il nucleolo è piccolo e circondato da ulteriore eterocromatina condensata. (x16,000)

EM, linfocita di sangue umano normale incubato in vitro in presenza di fitoemagglutina per 48h. Il linfocita ha subito una trasformazione *Mitotica* ed ha ora un citoplasma aumentato composto predominantemente da polimeri ribosomiali. Il nucleolo è ingrandito e la maggior parte del DNA è contenuta all'interno di fillette di eucromatina stesa, disperse attraverso il nucleolo. Il nucleolo si è allargato ed è libero da eterocromatina circostante. La membrana plasmatica ha aumentato il numero di proiezioni microvillari e l'attività fagocitica. (x9,000)

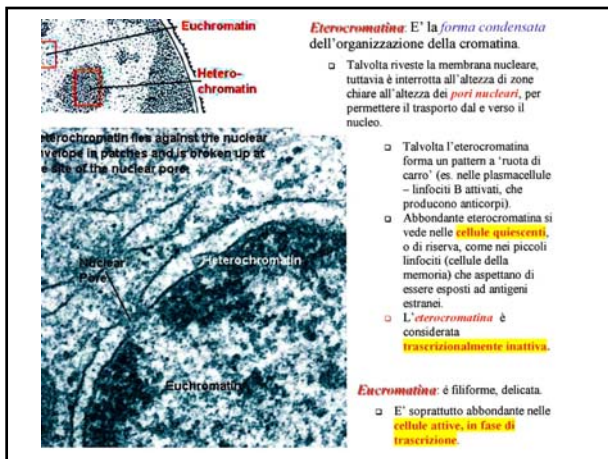
Eterocromatina e eucromatina (2)

- Durante l'interfase l'**eterocromatina** rimane in uno **stato condensato** che di solito è associato all'involucro nucleare, ai nucleoli, e a foci in altre zone.
- L'eterocromatina include i centromeri e i telomeri dei cromosomi e geni trascrizionalmente inattivi.
- Viceversa, l'**eucromatina** che presenta uno **stato meno condensato nell'interfase**, si colora debolmente con i coloranti per il DNA.
- La maggior parte delle **regioni trascritte** del DNA si trova nell'**eucromatina**.



Nature Reviews | Drug Discovery

http://www.nature.com/nrd/journal/v11/n4/fig_tab/nrd772_F1.html



Eterocromatina Costitutiva

- ✦ **Eterocromatina costitutiva**: *rimane nello stato condensato in tutti gli stadi del ciclo cellulare di tutte le cellule – DNA permanentemente silenziato.*
- ✦ Nei mammiferi la maggior parte dell'eterocromatina costitutiva è localizzata in corrispondenza della regione che fiancheggia il **centromero** e i **telomeri** di ciascun cromosoma e in alcuni siti come il braccio distale del cromosoma Y (maschi)

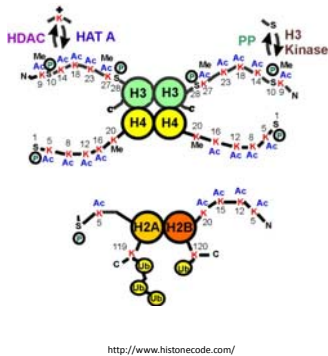
Eterocromatina facoltativa

- ✦ Corrisponde a **porzioni della cromatina che sono state specificamente inattivate durante determinate fasi della vita di un organismo o in certi tipi di cellule differenziate.**
- ✦ Nelle **femmine** uno dei due cromosomi X viene inattivato: solo uno dei due è trascrizionalmente attivo.
- ✦ L'altro rimane condensato sotto forma di un ammasso di eterocromatina – corpo di Barr.

Codice istonico e formazione dell'eterocromatina

- ✦ **CODICE ISTONICO**: ipotesi secondo la quale **lo stato e l'attività di una determinata regione cromatinica dipendono da modificazioni specifiche**, o da una combinazione di modificazioni, **sulle code degli istoni** di quella regione:
 - ✦ Legame covalente, catalizzato enzimaticamente, con gruppi **metilici** (-CH₃), **acetilici** (CH₃-CH₂-) o **fosfato** (PO₄³⁻).

Modificazioni chimiche nelle code degli istoni



Modificazioni delle *code istoniche* e struttura e funzione della cromatina (1)

- I **residui modificati** servono come **sito di ancoraggio per un gruppo specifico di proteine non istoniche** che quindi determina le proprietà e attività di un dato segmento di cromatina.

Modificazioni delle *code istoniche* e struttura e funzione della cromatina (2)

- I residui modificati alterano la modalità con cui le code istoniche di nucleosomi adiacenti interagiscono tra di loro e con il DNA a cui sono legati.

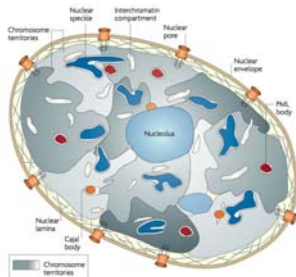
– Variazioni in questi tipi di interazioni possono portare a cambiamenti dei livelli superiori di organizzazione della cromatina.

- Es: l'acetilazione del residuo di lisina in posizione 16 dell'istone H4 interferisce con la formazione della fibra cromatinica di 30 nm.

Formazione dell'eterocromatina (x Genetica)

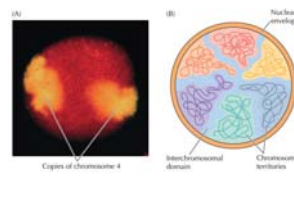
- Mentre il residuo di lisina in posizione 9 (Lys9; K9) dell'istone H3 nei domini eterocromatici è in gran parte metilato, questo stesso residuo nei domini eucromatici tende ad essere non metilato, sebbene sia spesso acetilato.
- La rimozione dei gruppi acetile degli istoni H3 e H4 è uno dei passaggi iniziali nella conversione dell'eucromatina in eterocromatina.

Presunti territori nucleari



Lanctot, Cheutin T, Cremer M, Cavalli G, Cremer T. Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nat Rev Genet.* 2007 Feb;8(2):104-15.

I singoli cromosomi occupano territori distinti all'interno del nucleo delle cellule dei mammiferi



Organizzazione dei cromosomi nel nucleo di mammiferi. (A) Marcatori che identificano sequenze ripetute del cromosoma 4 sono stati ibridizzati ad una cellula umana. Le due copie del cromosoma 4, identificate dalla fluorescenza gialla, occupano territori distinti nel nucleo. (B) Un modello di organizzazione dei cromosomi. I cromosomi occupano territori discreti, separati da domini intracromosomici dove si pensa che abbia luogo il processamento e il trasporto dell'RNA.

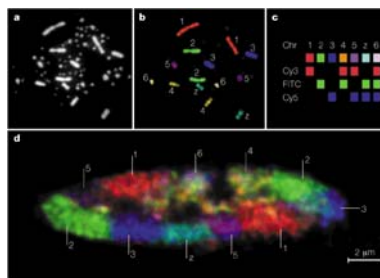
I singoli cromosomi occupano territori distinti all'interno del nucleo delle cellule dei mammiferi



http://embryology.med.unsw.edu.au/notes/week1_12.htm

Localizzazione dei cromosomi nel nucleo di fibroblasti. Dati recenti hanno identificato che ogni cromosoma interfascio occupa un dominio specifico (territorio cromosomale) all'interno del nucleo e non è sparpagliato in modo disordinato su tutta la superficie nucleare. Questi domini cromosomali e la localizzazione dei geni nei cromosomi suggeriscono un'organizzazione specifica 3D all'interno del nucleo.

Territori dei cromosomi del pollo



Nature Reviews | Genetics

http://www.nature.com/nrg/journal/v2/n4/fig_tab/nrg0401_292a_F2.html#figure-title

✦ **I geni attivamente trascritti sono localizzati alla periferia di questi territori,** adiacenti a canali che separano i cromosomi.

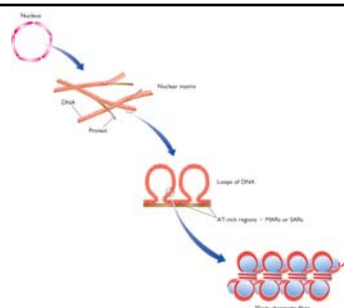
✦ Si ritiene che l'RNA di nuova trascrizione venga rilasciato in questi canali fra i cromosomi, dove ha luogo il processamento dell'RNA.

✦ **La maggior parte dell'eterocromatina è localizzata alla periferia del nucleo,** perché le proteine associate all'eterocromatina si legano alla matrice della lamina nucleare.

✦ Poiché i vari tipi cellulari esprimono geni diversi, la loro eterocromatina facoltativa è diversa, e regioni variabili dei cromosomi interagiscono con la lamina nucleare nei vari tipi di cellule e dei tessuti.

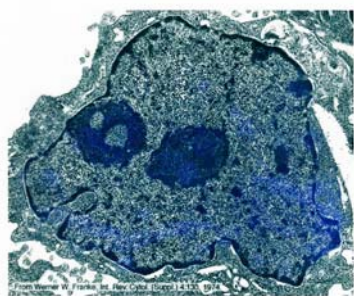
✦ Alcune cellule hanno i loro centromeri e telomeri aggregati a poli opposti mentre altre hanno i loro cromosomi disposti in modo radiale.

✦ Mentre la localizzazione dei cromosomi all'interno del nucleo non è casuale, esse possono differire in tessuti diversi, in organismi diversi e durante il differenziamento cellulare.



Schema dell'organizzazione del DNA nel nucleo. La **matrice nucleare** è una struttura fibrosa basata su proteine la cui precisa composizione e disposizione nel nucleo non è ancora stata descritta. Si presume che l'**eucromatina**, predominantemente sotto forma di fibre di cromatina da 30 nm sia collegata alla matrice tramite le sequenze ricche in AT, dette "matrix-associated" oppure "scaffold attachment regions" (MARs or SARs) (regioni associate alla matrice oppure regioni di collegamento all'impalcatura".

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21137/figure/A6858/report-objectonly>



Nucleo

NUCLEOLI

Nucleolo (1)

✦ Il **nucleolo** è un piccolo corpo, spesso sferico, che si trova all'interno del nucleo delle cellule eucariotiche.

✦ La **trascrizione del RNA ribosomiale (rRNA)** ha luogo nel nucleolo dove si svolge anche l'assemblaggio delle subunità dei ribosomi.

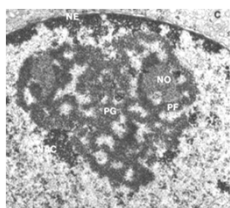
✦ **I nucleoli contengono il rRNA e molte copie dei geni che codificano per l'rRNA.**

✦ **Il numero di nucleoli di un nucleo è indicativo dell'attività trascrizionale della cellula:** una cellula che sintetizza un elevato numero di proteine può avere diversi nucleoli

Nucleolo (2)

Il nucleolo è organizzato in corrispondenza della "**nucleolar organizing region**" (**NOR**) presente su diversi cromosomi. Un certo numero di cromosomi si riunisce e **trascrive il RNA che codifica per i ribosomi (rRNA)** in quel sito*.

Al microscopio elettronico le regioni organizzatrici del nucleolo, **NOR**, compaiono come aree circolari (poco colorate) circondate da un anello di filamenti elettrondensi. Questi filamenti vengono chiamati complessivamente **pars fibrosa (PF)** che è costituita da **rRNA** appena trascritto.

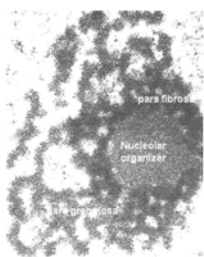


*Geni degli rRNA 5,8S, 18S e 28S -> trascrizione nel nucleolo (RNA pol I); gene del rRNA 5S: trascrizione fuori dal nucleolo (RNA pol III).

Nucleolo (3)

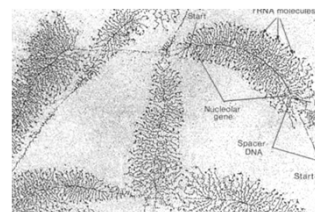
- Una volta trascritto il **rRNA**, esso viene legato a proteine e si possono vedere **accumuli di ribonucleoproteine** nella **pars granulosa (PG)**.
- Queste particelle formano i **due** tipi di **subunità ribosomiali** (la **grande** e la **piccola**) che vengono in seguito trasportate separatamente attraverso i **pori nucleari**. I pori **non** hanno spazio per i ribosomi assemblati, e quindi essi non possono rientrare. Questo significa che la **traduzione del RNA e la sintesi delle proteine hanno luogo fuori dal nucleolo**.
- Quando le subunità ribosomiali raggiungono il citoplasma si riuniscono formando un **ribosoma**: sito per l'ancoraggio del RNA messaggero (mRNA) e un modo di leggere il suo codice.

Nucleolo, segue



Un'altra fotografia al microscopio elettronico con la **regione dell'organizzatore nucleolare, la pars fibrosa e la pars granulosa**.

- I nucleoli **aumentano in numero e si ingrandiscono** quando la cellula è stimolata per produrre proteine.
- I nucleoli **spariscono durante la divisione cellulare** per poi riformarsi nelle zone dei centri organizzatori dei nucleoli dei cromosomi.

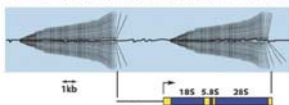


Studio della sintesi del RNA ribosomiale al microscopio elettronico:

Una preparazione di nucleoli viene dissociata e dispersa su di una superficie liquida (in modo simile alla dispersione della cromatina). In seguito, la sintesi del rRNA viene stimolata e dopo un certo periodo di tempo il DNA della regione organizzatrice del nucleolo comincia a sembrare un albero di Natale. La punta dell'albero è il punto d'inizio della sintesi. Man mano che ci si muove lungo l'"albero" i rami sembrano sempre più lunghi. Ogni "ramo" è un filamento in crescita di rRNA: il codice del DNA è in fase di trascrizione e nuovi nucleotidi vengono aggiunti al filamento di RNA in crescita.

Il gene del rRNA

- I geni appaiono in **multiple copie**, in **clusters nelle regioni organizzatrici dei nucleoli** ("nucleolar organizer regions"; NOR)
 - Sono richieste **multiple copie del gene** per fornire i **10 milioni di particelle ribosomiali** di cui la **cellula ha bisogno**
 - Le **cellule umane hanno 200 rRNA copie del gene per genoma**, localizzate su **cinque cromosomi differenti** (la *E. coli* ha **sette copie**)
 - Ogni gene ha **copie multiple del gene 45S**, tutte separate da regioni non-trascritte denominate **DNA spaziatore ("spacer DNA")**
 - Le **catene di rRNA in crescita somigliano ad un albero di Natale**



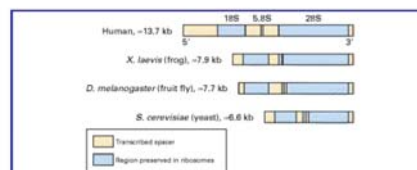
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fgq/?highlight=pre-rRNA&rid=mcbs.section.2975#2976>

I geni per i pre-rRNA sono simili in tutti gli eucarioti e funzionano da organizzatori nucleolari

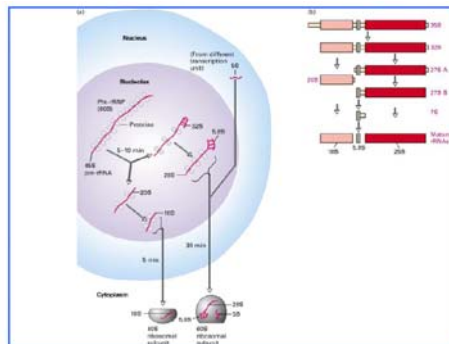
- Gli rRNA 28S e 5.8S associati alla subunità maggiore (60S) dei ribosomi e il rRNA-18S associato alla subunità ribosomiale minore degli eucarioti superiori sono codificati da un singolo tipo di unità di trascrizione per il pre-rRNA.
- La trascrizione mediante la RNA polimerasi I produce un trascritto primario di 45 S (13.7-kb), che viene in seguito processato dando gli RNA maturi 28S, 18S e 5,8S che si trovano nei ribosomi citoplasmatici.
- Il clonaggio e sequenziamento del DNA che codifica per i pre-rRNA di molte specie hanno dimostrato che questo DNA condivide diverse proprietà in tutti gli eucarioti.
 - Innanzitutto i geni dei pre-rRNA sono disposti in lunghe sequenze a tandem separate da regioni di spaziamento non trascritte che hanno una dimensione che va da ≈ 2 kb nelle rane a ≈ 30 kb nell'uomo.
 - Secondo, le regioni genomiche che corrispondono ai tre RNA definitivi sono sempre disposte nello stesso ordine da 5' \rightarrow 3': 18S, 5.8S, e28S).

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21571/#2168>

- Terzo, in tutte le cellule eucariotiche (e persino nei batteri), il gene del pre-rRNA, così come il corrispondente trascritto primario, è considerevolmente più lungo della somma delle tre molecole definitive di rRNA. Ad esempio, nelle cellule umane, solo circa la metà del pre-rRNA trascritto primario di 45 S compare nei prodotti rRNA finali, la cui lunghezza combinata è di circa 7.2 kb. L'altra metà, chiamata RNA spaziatore trascritto, viene rimossa durante il processamento e viene rapidamente degradato. La scoperta del processamento del pre-rRNA è stata la prima indicazione che gli RNA citoplasmatici maturi derivavano da RNA precursori di maggiori dimensioni sintetizzati nel nucleo. **Sia la sintesi che il processamento dei pre-mRNA hanno luogo nel nucleolo.**



Struttura generale delle unità di trascrizione per i pre-rRNA degli eucarioti. Le tre regioni codificanti (blu) codificano per gli 18S, 5.8S, e 28S rRNAs che si trovano nei ribosomi degli eucarioti superiori o per i loro equivalenti nelle altre specie. L'ordine di queste regioni codificanti nel genoma è sempre 5' \rightarrow 3'. Variazioni nella lunghezza delle regioni di spaziatore trascritte (giallo) spiegano le principali differenze nelle dimensioni delle unità di trascrizione pre-rRNA nei differenti organismi.

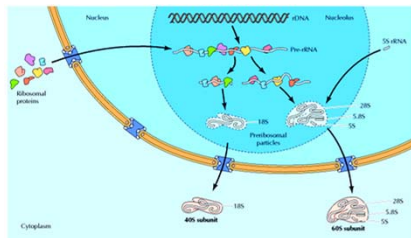


Processamento del pre-rRNA e assemblaggio dei ribosomi negli eucarioti. (a) I principali intermediari e tempi necessari per i vari passi del processamento del pre-rRNA negli eucarioti superiori. Le proteine ribosomiali e nucleolari si associano con il pre-rRNA subito dopo la sua sintesi, formando un pre-rRNP-80S. La sintesi del rRNA-5S ha luogo fuori dal nucleolo. L'estesa struttura secondaria degli rRNAs non è qui rappresentata. Si tenga presente che l'RNA costituisce circa il 2/3 della massa di subunità ribosomiali, e le proteine circa 1/3. (b) Via per il processamento del 6.6-kb (35S) pre-rRNA trascritto primario in *S. cerevisiae*. Le regioni di spaziamento trascritte (tan), che sono scartate durante il processamento, separano le regioni corrispondenti agli 18S, 5.8S, e 25S rRNAs maturi. Tutti gli intermediari illustrati nel diagramma sono stati identificati; le loro dimensioni sono indicate in rosso. [Part (b) adapted from S. Chu et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:659.]

Geni ripetuti in tandem codificano per gli rRNA, gli tRNA e per gli istoni

- ✚ Negli Invertebrate e in alcuni Vertebrati, i geni che codificano per gli rRNA, i tRNA e gli istoni (una famiglia di proteine associate al DNA nucleare degli eucarioti), e per diverse altre proteine si trovano sotto forma di **disposizioni a tandem ripetute**.
- ✚ I geni multipli ripetuti in tandem codificano per proteine o RNA funzionali identiche o praticamente identici.
- ✚ Nella maggior parte dei casi, le copie di una sequenza compaiono una dopo l'altra, in sequenza testa-coda, all'interno di una lunga porzione di DNA.
- ✚ All'interno di una disposizione a tandem dei geni per l'rRNA o per il tRNA, ogni copia è precisamente, o quasi precisamente come tutte le altre.
- ✚ Nonostante le porzioni trascritte dei geni per l'rRNA siano le stesse in un dato individuo, le regioni di spaziatura fra le regioni trascritte possono variare.

- ✚ Le sequenze di DNA ripetute in tandem che codificano per gli istoni sono un tanto più complesse; tuttavia, anche ogni gene per gli istoni ha copie identiche multiple.
- ✚ **I geni ripetuti in tandem per gli rRNA, tRNA e gli istoni sono necessari per venire incontro alla grande richiesta cellulare per i loro trascritti.**
- ✚ La maggior parte del RNA dell'RNA di una cellula consiste in rRNA e tRNA. Ammettendo che le molecole di RNA polimerasi si muovono a velocità fissa, ci sarebbe un limite al numero di copie di RNA che la trascrizione di un singolo gene può fornire durante una generazione cellulare, anche se fosse totalmente riempito di molecole di polimerasi. Quando è necessario più RNA di quanto non si riesca a trascrivere, sono necessarie copie multiple di quel gene.
- ✚ Ad esempio, durante lo sviluppo embrionale precoce degli esseri umani, molte cellule embrionarie hanno un tempo di raddoppiamento di ~24 ore e contengono 5 - 10 milioni di ribosomi. Per produrre rRNA sufficiente per formare molti ribosomi, una cellula embrionale umana necessita di almeno 100 copie del gene del pre-rRNA, e la maggior parte di queste devono essere vicino alla massima efficienza perché la cellula si divida ogni 24 ore. Ossia, diverse RNA polimerasi devono essere inviate per trascrivere ogni pre-rRNA contemporaneamente.



Assemblaggio dei ribosomi

Le proteine ribosomali sono *importate* nel *nucleolo dal citoplasma* ed iniziano ad assemblarsi sul pre-rRNA prima del suo taglio. Quando il pre-rRNA viene processato, ulteriori proteine ribosomali e l'rRNA 5S (che è sintetizzato altrove nel nucleo) si assemblano per formare particelle pre-ribosomali. Le fasi finali della maturazione seguono l'esportazione delle particelle preribosomali nel citoplasma, producendo le subunità ribosomali 40S e 60S.

<http://biotechhelp16.blogspot.it/2012/08/nucleus.html>