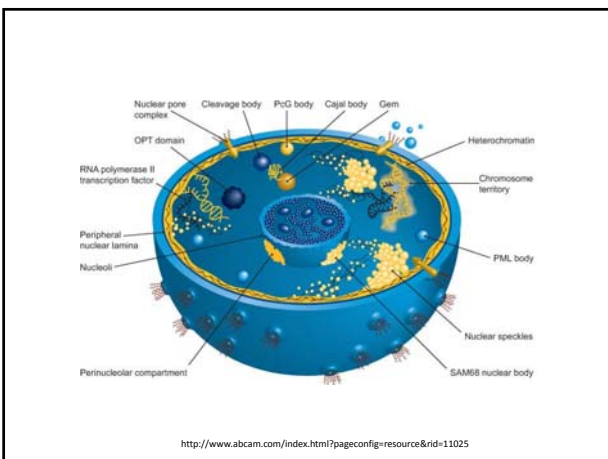


Nucleus: structure and function

- Il **nucleo** è un organello altamente specializzato che funziona come **centro di processamento** e di **amministrazione** della cellula.
- Ha due funzioni principali: **immagazzina il materiale ereditario** (DNA organizzato in cromosomi) e **coordina le attività cellulari**: **crescita**, **metabolismo intermedio**, **sintesi proteica** e **riproduzione** (divisione cellulare).

<http://micro.magnet.fsu.edu/cells/nucleus/nucleus.html>



Nucleo – morfologia (1)

- ✚ Il nucleolo ha in genere forma sferica, ma può anche assumere forme bizzarre.
- Può essere posizionato centralmente, ma anche essere decentrato, in vicinanza della membrana plasmatica.

Adattato da lezioni di Edo Scherini

Nucleo – morfologia (2)

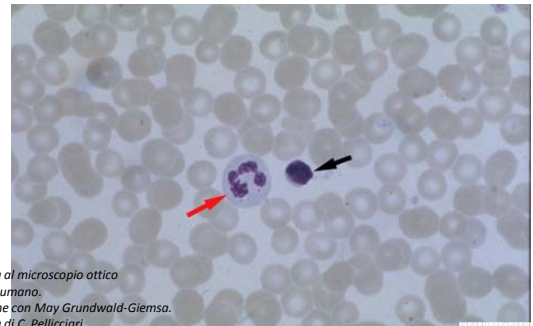
In preparati istologici colorati con miscele di coloranti acidi (es. Eosina/proteine) e basici (es. Ematossilina/DNA), **il nucleo** (a causa di abbondanza di gruppi fosfato del DNA) assume in varia misura i coloranti basici. La sostanza contenuta nel nucleo, che si colora con i coloranti basici è la **cromatina**.

Tuttavia, la colorazione non è mai uniforme, ma appaiono delle zolle più intensamente colorate di altre.

La cromatina meno colorata corrisponde all'**euromatina** (contiene geni attivamente trascritti), quella più colorata all'**eterocromatina** (contiene regioni non trascritte del DNA).

Adattato da lezioni di Eido Scherini

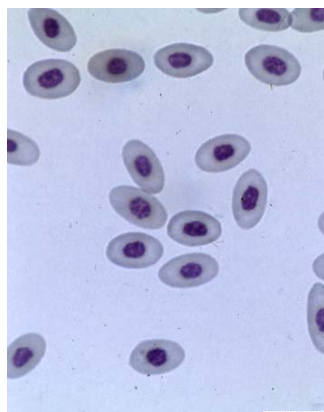
Il nucleo, fortemente colorato con coloranti basici come l'Ematossilina (viola) può essere sferoidale, come nel linfocita rappresentato sotto (freccia nera), ma può anche assumere forma bizzarra, come nel granulocita polimorfonucleato neutrofilo presente nel campo fotografico (freccia rossa).



Fotografia al microscopio ottico di sangue umano. Colorazione con May Grundwald-Giemsa. Fotografia di C. Pellicciari

Scherini

Il nucleo può essere localizzato centralmente e ricalcare la forma della cellula come in questi eritrociti del sangue di pollo.



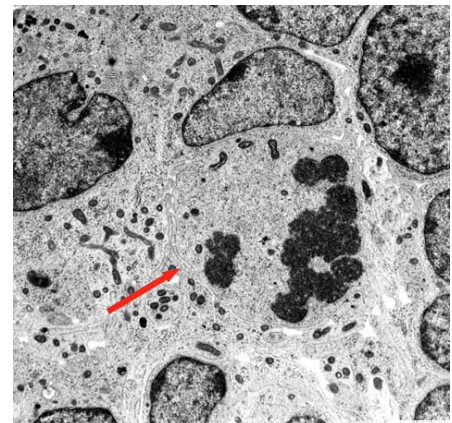
Fotografia a microscopia ottica di sangue di pollo. Colorazione con May Grundwald-Giemsa. Fotografia di C. Pellicciari

Scherini

La **cromatina** raggiunge il **massimo grado di condensazione** quando le cellule entrano in **mitosi** e **si evidenziano i cromosomi**.

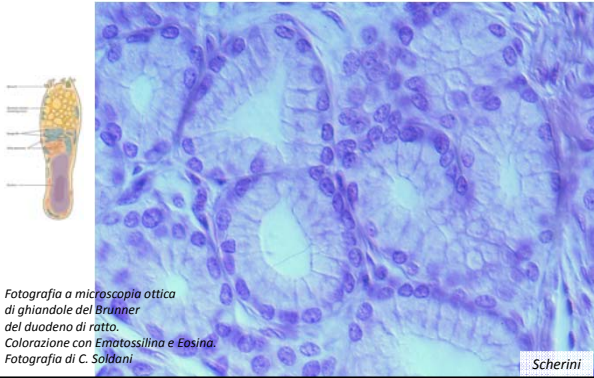
Nella fotografia a microscopia elettronica è rappresentata una cellula dello strato granulare esterno del cervello di ratto in **mitosi**.

Fotografia di M. Biggiogera ed E. Scherini



Scherini

Nelle cellule con funzione ghiandolare, il nucleo è spesso decentrato, in zona basale, dalla parte opposta al polo apicale dove le cellule accumulano e poi secernono il secreto.

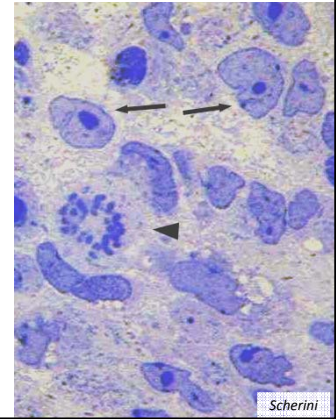


Fotografia a microscopia ottica di ghiandole del Brunner del duodeno di ratto. Colorazione con Ematossilina e Eosina. Fotografia di C. Soldani

Scherini

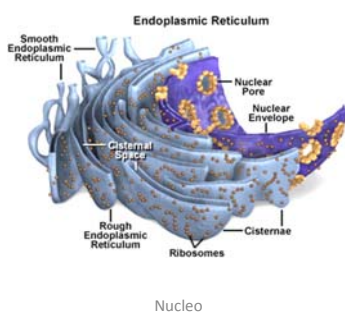
Oltre ad avere forma irregolare il nucleo appare colorato con i coloranti basici in modo irregolare, con piccole zolle eterocromatiche. Inoltre, nel nucleo è evidente un corpicciolo sferoidale, fortemente colorato, che è il nucleolo (particolarmente evidente nelle cellule puntate dalle frecce).

Nella fotografia si può osservare anche una cellula in mitosi (punta di freccia).



Fotografia a microscopia ottica di sezione semifine di neuroni in cultura. Colorazione con blu di metilene. Fotografia di L. Vecchio

Scherini



Nucleo

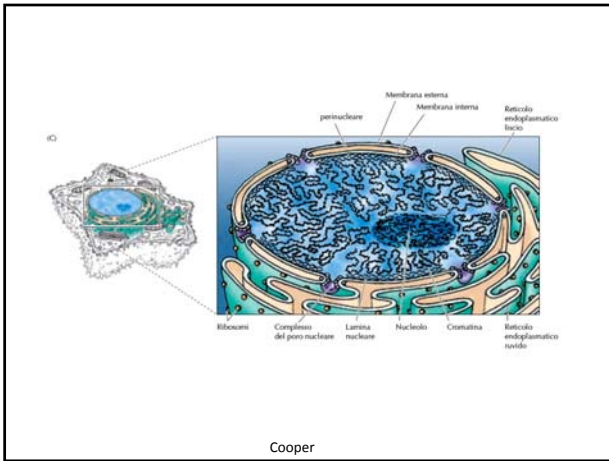
INVOLUCRO NUCLEARE

<http://micro.magnet.fsu.edu/cells/endoplasmicreticulum/images/endoplasmicreticulumfigure1.jpg>

INVOLUCRO/CISTERNA NUCLEARE (1)

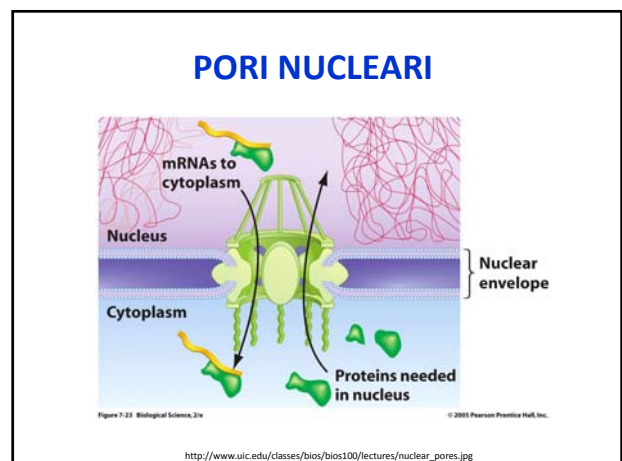
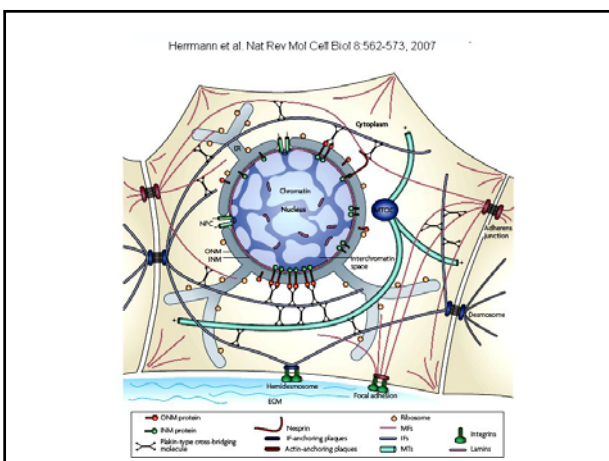
- L'involucro nucleare, l'interfaccia fra il citoplasma e il nucleo, è una **doppia membrana**, una **interna** e una **esterna**, che si **riuniscono** all'altezza dei **pori nucleari**.
- La **membrana nucleare esterna** è in **diretta continuità con il reticolo endoplasmatico** ma contiene proteine 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.
- Lo spazio tra le membrane, o spazio perinucleare, è **continuo con il lume del reticolo endoplasmatico**. Di solito ha uno spessore di 20-40 nm.
- 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

- La scorsa decade ha visto un completo **ripensamento** della tradizionale visione dell'involucro 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'**involucro nucleare definisce** non solo l'**organizzazione nucleare ma anche quella del citoscheletro** e perciò **integra morfologica- e funzionalmente l'architettura nucleare con quella citoplasmatica**.

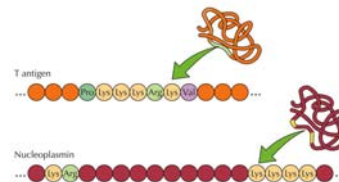


Trasporto verso e dal nucleo (1)

- 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 verso il citoplasma, 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 amminoacidiche specifiche di indirizzamento: SEQUENZE DI LOCALIZZAZIONE NUCLEARE**.
- In molte proteine nucleari i segnali consistono in **una o due corte sequenze di amminoacidi che sono ricche degli amminoacidi 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 amminoacidi. Viceversa, il segnale di localizzazione nucleare della **nucleoplamina** è bipartito, e consiste in una sequenza Lys-Arg, seguita da una sequenza Lys-Lys-Lys-Lys localizzata 10 amminoacidi 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-Val-Gly-Ile-Leu-Phe-Trip-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/?report=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

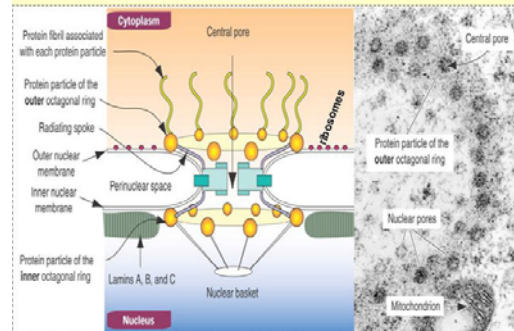
Lodish et al., 7^a ed.

Complesso dei pori nucleari (2)

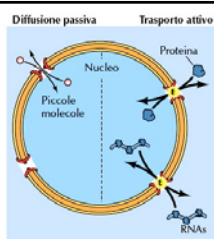
- Otto filamenti lunghi circa 100 nm si estendono verso il nucleoplasma; le loro estremità distali sono collegate da un anello terminale, formando una struttura detta «canestro nucleare» («nuclear basket»).
- Filamenti citoplasmatici si estendono dal versante citoplasmatico del NPC verso il citosol.

Lodish et al., 7ª ed.

1-38 FINE STRUCTURE OF A NUCLEAR PORE



<http://classes.kumc.edu/som/cellbiology/organelles/pores/tut3.html>



Traffico molecolare attraverso i complessi dei pori nucleari

Le molecole di piccole dimensioni sono in grado di passare rapidamente attraverso i canali aperti del complesso del poro mediante diffusione passiva. Viceversa, le macromolecole sono trasportate mediante meccanismo selettivo, energia-dipendente che funge principalmente per importare proteine verso il nucleo ed esportare RNAs verso il citoplasma.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9927/figure/A1330/?report=objectonly>

• 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.

Trasporto attraverso il complesso dei pori nucleari

- ⚡ 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 uscire 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.

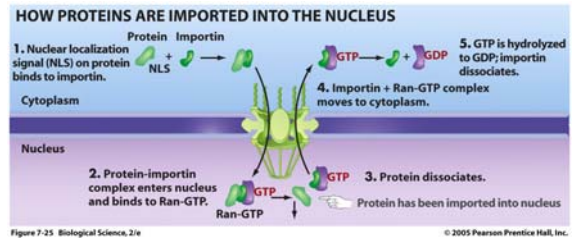
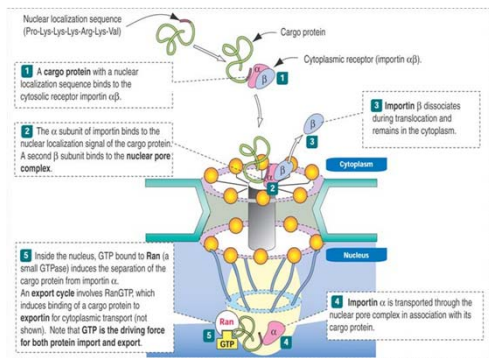


Figure 7-25 Biological Science, 2/e © 2005 Pearson Prentice Hall, Inc.

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

Seminario



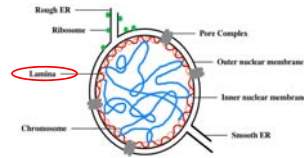
<http://classes.kumc.edu/som/cellbiology/processes/nucleartransport/index.html>



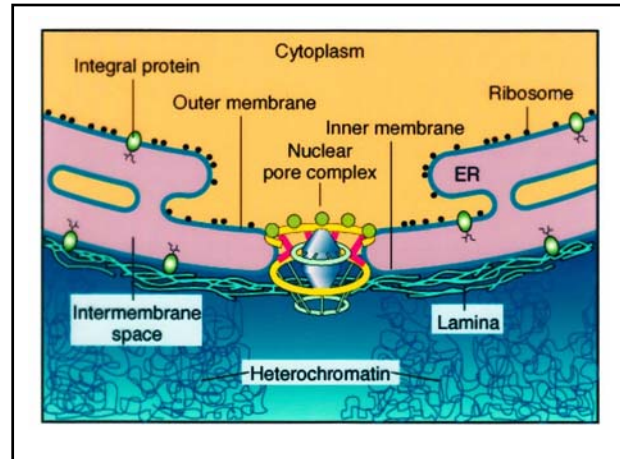
IMPORTANTE
Correlare con capitolo **filamenti intermedi - lamine**

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

LAMINA NUCLEARE



- ✚ Negli Eucarioti una rete proteica, la **lamina nucleare**, riveste dall'interno il foglietto interno dell'involucro nucleare.
- ✚ E' una densa (30-100 nm di spessore) rete fibrillare all'interno del nucleo della maggior parte delle cellule.
- ✚ E' costituita da filamenti intermedi (citoscheletro) che appartengono alla famiglia delle **lamine nucleari**, e **proteine della membrana nucleare associate alle lamine**.
- ✚ La **degradazione della lamina nucleare precede la scomparsa dell'involucro nucleare all'inizio della prometafase**.

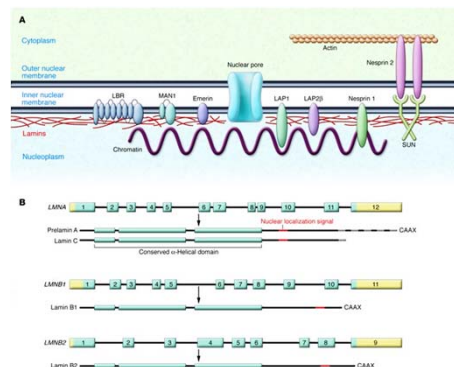


Struttura e composizione della lamina nucleare

- La **lamina nucleare** consiste di due componenti, le **lamine** e **proteine di membrana associate alle lamine**.
- Le lamine sono filamenti intermedi di tipo V che vengono categorizzate come di **tipo A** (lamine A e C) o di **tipo B** (lamine B1 e B2), a seconda dell'omologie delle loro sequenze di DNA, proprietà biochimiche e localizzazione cellulare nell'ambito del ciclo cellulare.
- I filamenti intermedi di tipo V differiscono dai filamenti intermedi citoplasmatici in quanto hanno un dominio a bastoncino più esteso (più lungo di 42 amminoacidi), portano tutti in **segnale di localizzazione nucleare** ("nuclear localization signal"; NLS) nel loro C-terminale e hanno una **struttura terziaria diversa**.

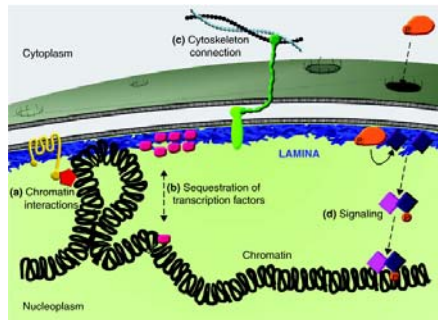
https://en.wikipedia.org/wiki/Nuclear_lamina

Lamina nucleare



Worman HJ, Fong LG, Muchir A, Young SG. Laminopathies and the long strange trip from basic cell biology to therapy. *J Clin Invest*. 2009 Jul;119(7):1825-36.

Funzioni della lamina nucleare - 1



https://www.researchgate.net/figure/51190261_fig5_Functions-of-the-nuclear-lamina-A-cartoon-representation-of-the-nuclear-lamina

Funzioni della lamina nucleare - 2

- Lo schema mette in evidenza quattro funzioni chiave della lamina nucleare:
- a) La lamina **regola l'organizzazione del genoma** e la **struttura della cromatina** mediante **interazioni dirette con la cromatina** e, indirettamente, mediante **associazione con proteine che modificano e regolano la cromatina**.
- b) La lamina **regola l'espressione genica sequestrando fattori di trascrizione** a livello dell'involucro nucleare, così limitando la loro disponibilità nel nucleoplasma.
- c) **Media** anche i **legami strutturali fra il nucleo e il citoscheletro** mediante il complesso LNC, che consiste di lamine, da una proteina della membrana nucleare interna che interagisce con una proteina della membrana nucleare esterna che a sua volta si lega agli elementi del citoscheletro.
- d) Inoltre la lamina fornisce una **piattaforma per l'assemblaggio di complessi proteici coinvolti in vie di trasduzione del segnale**.

P: fosfato

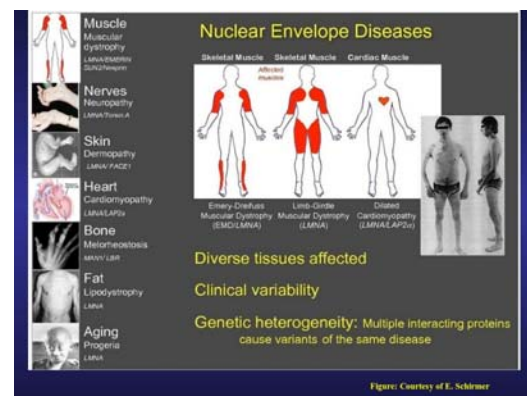
https://www.researchgate.net/figure/51190261_fig5_Functions-of-the-nuclear-lamina-A-cartoon-representation-of-the-nuclear-lamina

Laminopathies and the long strange trip from basic cell biology to therapy

Howard J. Worman,^{1,2} Loren G. Fong,³ Antoine Muchir,^{1,2} and Stephen G. Young^{3,4}

The Journal of Clinical Investigation <http://www.jci.org> Volume 119 Number 7 July 2009

La principale funzione della **lamina nucleare**, una rete di **filamenti intermedi** che giace principalmente sotto la membrana nucleare interna, è quella di **fornire un'impalcatura strutturale al nucleo** della cellula. Tuttavia, la lamina svolge anche altre funzioni, come quelle di giocare un ruolo **nell'organizzazione della cromatina**, nel **collegamento del nucleo con il citoplasma**, nella **trascrizione genica** e nella **mitosi**. Nelle cellule somatiche, i principali componenti proteici della lamina nucleare sono le lamine A, C, B1 e B2. L'interesse per le lamine nucleari è aumentato in modo drammatico negli ultimi anni con la consapevolezza che **mutazioni nel gene LMNA** che codifica per le lamine A e C, **provoca una grande diversità di patologie umane** ("laminopatie", che includono la distrofia muscolare, le cardiomiopatie, la lipodistrofia parziale, e i sindromi progeroidi). In questo lavoro riassumiamo le laminopatie e il lungo e strano percorso che va dagli studi di biologia cellulari di base agli approcci terapeutici per queste patologie.



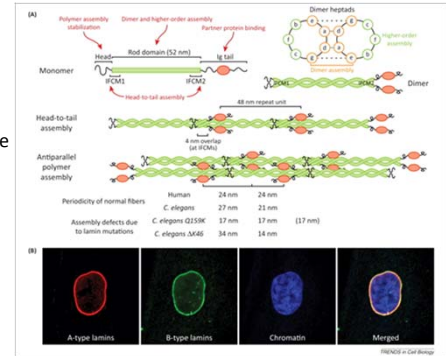
<http://jci.jci.org/lookup/doi/10.1172/JCI38111>

Polimerizzazione delle lamine

- La lamina nucleare è assemblata mediante interazioni fra due polipeptidi di lamine in cui le regioni ad α -elica si avvolgono una rispetto all'altra formando una struttura a due filamenti "coiled-coil", seguita da associazione testa-coda di molteplici dimeri.
- Il polimero allungato viene esteso lateralmente mediante interazioni fianco a fianco dei polimeri, formando una struttura bidimensionale sottostante l'involucro nucleare.

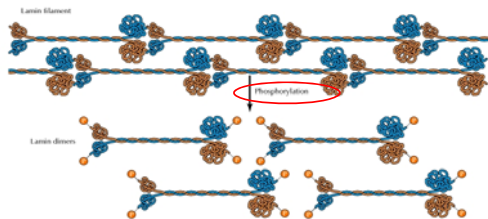
https://en.wikipedia.org/wiki/Nuclear_lamina

Polimerizzazione delle lamine



Davidson PM, Lammerding J. Broken nuclei—lamins, nuclear mechanics, and disease. Trends Cell Biol. 2014 Apr;24(4):247-56.

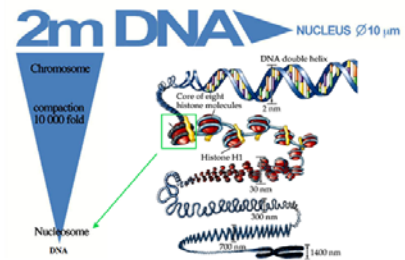
Dissoluzione della lamina nucleare nella profase della mitosi



La lamina nucleare consiste in una rete di **filamenti di lamine**. 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/>

Fig.1 Chromatin organization of higher eukaryotes.



Nucleo

CROMATINA

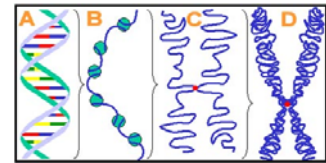
<http://www.chromatintoronto.ca/projects.html>

Cromosomi - 1

- Le cellule **impacchettano** il loro **DNA** non solo per **proteggerlo**, ma anche **per regolare quali geni sono accessibili e quando**.
- Il **DNA** nucleare non è mai nudo nè separato da proteine. Piuttosto forma un **complesso** con diversi partners proteici che **collaborano all'impacchettamento nello spazio angusto del nucleo**.
- Questo **complesso DNA-proteine** è detto **cromatina**, con una massa di proteine pressochè uguale a quella del DNA.
- All'interno delle cellule la cromatina di solito si ripiega in formazioni caratteristiche dette **cromosomi**.

<http://www.nature.com/scitable/topicpage/chromosomes-14121320>

- Nella **fase G1 dell'interfase** del ciclo cellulare (sintesi del DNA) e nelle fasi di anafase e telofase della mitosi, ogni cromosoma contiene **una singola molecola di DNA** a doppio filamento (**cromatide**) insieme alle menzionate proteine di impacchettamento [B].
- Dopo la **fase S**, in cui il DNA viene replicato [C], **ogni cromosoma contiene due copie della stessa molecola di DNA** (due cromatidi fratelli; "sister chromatids"), unite soprattutto a livello dei loro centromeri. Inizialmente i filamenti sono molto distesi ma nella profase e metafase si compattano progressivamente (diventando sempre più spessi e più corti) [D].
- Nell'anafase i due cromatidi si separano e i cromosomi ritornano ad avere una sola molecola di DNA e di decondensano di nuovo.



Cromosomi - 2

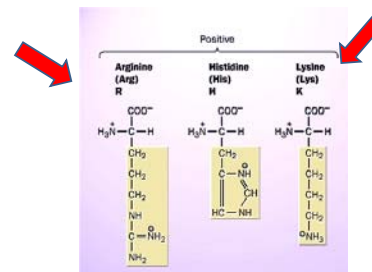
<http://vanat.cvm.umn.edu/m/Meiosis/Images/ChromosomeContent.jpg>

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 (1)

- Piccole proteine che contengono un n° molto elevato dei **residui basici** (carica positiva) **lisina** e **arginina**.



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.slumed.edu/~bbartholomew/images/Lehninger/Table%2024-03.GIF>

HISTONES are highly conserved, small, basic proteins

Histone acetylation is a reversible modification of lysines in the N-termini of the core histones.
Result:
 + reduced binding to DNA
 + destabilization of chromatin

Histone Type	Molecular Weight	Number of Amino Acids	Approx. Content of Basic Amino Acids
H1	17,000-26,000	200-265	27% lysine, 2% arginine
H2A	13,900	129-155	11% lysine, 9% arginine
H2B	13,900	121-148	16% lysine, 6% arginine
H3	15,300	135	10% lysine, 15% arginine
H4	11,300	102	11% lysine, 4% arginine

Copyright 1996, J.H. Watson, LMKC

http://www.ircm.qc.ca/Etudier/cours/Documents/BIM6026_2015.pdf

Istoni (3)

✚ Le sequenze di 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 ulteriormente condensata, 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.

Il nucleosoma: l'unità della cromatina

- Due unità di ogni istone H2A, H2B, H3, e H4 si avvicinano per formare un ottamero di istoni, che lega e avvolge circa 1,7 giri di DNA, circa 146 coppie di basi,
- L'aggiunta di una proteina H1 avvolge altre 20 coppie di basi, dando origine a due giri completi attorno all'ottameo, e formando una struttura chiamata **cromatosoma**.
- Le risultanti 166 coppie di basi non è molto lunga se si considera che ogni cromosoma contiene in media più di 100 milioni di coppie di basi del DNA.
- Perciò, **ogni cromosoma contiene centinaia di migliaia di nucleosomi** e questi nucleosomi sono **riuniti dal DNA che scorre fra di essi** (in media circa 20 coppie di basi).
- Questo DNA di collegamento viene designato "**linker DNA**".
- Ogni cromosoma è quindi una **lunga catena di nucleosomi**, che ha l'aspetto di una **collana di perle** quando osservato al microscopio elettronico.



Foto al microscopio elettronico della cromatina: "beads on a string".
I nucleosomi sono indicati da frecce

<http://www.nature.com/scitable/topicpage/dna-packaging-nucleosomes-and-chromatin-310>

La cromatina è avvolta formando strutture di ordine superiore

- L'impacchettamento di DNA in nucleosomi accorcia la lunghezza della fibra di circa 7 volte.
 - In altre parole, un frammento di DNA lungo 1 m diventerà una fibra di cromatina a "collana di perle" di solo 14 cm.
 - Nonostante l'accorciamento, questa lunghezza è ancora eccessiva per essere contenuta dal nucleo, che di solito ha un diametro di circa 10-20 μm .
 - Perciò, la cromatina è ulteriormente avvolta in una fibra ancora più corta, più spessa, designata "**fibra di 30 nm**" perchè ha circa 30 nm di diametro.
- (1 μm = 1000 nm)

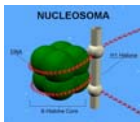


Fotografia al microscopio elettronico di una fibra di cromatina di 30 nm.
Scale bar = 50nm.

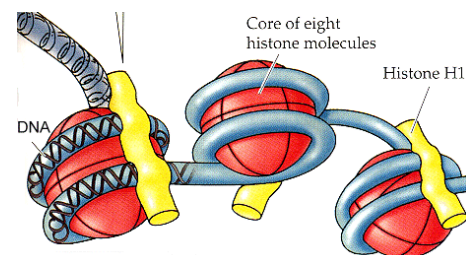
<http://www.nature.com/scitable/topicpage/dna-packaging-nucleosomes-and-chromatin-310>

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**.

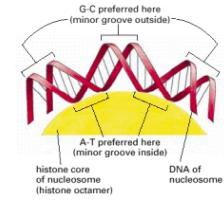


<http://www.molecularstation.com/molecular-biology-images/502-dna-pictures/60-nucleosome.html>



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

Seminario



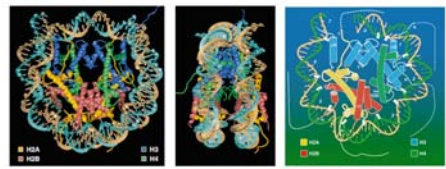
L'elica del DNA fa circa 1,65 giri stretti attorno all'ottamero di istoni. Questo diagramma è disegnato approssimativamente in scala, illustrando in che modo **il solco minore viene compresso verso l'interno del giro**.

A causa di alcune caratteristiche strutturali della molecola di DNA, le **coppie di basi A-T** sono preferenzialmente accomodate nel solco minore rivolto verso gli istoni.

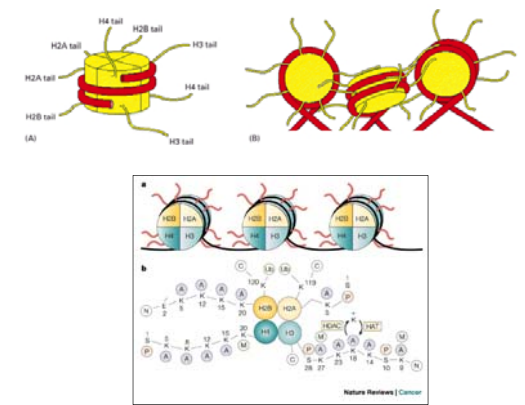
http://www.nature.com/nature/journal/v476/n7359/fig_tab/nature10258_F1.html

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26834/figure/A638/?report=objectonly>

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 **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 **code** sono sottoposte ad una serie di **modificazioni covalenti** che hanno funzioni importantissime per la struttura e funzionamento del DNA



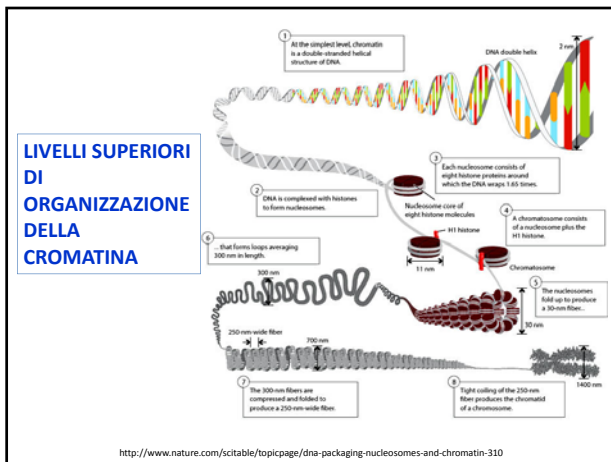
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26834/figure/A643/?report=objectonly>

http://www.nature.com/nrc/journal/v1/n3/fig_tab/nrc1201-194a_F1.html

Nota:
 Il DNA è complessato con le proteine istoniche e non istoniche per formare la cromatina **solo nelle cellule eucariote**. **Nelle cellule procariote il DNA è praticamente "nudo"**.



<http://www.motifolio.com/1021132.html>



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).

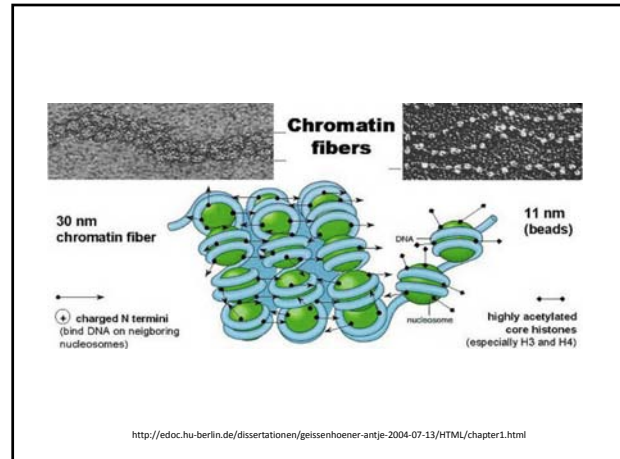
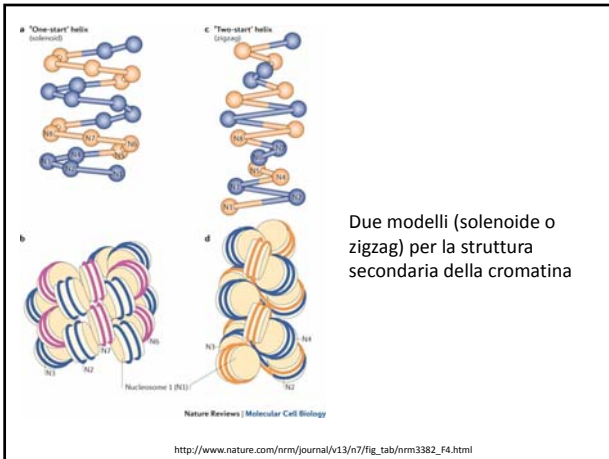
Livelli di organizzazione della cromatina (2)

- ✚ 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** («eucromatina») assumano la forma distesa de «**collanina di perle**».

Lodish et al., 7^a ed.

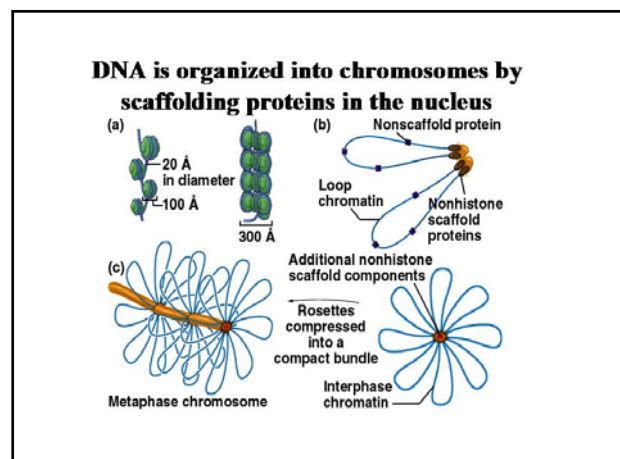
Struttura della fibra di 30 nm

- ✚ 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.

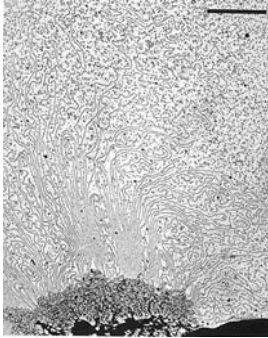


Livelli di organizzazione della cromatina (3)

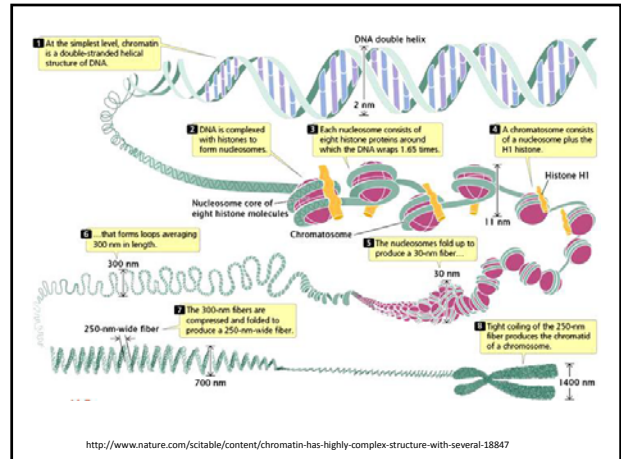
- 3° livello: Organizzazione della fibra di cromatina da 30 nm in una serie di ampie **anse superavvolte** – domini – che possono essere compattate in fibre più spesse (**80 – 100 nm**). Le anse di DNA sono apparentemente agganciate alla loro base a proteine che formano un’impalcatura organizzata: matrice.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



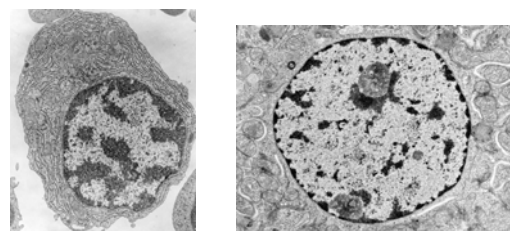
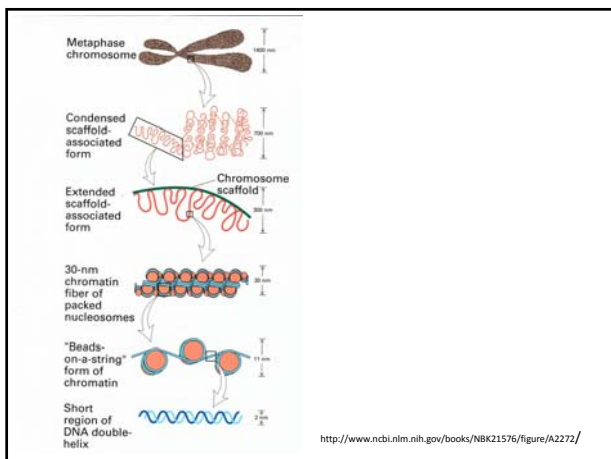
Anse di cromatina: un livello superiore di struttura della cromatina.



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



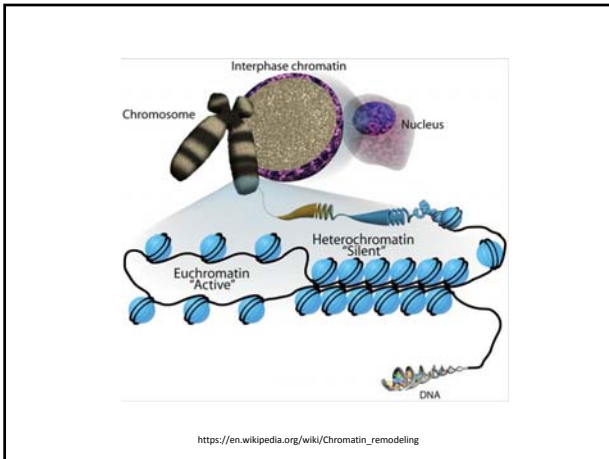
<http://www.nature.com/scitable/content/chromatin-has-highly-complex-structure-with-several-18847>



Cromatina

**ETEROCROMATINA E EUCROMATINA:
DEFINIZIONE FUNZIONALE**

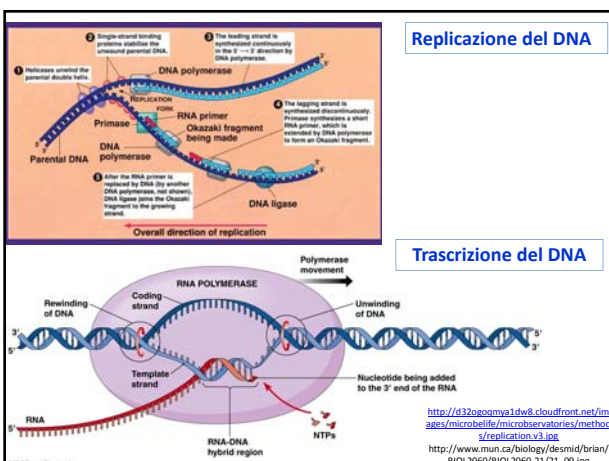
http://missinglink.ucsf.edu/lm/ids_101_histo_resource/images/cell_structure_lab_micrograph_8.jpg
http://medcell.med.yale.edu/histology/cell_lab/images/euchromatin_and_heterochromatin.jpg



La cromatina nella trascrizione e replicazione del DNA - 1

- I processi quali la **trascrizione** e la **replicazione** richiedono che **i due filamenti del DNA si separino temporaneamente, così dando alle polimerasi accesso allo stampo di DNA.**
- Tuttavia, la presenza dei nucleosomi e il ripiegamento della cromatina in fibre di 30 nm pone degli ostacoli agli enzimi che srotolano e copiano il DNA.
- E' quindi importante per le cellule avere meccanismi per svolgere le fibre di cromatina e/o rimuovere transitoriamente gli istoni, permettendo che la trascrizione o la replicazione possano avere luogo.

<http://www.nature.com/scitable/topicpage/dna-packaging-nucleosomes-and-chromatin-310>



La cromatina nella trascrizione e replicazione del DNA - 2

- In termini generali, ci sono due meccanismi principali mediante i quali la cromatina viene resa più accessibile:
 - Gli istoni possono essere modificati chimicamente** mediante aggiunta di gruppi acetilici, metilici o fosfato.
 - Gli **istoni** possono essere **spostati** da complessi di rimodellamento della cromatina, così esponendo le sequenze del DNA alle polimerasi o ad altri enzimi.
- E' importante tenere presente che questi **processi** sono **reversibili**, e quindi la cromatina modificata o rimodellata può ritornare allo stato di compattazione dopo il completamento della trascrizione e/o replicazione.

<http://www.nature.com/scitable/topicpage/dna-packaging-nucleosomes-and-chromatin-310>

Rimodellamento della cromatina - 1

- ✚ Modificazione dinamica dell'architettura della cromatina per permettere accesso al DNA genomico dei complessi proteici che controllano l'espressione genica.
- ✚ Viene svolto principalmente da:
 - **Modificazione covalente degli istoni** mediante enzimi specifici, ad es. «histone acetyl transferases» (HATs), deacetilasi, metiltrasferasi e chinasi [enzimi che aggiungono gruppi fosfato ad amminoacidi quali la tirosina o la serina/treonina]
 - Complessi di **rimodellamento della cromatina** ATP-dipendenti che spostano, espellono, o ristrutturano i nucleosomi.

https://en.wikipedia.org/wiki/Chromatin_remodeling

Rimodellamento della cromatina - 2

- ✚ Oltre a regolare dinamicamente l'espressione genica, il rimodellamento dinamico della cromatina impartisce un **ruolo regolatorio epigenetico** a diversi processi biologici essenziali. Ad es: **replicazione e riparo del DNA** degli **oociti**, **apoptosi**, **segregazione dei cromosomi**, **sviluppo** e **pluripotenza** di **cellule staminali**.
- ✚ Diverse aberrazioni delle proteine di rimodellamento della cromatina sono state individuate come associate a patologie umane, in particolare ai **tumori**.

https://en.wikipedia.org/wiki/Chromatin_remodeling

Eterocromatina e eucromatina (1)

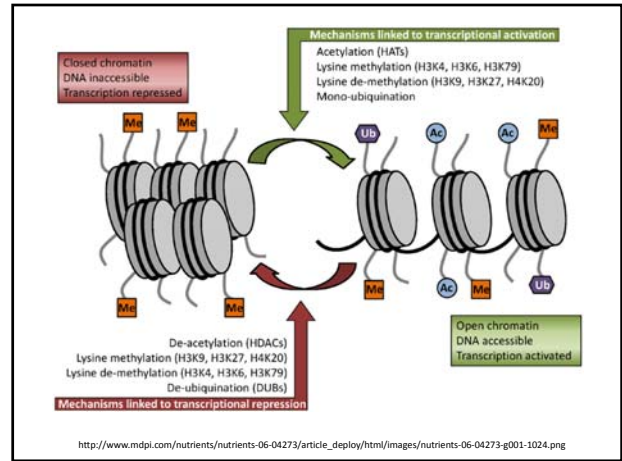
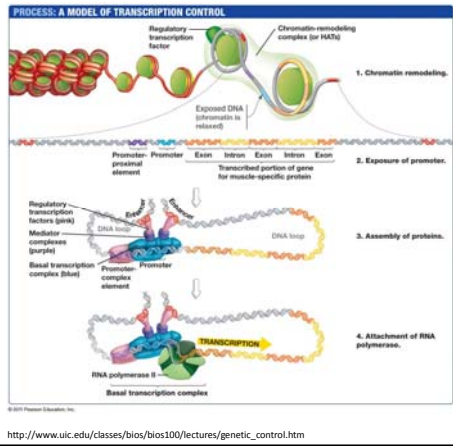
- ✚ Alla fine della mitosi, la maggior parte della cromatina che compone i cromosomi mitotici, altamente condensati, torna ad una condizione più distesa, tipica dell'interfase.
- ✚ Circa il 10% della cromatina tuttavia rimane in una **forma condensata e compatta anche durante l'interfase**, chiamata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

Eterocromatina e eucromatina (2)

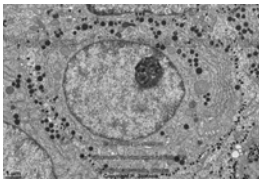
- ✚ Durante l'interfase l'**eterocromatina** rimane in uno **stato condensato** che di solito è associato all'involucro nucleare, ai nucleoli, e a foci in altre zone.
- ✚ L'eterocromatina include i centromeri e i telomeri dei cromosomi e geni trascrizionalmente inattivi.
- ✚ Viceversa, l'**eucromatina** 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**.

Seminario

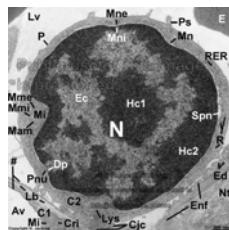
Modello di controllo della trascrizione



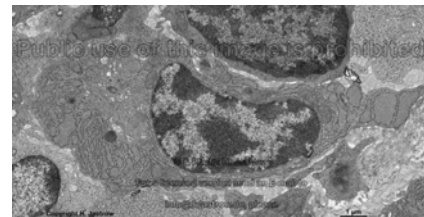
Eucromatina ed eterocromatina



Cellula dell'adenoiipofici che secreta prolattina
<https://www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/EM/eigeneEM/Hypophyse/hy8E.html>



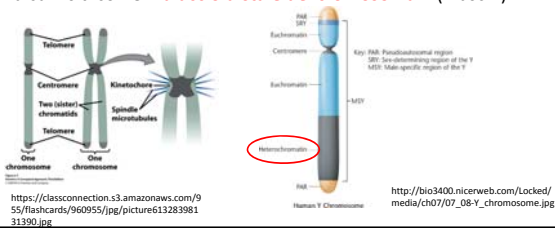
Linfocito in un capillare del polmone di ratto
<https://www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/EM/eigeneEM/Tph/Tph14Pk.jpg>



Eucromatina orientate a forma di "ruota di carro" in una plasma cellula (linfocito B attivato che produce anticorpi) umana. La cellula produce un solo tipo di anticorpo e quindi non ha molta eucromatina.
<https://www.uni-mainz.de/FB/Medizin/Anatomie/workshop/EM/eigeneEM/Tph/Tph14Pk.jpg>

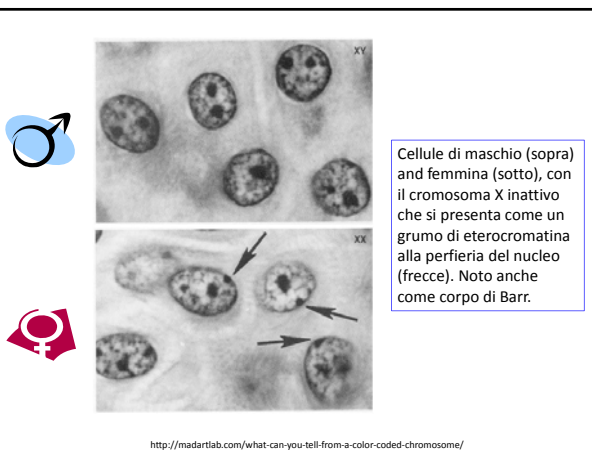
Eterocromatina Costitutiva

- ✚ **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 ogni 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**.

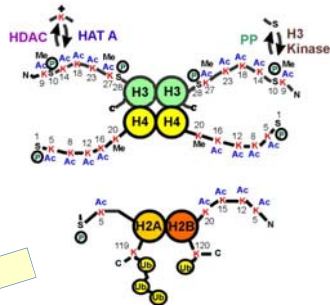


Codice istonico e formazione dell'eterocromatina

- ✚ **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⁻).

Seminario

Modificazioni chimiche delle code degli istoni



Seminario

<http://www.histonecode.com/>

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.

Seminario

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.

Seminario

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.

Seminario

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/HDAC)
- = 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/

Struttura della cromatina

<https://www.youtube.com/watch?v=9rQ0EhVCYA>

Cromatina nell'interfase e nella mitosi - 1

A. Interphase nucleus

B. Prometaphase nucleus

chromosome territory (CT borders)

euchromatin (light)

heterochromatin (dark)

nuclear pore

nucleoli

nuclear membrane

<http://www.mechanobio.info/topics/synthesis/go-0000785>
<https://mbi-figure.storage.googleapis.com/figure/1389942033388.jpg>

Cromatina nell'interfase e nella mitosi - 2

- ✚ Nel **nucleo interfase** (figura A), i cromosomi sono difficili da distinguere uno dall'altro. Ciò nonostante, essi occupano uno spazio discreto all'interno del nucleo – detto **territorio cromosomico** (i bordi dei territori cromosomici sono suggeriti dalle linee tratteggiate rosse). E' facile distinguere l'eucromatina colorata leggermente (attiva trascrizionalmente) dalle zolle di eterocromatina più scura (silente trascrizionalmente).
- ✚ Durante la divisione cellulare (figura B), i cromosomi altamente condensati possono essere chiaramente distinguibili uno dall'altro. Complessivamente, i cromosomi mitotici visualizzati al microscopio ottico, costituiscono il **cariotipo**.

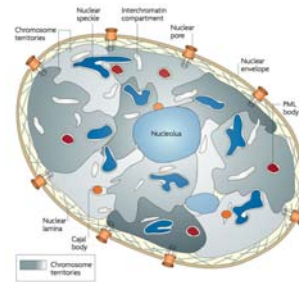
<http://www.mechanobio.info/topics/synthesis/go-0000785>

La maggiore compattazione dei cromosomi si ha nella metafase

- Quando le cellule eucariotiche si dividono, il DNA genomico deve essere ripartito ugualmente fra entrambe le cellule figlie. Per fare ciò, il DNA diventa altamente compattato formando i classici cromosomi metafasici che sono visibili al microscopio ottico. Una volta che la cellula si è divisa i cromosomi si srotolano di nuovo.
- Paragonando la lunghezza dei cromosomi metafasici con quella del DNA "nudo", l'impacchettamento del DNA nei cromosomi metafasici è di circa 10,000:1 (a seconda del cromosoma).
- Questo livello di compattazione può essere raggiunto ripiegando ripetutamente le fibre di cromatina in una progressione ierarchica di molteplici anse e avvolgimenti.
- Esattamente come questo viene svolto non è chiaro, ma la fosforilazione dell'istone H1 può giocare un ruolo.
- Infatti, questa è un'area di ricerca che impegnerà gli scienziati a lungo nei prossimi anni.

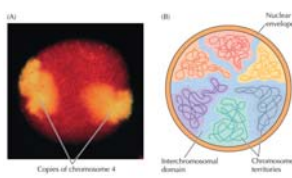
<http://www.nature.com/scitable/topicpage/dna-packaging-nucleosomes-and-chromatin-310>

Presunti territori nucleari



Lancot, 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, identificato 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.

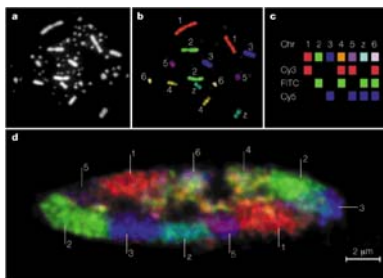
I singoli cromosomi occupano territori distinti all'interno del nucleo delle cellule dei mammiferi



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.

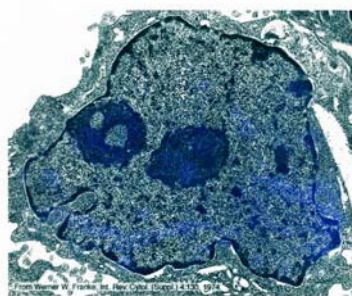
✦ **La maggior parte dell'eterocromatina è localizzata alla periferia del nucleo**, perchè le proteine associate all'eterocromatina si legano alla matrice della lamina nucleare.

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

Seminario



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.**

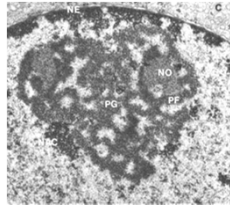
✦ **Il numero di nucleoli di un nucleo è indicativo dell'attività trascrizionale della cellula:** una cellula che sintetizza un elevato numero di proteine può avere diversi nucleoli

Geoffrey M. Cooper: The Cell: A Molecular Approach

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); gene del rRNA 5S: trascrizione fuori dal nucleolo (RNA pol III).

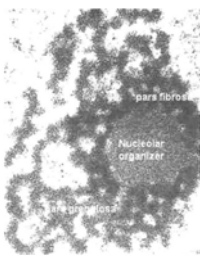
Nucleolo (3)

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**.

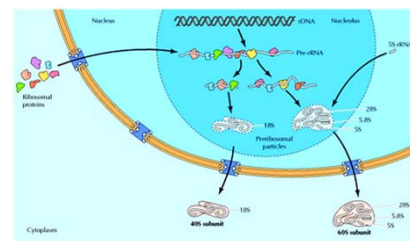
Quando le subunità ribosomiali raggiungono il citoplasma si riuniscono formando un **ribosoma**: sito per l'ancoraggio del RNA messaggero (mRNA) e un modo di leggere il suo codice.

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.



Assemblaggio dei ribosomi

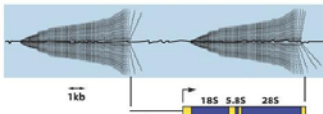
Le proteine ribosomiali sono **importate nel nucleolo dal citoplasma** ed iniziano ad assemblarsi sul pre-rRNA prima del suo taglio. Quando il pre-rRNA viene processato, ulteriori proteine ribosomiali e l'rRNA 5S (che è sintetizzato altrove nel nucleolo) si assemblano per formare particelle pre-ribosomiali.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

<http://biotechhelpline16.blogspot.it/2012/08/nucleus.html>

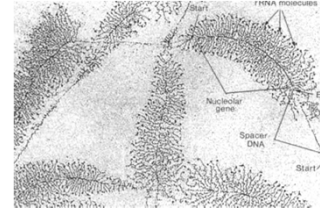
Seminario

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.fcgi?highlight=pre-rRNA&id=mcb.section.2975#2976>

**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.

Seminario

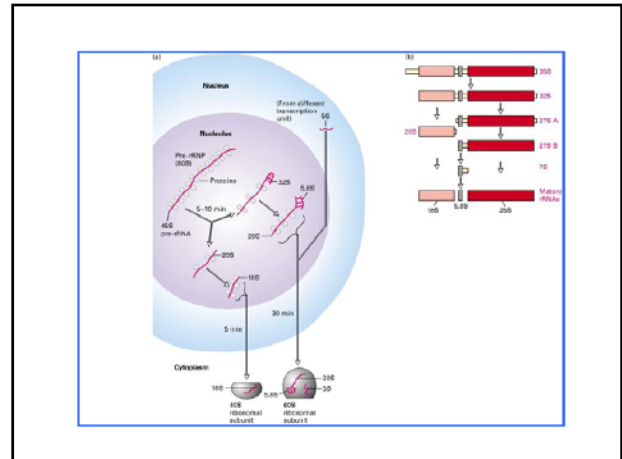
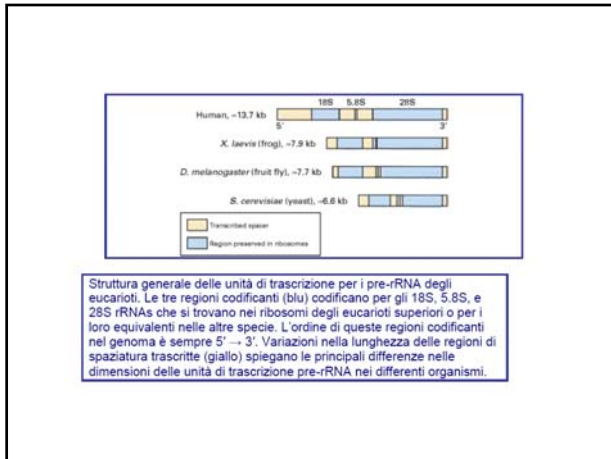
I geni per i pre-rRNA sono simili in tutti gli eucarioti e funzionano da organizzatori nucleolari

- ✦ 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' → 3': 18S, 5.8S, e28S).

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

Seminario

- 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.**



Seminario

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-45S 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.]

Seminario

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.

Seminario

- 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 muovano 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.