

Dispense delle lezioni di

**Biologia Molecolare  
applicata alle Scienze Motorie**

Lezioni tenute per gli studenti del 1° anno del

**Corso di Laurea in Scienze Motorie**  
Facoltà di Medicina e Chirurgia  
Università di Ferrara

La parte scritta è stata corretta dal docente (**Prof. Laura del Senno**), agosto 2008.

# INDICE

Proteine e contrazione muscolare	pag.	3
Meccanismi del controllo della contrazione		13
La trascrizione ed il controllo dell'espressione genica		20
HIF1, Hypoxia Inducible Factor		23
Recettori per gli ormoni steroidei: fattori trascrizionali attivati da ligando		24
Il trascrittoma ed il suo studio nella cellula muscolare		26
Cenni di tecniche dei DNA ricombinanti (come studiare l'mRNA, il clonaggio, etc)		27
Caratterizzazione dei geni responsabili della miogenesi		30
Topi knockout e topi transgenici		33
Maturazione dei trascritti e splicing alternativo		37
La traduzione ed il controllo traduzionale		42
Il mitocondrio: genoma e funzioni		49
La distrofina e il gene DMD		52
Polimorfismi e tecniche di analisi del DNA	\\	54
Trasduzione del segnale ormonale		58
Il segnale insulinico ed mTOR		61

**Testi di riferimento prevalenti:** L'essenziale della Biologia Molecolare della cellula (A. Bray, J. Lewis Raff, R. Walter, Ed Zanichelli); Biologia Molecolare della cellula (H. Lodish, A. Berk, S. Laurence Zipursky, P. Matsudaira, D. Baltimore, J. E. Darnell, Ed Zanichelli).

**Altri siti consultabili in rete.**

# Proteine e contrazione muscolare

Una delle caratteristiche fondamentali delle proteine è quella di poter interagire fra di loro e/o con altre molecole biologiche formando dei complessi macromolecolari funzionali.

Numerose strutture complesse sovramolecolari, grazie all'interazione di catene polipeptidiche di tipo diverso o dello stesso tipo, realizzano la motilità cellulare. In molti sistemi contrattili ed in molti tipi di muscolatura la contrazione si basa sull'interazione di due proteine principali: l'actina e la miosina (**sistema contrattile acto-miosinico**).

Sia nel sistema acto-miosinico che nei sistemi non acto-miosinici, il movimento (quale il movimento intracellulare degli organelli, etc..) avviene lungo percorsi ben definiti ed utilizzando lo stesso meccanismo biochimico fondamentale. In particolare, questi sistemi sono deputati alla produzione del movimento poichè vanno incontro a modifiche strutturali indotte dal legame e dall'idrolisi di un nucleoside trifosfato: l'ATP. L'ATP si scinde in ADP e Pi. L'energia chimica liberata **dall'idrolisi del legame fosfo-anidridico dell'ATP** viene convertita in lavoro (energia meccanica/cinetica).

Il legame del nucleotide e l'idrolisi del legame comportano una serie di **modifiche conformazionali della miosina** con differente affinità per le molecole polimeriche che hanno la funzione di **binari guida**. In particolare, le modifiche della miosina vengono convertite in un movimento mirato lungo la **forma polimerica dell'actina**.

## ACTINA

E' una delle proteine più abbondanti nelle cellule eucariotiche (fibre muscolari, citoscheletro cellulare, ecc.). In queste cellule può rappresentare fino al 10% delle proteine totali.

L'actina è codificata da una grande famiglia genica: 6 geni (4 isoforme di  $\alpha$ -actina nelle cellule muscolari;  $\beta$ -actina e  $\gamma$ -actina nelle cellule non muscolari). **Il gene** per l'actina del muscolo scheletrico, **ACTA1**, mappa sul cromosoma 1, sul braccio lungo del cromosoma (q), alla banda 1q42.13-q42.2. Copre una regione di DNA di 11.870 paia di nucleotidi (11.87 kbasi): tra il nucleotide 225.885.589 al 225.873.721 sull'elica reverse (3' → 5') del DNA cromosomico, ed è formato da almeno 7 esoni.

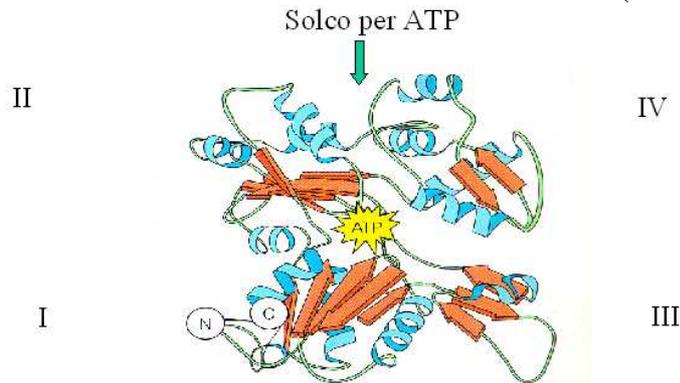


La proteina espressa da ACTA1 è costituita da una sequenza di 375 aa per un peso molecolare (MW) di circa 42000 Dalton

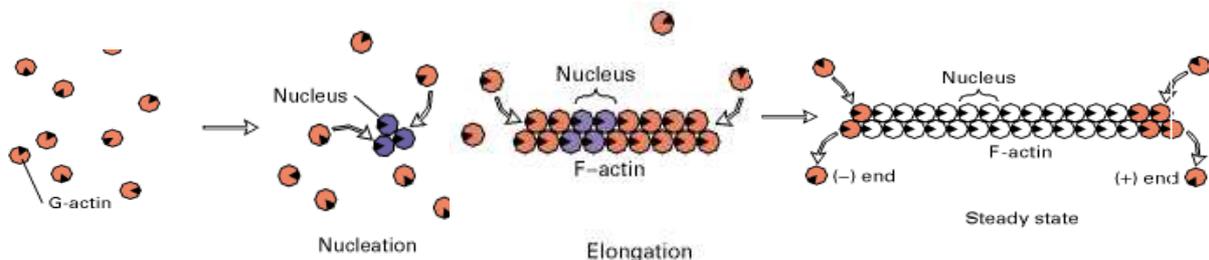
Sequenza amminoacidica dedotta dalla banca dati FASTA: [gi|4501881|ref|NP\\_001091.1| actin, alpha 1, skeletal muscle \[Homo sapiens\]](#)

```
1,MCDEDETTALVCDNGSGLVKAGFAGDDAPRAVFPISVGRPRHQGVMVGMGQKDSYVGDEAQSKRGILTLK
YPIEHGIITNWDDMEKIWHHTFYNELRVAPEEHPTLLTEAPLNPKANREKMTQIMFETFNVPAMYVAIQAVLS
LYASGRITGIVLDSGDGVTHNVPIYEGYALPHAIMRLDLAGRDLTDYLMKILTERGYSFVTTAEREIVRDIKEK
LCYVALDFENEMATAASSSSLEKSYELPDGQVITIGNERFRCPETLFPQPSFIGMESAGIHETTYNSIMKCDIDIRK
DLYANNVMSGGTTMYPGIADRMQKEITALAPSTMKIKIIPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQMWITKQEYDEA
GPSIVHRKCF, 375
```

L'actina ha una struttura globulare (con strutture secondarie ad  $\alpha$ -elica, in azzurro e  $\beta$ -foglietto, in arancio). Essa è formata da 4 domini (I-IV) ed è capace di legare una molecola di ATP nella parte centrale. Questa forma strutturale viene denominata **G-actina** (actina-globulare).



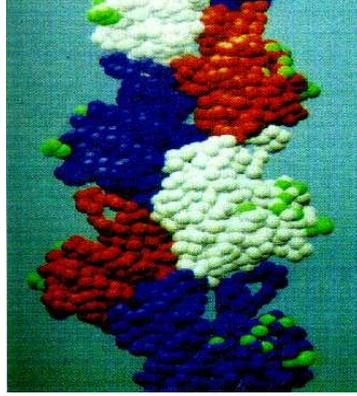
Ciascun monomero di G-actina può interagire con due altri monomeri grazie a siti di legame forti che mediano interazioni testa-coda (domini III-IV). Il primo passo è la formazione di dimeri e trimeri, che in seguito si accrescono mediante l'aggiunta di monomeri ad entrambe le estremità. Si formano così i polimeri di **F-actina** (filamenti di actina).  $Mg^{++}$ ,  $Na^+$  o  $K^+$  inducono la polimerizzazione che si verifica grazie all'idrolisi dell'ATP.



Nei filamenti ogni monomero G è ruotato di  $166^\circ$  determinando una conformazione simile ad un'elica. 2 filamenti di F-actina si avvolgono a formare una doppia elica.

La F actina è polare: tutti i monomeri di actina sono orientati nella stessa direzione e pertanto i filamenti di actina hanno una polarità distinta nelle loro estremità: **estremità a barbigli** ("barbed"), o **estremità più** (+); **estremità appuntita** ("pointed") o **estremità meno** (-). Le due estremità di F-actina non crescono omogeneamente: l'estremità + cresce più velocemente dell'estremità -. Questa polarità è importante sia per l'assemblaggio che per stabilire una direzione specifica per il movimento della miosina rispetto all'actina.

I filamenti di F-actina contengono circa 360 molecole di actina. I filamenti sono stabilizzati da una proteina: la  **$\beta$ -actinina**. Ciascuna G-actina, oltre a siti di legame con altre G-actine, contiene un sito ad alta affinità per legare la testa della **miosina** (domini I e II, sulla superficie esterna, sferette verdi nella figura successiva).



## MIOSINA

La miosina è una ATPasi (enzima che idrolizza ATP, come l'actina) che si muove sui filamenti di actina. E' dunque la proteina motrice, trasformando l'energia dell'ATP in lavoro.

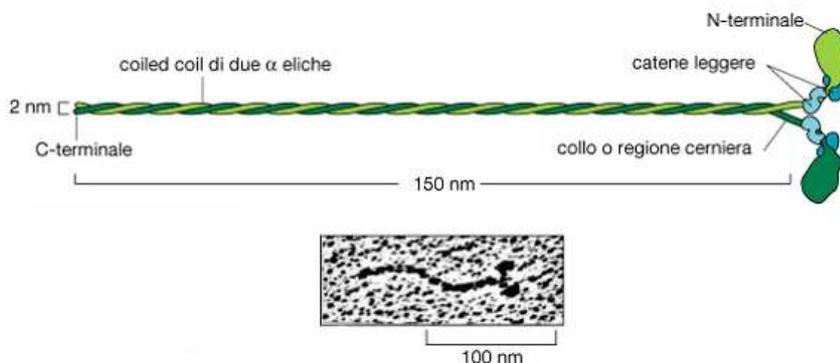
Diverse e numerose sono le miosine (**MYOSIN, MY**) (e quindi i 39 geni che le codificano nel genoma umano) che differenziano per struttura e numero delle catene componenti e quindi per funzione e classificate in diverse classi (da I a XVIII?).

Le miosine della contrazione muscolare appartengono alla classe II. La **Miosina II** è l'isoforma più espressa nell'organismo. Ci sono 8 geni per le isoforme sarcomeriche, di cui 6 sul cromosoma 17. Il gene per la catena pesante della miosina espressa nel tessuto muscolare è infatti MYH2, sito sul cromosoma 17p.

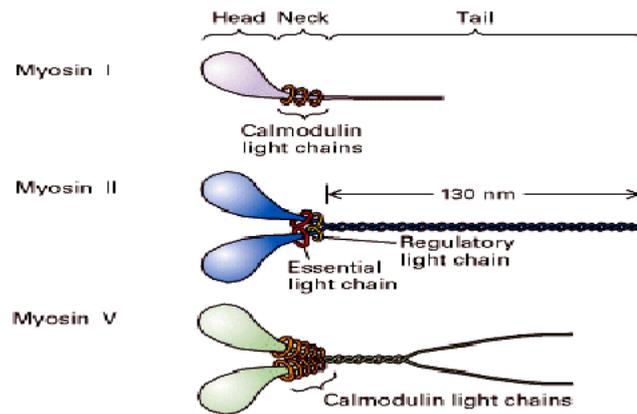
*Alternative titles; symbols*  
**MYOSIN, SKELETAL, HEAVY**  
**CHAIN, ADULT 2;**  
**MYHSA2**  
**MYOSIN, HEAVY CHAIN, IIa;**  
**MYHC2A;**  
**MYH2A MYHC IIa**  
 Gene map locus **17p13.1**

L'allenamento opera sulla regolazione genica, modificando l'espressione della catena pesante in sue diverse isoforme (catena pesante, heavy chain, HC: MYHC2), ad esempio da MYHC2-Af o -Bf (veloce) a  $\beta$ MYHC lenta .

La miosina II è infatti formata da **2 catene pesanti** (MHC). Ciascuna di esse è formata dalla testa (struttura globulare) e la coda (struttura fibrosa) di 130 nm, per un peso molecolare di circa 200 Da, ed è legata a **2 catene leggere** MLC1/MLC2 (in tutto 4 catene leggere, attorno alle regioni del collo).

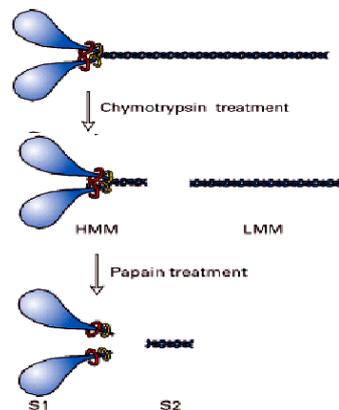


Altre miosine si differenziano per il numero di catene leggere e pesanti e per la lunghezza della componente fibrosa. MYI e MYV sono coinvolte nel citoscheletro e nello scheletro delle membrane.



Le catene leggere possono essere essenziale e regolatrice o calmoduline, comunque proteine che legano il  $Ca^{++}$ .

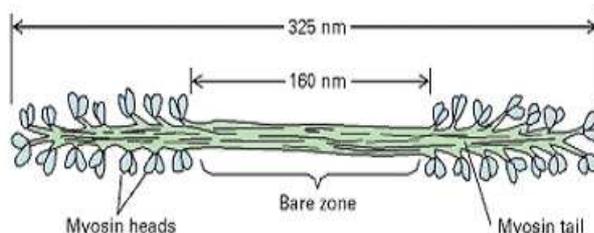
La frammentazione sequenziale della catena pesante con l'impiego di enzimi proteolitici ha permesso di studiare più in dettaglio i domini della catena pesante, ovvero la loro struttura e funzione. La chimotripsina scinde la molecola in due frammenti: **meromiosina leggera (LMM)** e **meromiosina pesante (HMM)**. Quest'ultima è ulteriormente scissa dalla papaina in due sub-frammenti globulari S1 e un frammento a bastoncino S2. I punti in cui la miosina è scissa dagli enzimi proteolitici sono quelli a maggiore flessibilità (**cerniere**) che consentono alle teste di flettersi durante la contrazione.



Il dominio globulare (testa), permette il movimento della molecola perchè possiede i **siti di legame per actina e l'ATP**.

Nella MYII e V le catene pesanti dimeriche si associano per formare una struttura fibrosa.

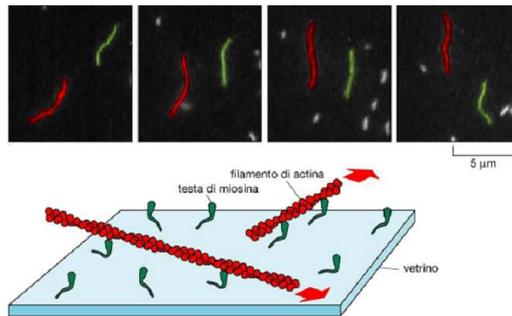
Il dominio della coda fibrosa contiene i siti di legame che ne determinano la funzione ed è il punto di inizio per la formazione dei filamenti spessi (miofilamenti).



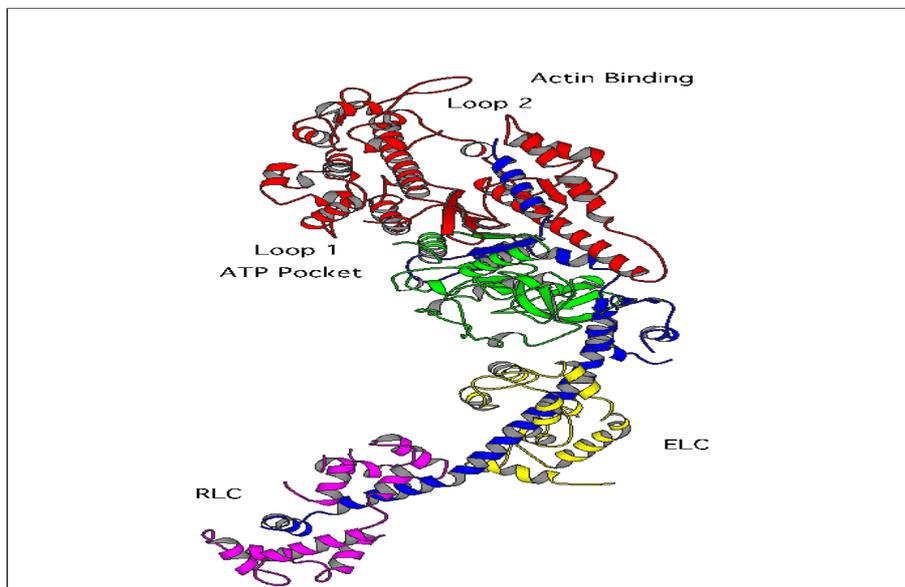
Durante la formazione dei filamenti spessi vengono coinvolte centinaia di miosine (~ 400 molecole di miosina raggruppate in due fasci contrapposti di ~ 200 molecole). Pertanto, il **filamento spesso** ha un'organizzazione bipolare: la zona centrale è priva di teste. **Molte teste interagiscono simultaneamente con i filamenti di actina** muovendosi **asincronicamente**.

Le due catene leggere legano il  $Ca^{++}$ .

E' possibile valutare **in vitro** il movimento delle miosine, valutando quelle delle actine legate dalle teste delle miosine.

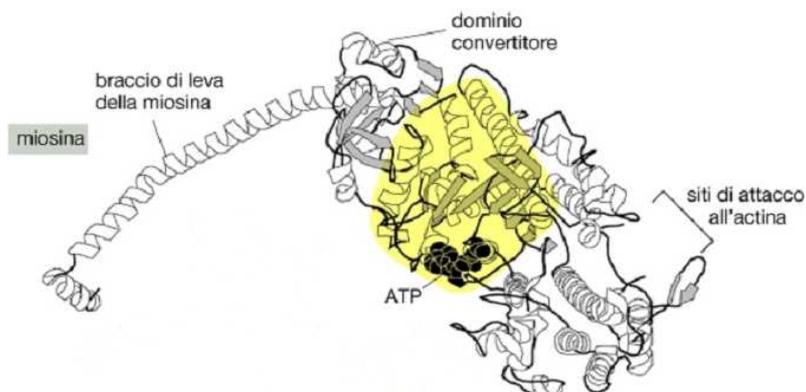


Il movimento di polimeri di actina fluorescente è valutabile con un microscopio a fluorescenza. Ogni frammento S1 della testa della miosina ha due regioni: il **collo** (blu), che è in continuità con la coda che contiene le catene leggere (RLC, viola, regulatory light chain, e ELC, gialla, essential light chain), ed il **dominio motore**.



Il motore ha una struttura globulare che contiene il dominio che lega l'actina. (loop 2) e quello che protegge l'entrata dell'ATP nella sua tasca (loop 1).

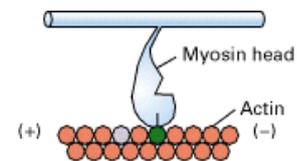
**Il motore della miosina** funziona come **convertitore** (actino-dipendente) **dell'energia libera** derivante **dall'idrolisi dell'ATP** in **lavoro meccanico**. Il meccanismo di generazione della forza consiste in una rotazione attiva (il power stroke) del dominio del braccio di leva durante la scissione dell'ATP nel sito catalitico del dominio motore



La mutazione di Arg-719 in Trp (Arg719Trp) localizzata nel dominio convertitore causa un aumento di 48-50% della generazione della forza e rigidità della fibra.

### ACCOPPIAMENTO DELLA IDROLISI DELL'ATP AL MOVIMENTO DELLA MIOSINA LUNGO IL FILAMENTO DI ACTINA

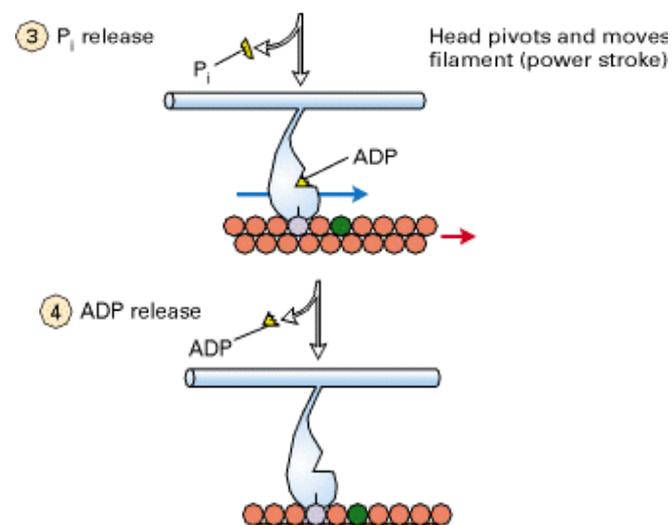
In assenza di ATP si ha lo stato di **rigor**  
(miosina a bassa energia)



1, il legame con l'ATP induce **un cambiamento conformazionale con conseguente** distacco della testa dal filamento

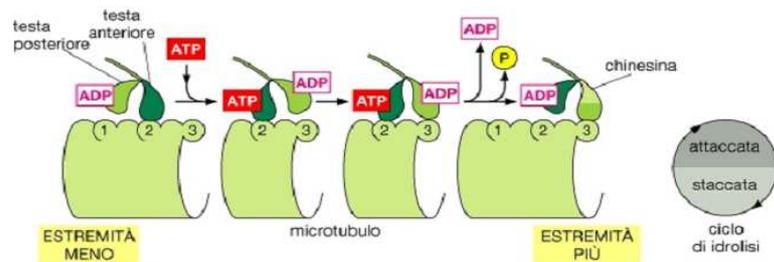
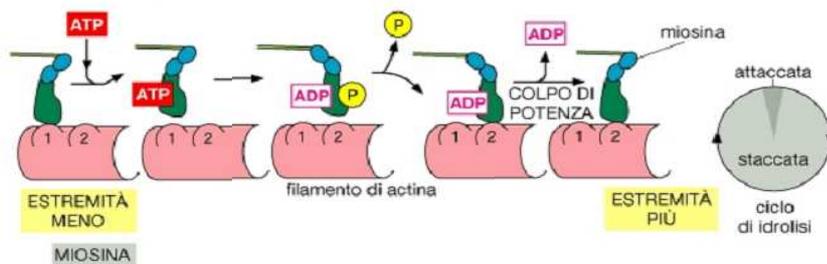
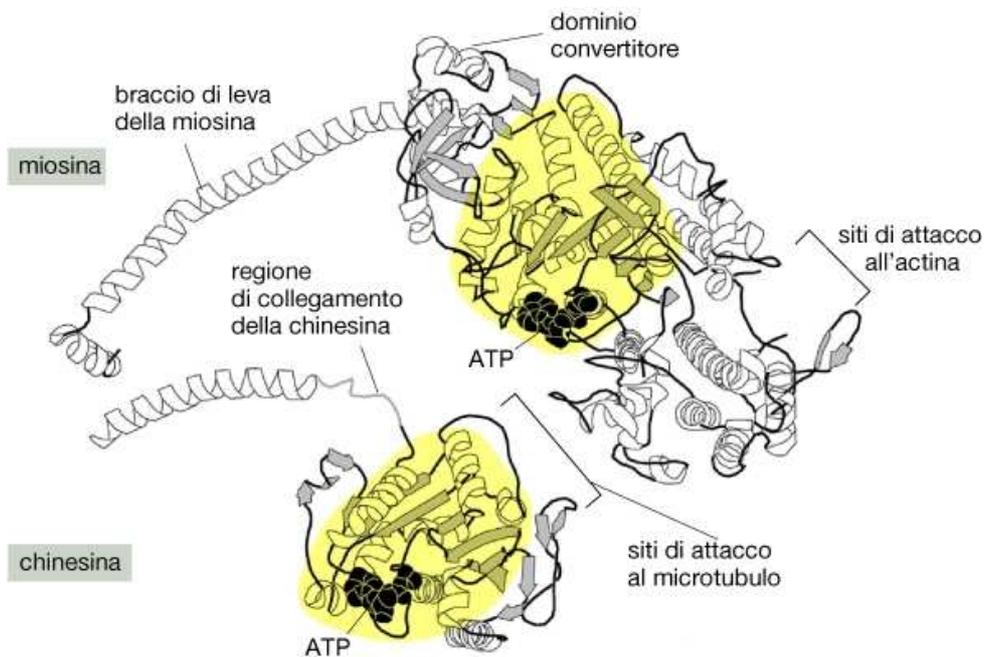
2, l'idrolisi dell'ATP ad ADP e  $P_i$  causa **un cambiamento conformazionale** che produce il movimento di flessione e distensione della testa. Si realizza una proiezione di circa **9 nm** che unisce il dominio motore di S1 di miosina durante la scissione dell'ATP ad un'altra actina, in direzione dell'estremità + del filamento (miosina ad alta energia)

3, la perdita del  $P_i$  causa **un cambiamento conformazionale** che determina il movimento di flessione della testa. Ciò comporta la spinta del filamento sottile verso il centro del sarcomero (colpo di forza).



4, l'uscita dell'ADP riporta allo stato iniziale di rigor.

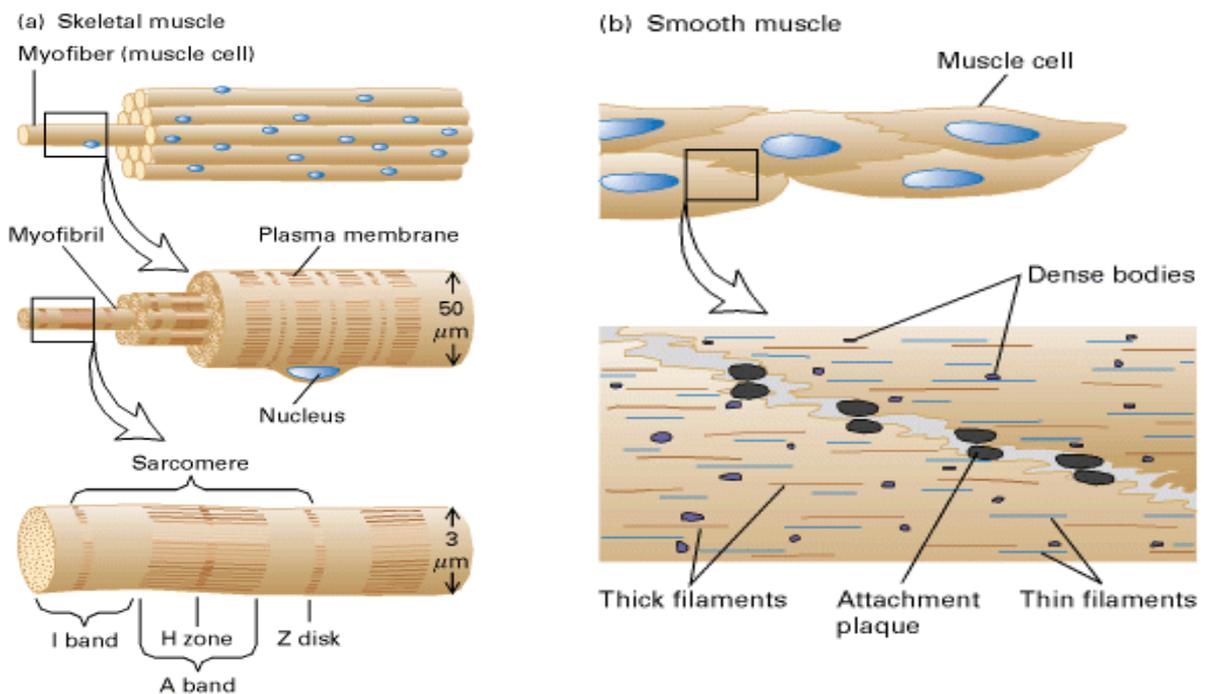
Esistono omologie di struttura e di funzione nelle proteine motrici che si deducono comparando il funzionamento della miosina con quello di un'altra proteina motrice: la chinesina.



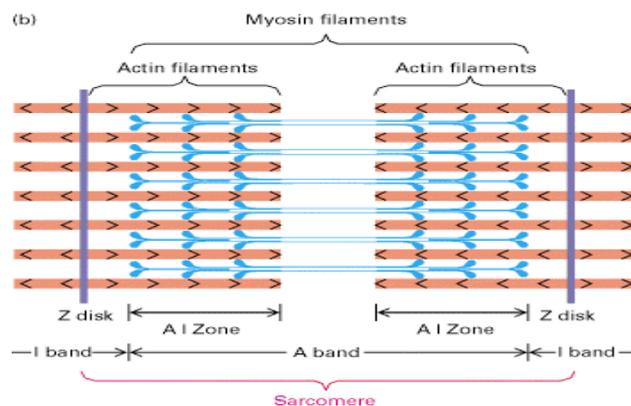
Il meccanismo motore è sempre l'accoppiamento della idrolisi dell'ATP al movimento della proteina motrice lungo il filamento di actina o di un microtubulo.

### STRUTTURA GENERALE DEL MUSCOLO SCHELETRICO E LISCIO

Nel muscolo scheletrico i filamenti sono disposti in maniera ordinata, mentre nella muscolatura liscia, il **reticolo di actina-miosina** è disposto disordinatamente. La contrazione è più lenta, ma l'ampiezza della contrazione è maggiore.

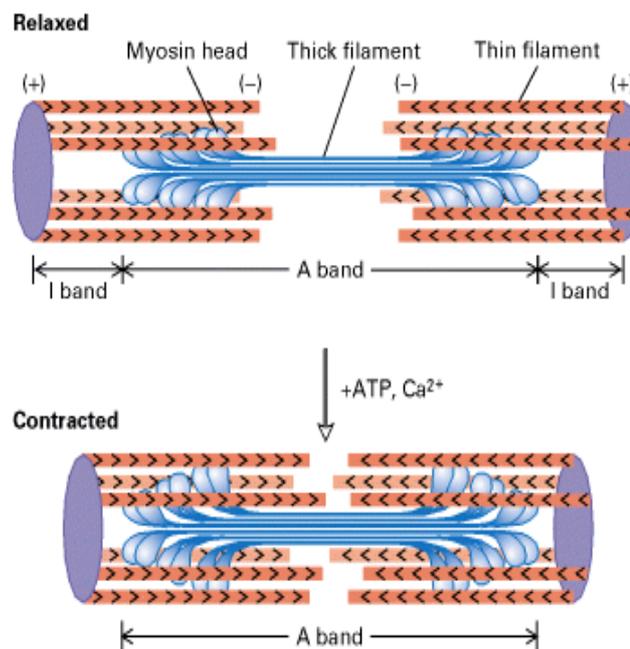


**Il Sarcomero:** l'unità contrattile del tessuto muscolare striato, forma fascetti contrattili detti *miofibrille*, avvolti dalla membrana *sarcolemma*.



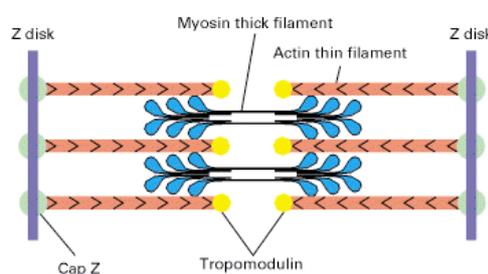
Il sarcomero si presenta come un'alternanza di bande chiare e bande scure. Esso è delimitato da due strie di natura proteica, le *strie*, o *linee*, **Z**. Ai lati di tali strie vi è una banda chiara detta **banda I**, costituita da filamenti di actina. Andando verso l'interno è possibile notare una banda scura, detta **banda A**, costituita da filamenti di actina e filamenti di miosina interposti tra di loro. Al centro della **banda A** vi è una banda più piccola detta **banda H**. Al centro di quest'ultima è presente una linea scura, la **linea M**, costituita da proteine che interconnettono i filamenti di miosina. A seguito del legame delle teste dei filamenti di miosina ai filamenti di actina, questi ultimi vengono spinti verso l'interno, accorciando così il sarcomero.

Riassumendo, l'accorciamento del sarcomero è dovuto allo **scivolamento** delle fibre di actina (filamenti sottili) **verso il centro** del sarcomero, mediate dai colpi di remi del filamento spesso. Pertanto, **i filamenti spessi scivolano sui filamenti sottili**.



### PROTEINE STABILIZZANTI LE ESTREMITA' DEI FILAMENTI

Il movimento di contrazione può avvenire perchè i filamenti sottili (estremità +) sono agganciati al disco Z da **CapZ**. Anche l'**α-actinina** lega le actine nella banda I e le aggancia al disco Z.

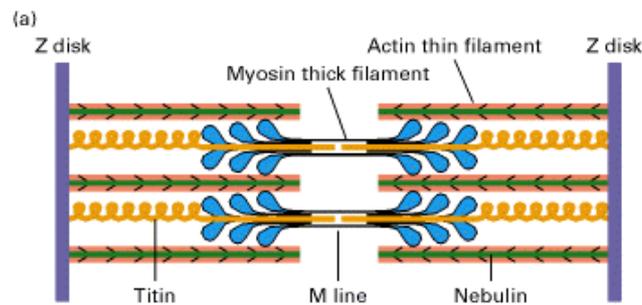


Le estremità – dei filamenti sottili sono protette da **Tropomodulina** che modula la crescita delle estremità negative e contribuisce a mantenere in ordine i filamenti.

### PROTEINE CHE STABILIZZANO L'ALLINEAMENTO DEI FILAMENTI

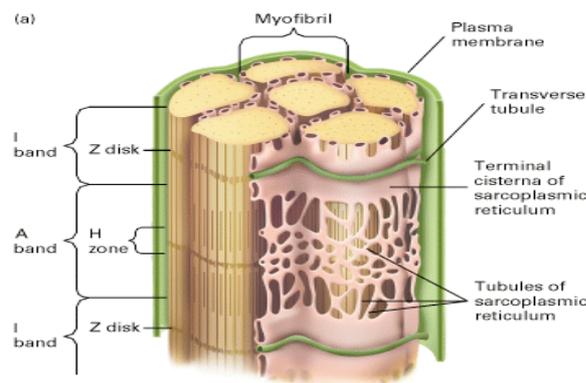
Il muscolo si stira quando i filamenti spessi e sottili non si sovrappongono più. L'elasticità del sarcomero è dovuta alla presenza di proteine che determinano il ritorno del sarcomero alla forma pre-stiramento.

La **Titina o Connectina** è la proteina più grande (>di 2.000.000 MW, 25000-38000 aa) delle nostre cellule: contribuisce al mantenimento dell'architettura del sarcomero, mantenendo centrati i filamenti spessi e fungendo da elastico.

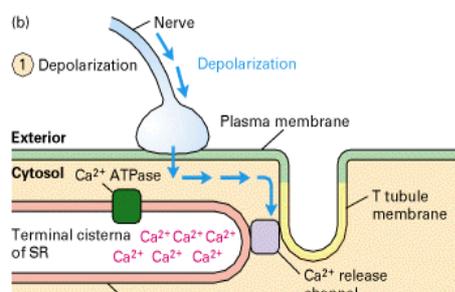


**Nebulina** (700.000 MW) forma lunghi filamenti non elastici, ha contatti solo con l'actina, regola la dimensione della fibra di actina (quindi il numero di G-actine che polimerizzano).

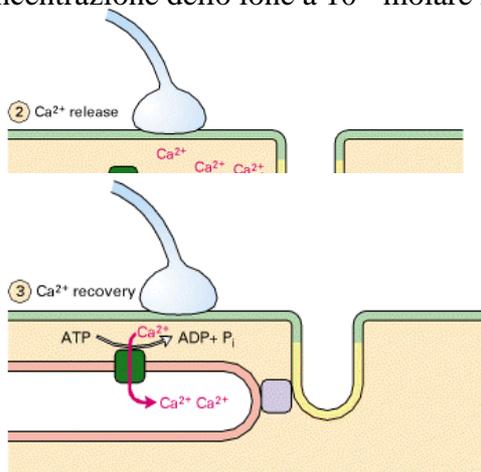
### LA CONTRAZIONE MUSCOLARE



La contrazione inizia con un aumento della concentrazione di calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) nel citosol determinata dalla depolarizzazione della membrana (1). Il regolatore dei livelli di  $\text{Ca}^{2+}$  nel sarcoplasma è il reticolo sarcoplasmatico (SR). SR contiene la proteina **calsequestrina** (64 kDa) in grado di legare con grande affinità il calcio ( $40/50 \text{ Ca}^{2+}/\text{mol}$ ).



Quando la membrana si depolarizza, si attiva il recettore della **rianodina** (lilla) (RYR 1/RYR2) che funziona da recettore canale che si apre (2) in modo che il  $\text{Ca}^{2+}$  fuoriesca dal reticolo per andare nel citosol. L'aumento della concentrazione dello ione a  $10^{-3}$  molare innesca la contrazione .



Terminata la contrazione, (3) la **pompa SERCA** riporta lo ione nel reticolo SR lavorando contro gradiente di concentrazione del  $\text{Ca}^{2+}$  (necessita quindi di ATP), ristabilendo la concentrazione citoplasmatica iniziale di calcio ( $10^{-8}$  molare). Le pompe **PMCA** spostano analogamente il calcio dal citoplasma all'esterno della cellula attraverso la membrana plasmatica.

La pompa SERCA, come la PMCA, è una ATPasi (cioè idrolizza ATP per avere l'energia necessaria al trasporto attivo) che viene attivata dal calcio stesso quando la sua concentrazione è troppo elevata. Il recupero della concentrazione ottimale di calcio nel SR avviene in 30ms (da  $10^{-5}$  a  $10^{-8}$  M).

Il rilassamento del muscolo quindi richiede ATP. Senza ATP la pompa SERCA non funziona, ma l'interazione miosina-actina è facilitata dagli alti livelli di  $\text{Ca}^{2+}$ . Inoltre, senza ATP, il distacco ATP-dipendente della testa della miosina dalla actina non può aver luogo, con conseguente rigidità (il muscolo rimane contratto, rigor).

## MECCANISMI CHE REGOLANO LA CONTRAZIONE MUSCOLARE

### 1) MECCANISMO BASATO SULL'ACTINA (nei muscoli striati e nel miocardio)

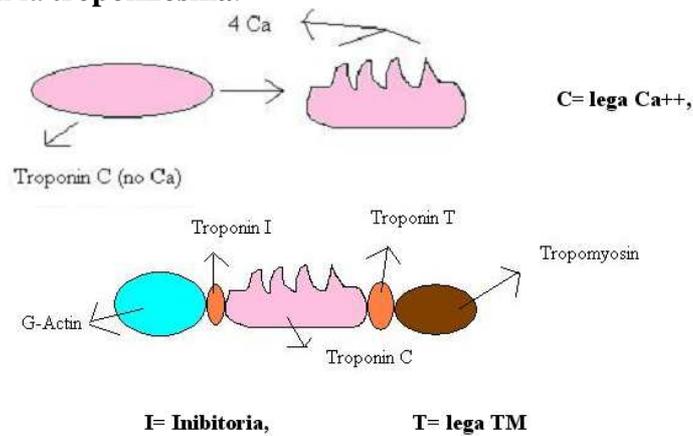
Nel muscolo scheletrico a riposo la contrazione è inibita e tale inibizione deve essere rimossa per attivare la contrazione. L'agente inibitorio è il sistema della **tropomiosina** (TM).

**La tropomiosina** è una lunga proteina fibrosa con struttura ad  $\alpha$ -elica che si associa ad un'altra molecola per formare una doppia  $\alpha$ -elica



La Tropomiosina lega actina e **Troponina T**, una componente del complesso troponinico.

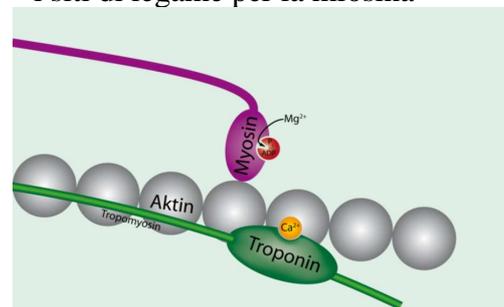
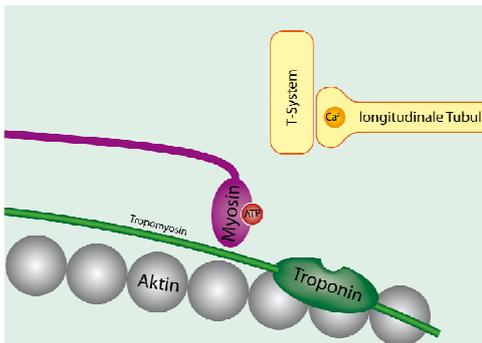
**La troponina (TN)** è formata da 3 proteine globulari, TN-C, TN-I, TN-T. **TN-C** lega ioni calcio, ha 4 siti di legame nel muscolo scheletrico, 3 nel miocardio, e **controlla la posizione di TM** sulla superficie dei filamenti di actina. **TN-I** ha funzione inibitoria ed è in contatto con la G-actina. **TN-T** è in contatto diretto con la **tropomiosina**.



**La tropomiosina può occupare due posizioni alternative sul filamento di actina:**

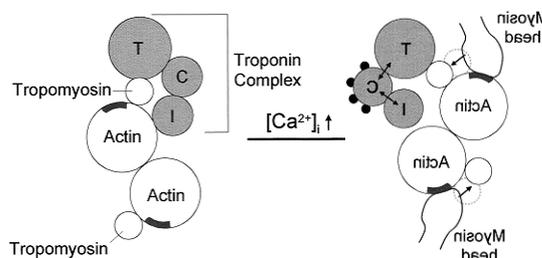
- **non permissiva alla contrazione**,  
con la TM che blocca sull'actina  
i siti di legame per la miosina

- **permissiva alla contrazione**,  
quando Ca<sup>2+</sup> aumenta, la TM  
si lega alla TN e induce una  
variazione conformazionale.  
TM si sposta in basso liberando  
i siti di legame per la miosina

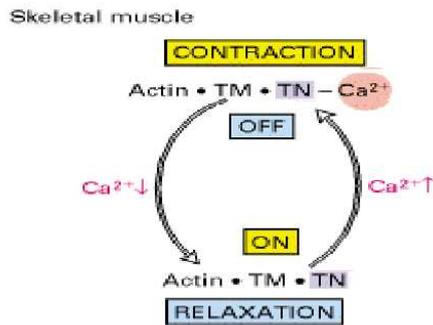


L'aumento di concentrazione dello ione **Ca<sup>2+</sup>** comporta il suo legame alla TN-C con variazioni conformazionali e spaziali delle rimanenti proteine del complesso.

**“Meccanismo allosterico”**



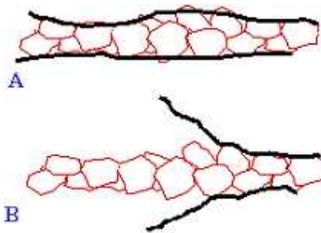
Si tratta quindi di un meccanismo di regolazione dipendente dal calcio. Il controllo è negativo perchè è spento quando c'è contrazione.



A basse concentrazioni di  $Ca^{2+}$  si ha la fase di riposo (relaxation) e non c'è contrazione in quanto la miosina non è attaccata all'actina.

L'aumento della concentrazione del  $Ca^{2+}$  innesca la contrazione. Il sistema di regolazione negativa TM-TN è spento dal legame con lo ione  $Ca^{2+}$

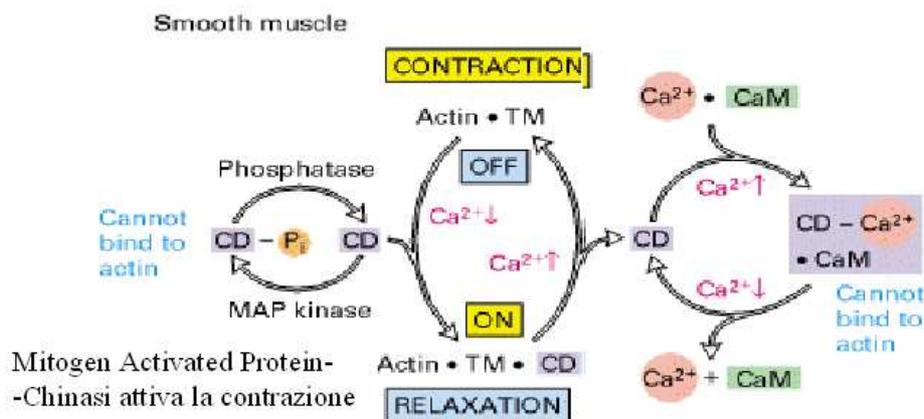
Nel muscolo liscio, la contrazione è più lenta a causa delle sue proprietà: rete disordinata di actina-miosina e variazioni più lente del  $Ca^{2+}$  citosolico. E' sempre un controllo mediato dal calcio, ma non c'è la troponina che "sente" il calcio. C'è invece il **caldesmone**, una proteina di PM tra 85000-150.000, di forma allungata che **lega l'actina a bassa concentrazione di  $Ca^{2+}$** .



Caldesmone legato all'actina: a sette monomeri, o a tre monomeri

Quando **cala la concentrazione di calcio, il caldesmone (CD) si lega a TM**, bloccandola e impedendo la contrazione (Actina, TM, CD).

Il **caldesmone (CD)** può legarsi anche alla **calmodulina (CaM)**, una proteina legante il  $Ca^{2+}$ , CaBP, calcium binding protein) ad alta concentrazione di  $Ca^{2+}$ .

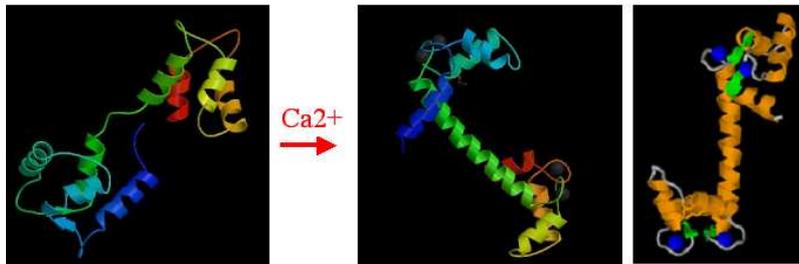


Quando **la concentrazione di calcio aumenta, il  $Ca^{++}$  si lega alla calmodulina**. La CaM adesso è capace di sottrarre il caldesmone alla TM poichè lo lega ( $CD-Ca^{2+}-CaM$ ). Pertanto, le teste di miosina si possono attaccare all'actina (contrazione).

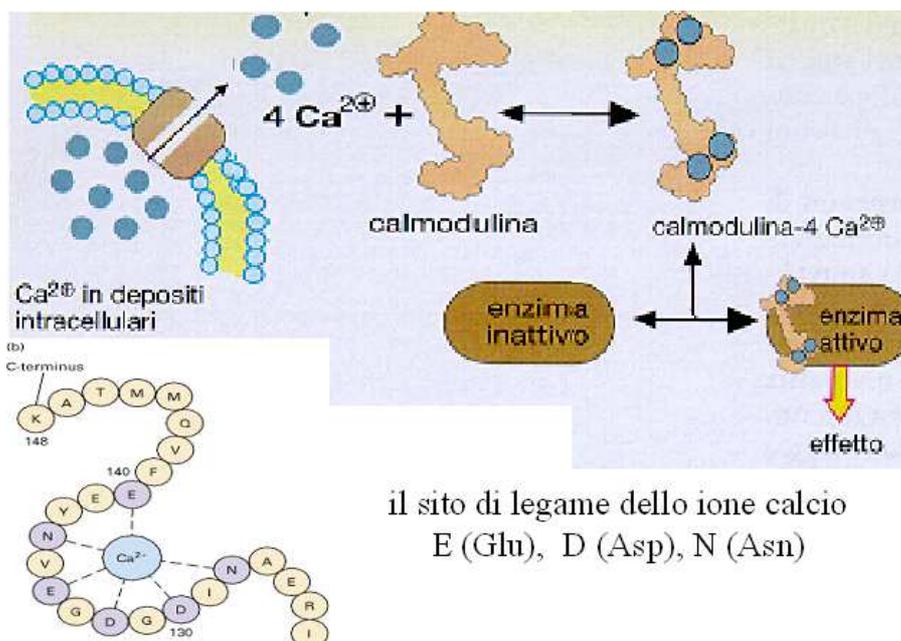
Il controllo non è regolato solo dal calcio, ma anche dalla **fosforilazione del caldesmone**. La fosforilazione avviene ad opera di chinasi come la MAP chinasi. Il CD fosforilato (CD-Pi) è inattivo e rimane lontano dalla TM, determinando l'attivazione della contrazione. Aumentando la fosforilazione, aumenta la contrazione.

### La CALMODULINA

E' una proteina di 148 aa e 17 kDa, un sensore del  $Ca^{++}$  e traduce il segnale del  $Ca^{++}$  modulando l'attività di altre proteine.



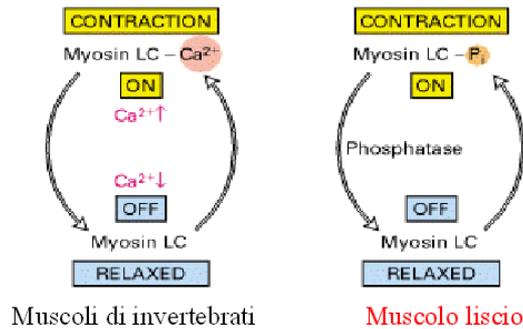
Il legame col calcio induce un cambiamento conformazionale e funzionale della proteina. Col cambio di forma vengono esposti all'esterno una serie di siti idrofobici (localizzati nella regione a lunga alfa elica) tramite i quali la CaM lega altre proteine.



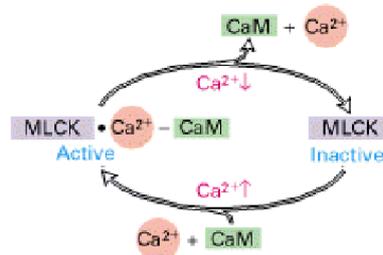
Gli ioni si legano alla calmodulina in una regione ricca di E (glu), D (Asp) e N (Asn).

## 2) MECCANISMO BASATO SULLA MIOSINA

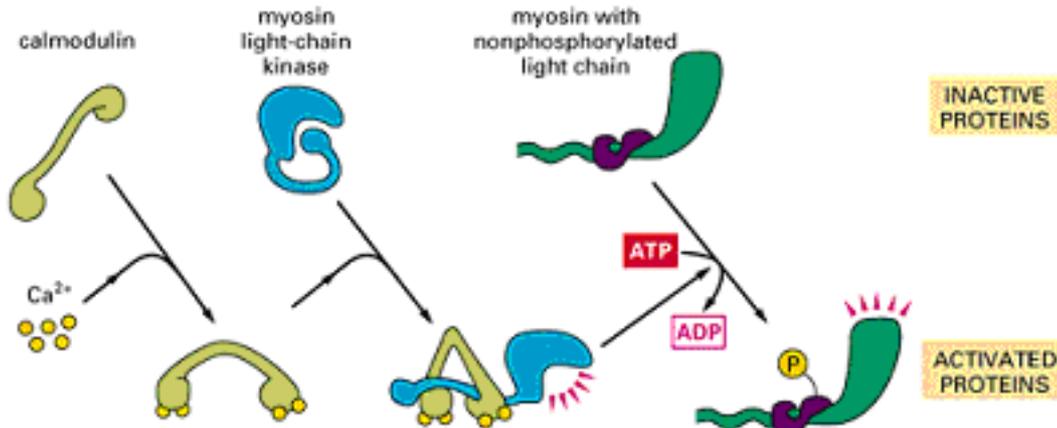
**Il controllo è positivo** poichè determina la contrazione, dipende dal  $Ca^{++}$  e dalla fosforilazione. **Nel muscolo non scheletrico**, la contrazione è sempre regolata dal  $Ca^{++}$ . La **catena leggera (regolatoria) della miosina** (MyLC, diversa da quella del muscolo striato) lega il  $Ca^{++}$ . La MyLC legando il calcio, induce una variazione conformazionale nella testa della miosina, che diventa capace di legare l'actina. Con l'idrolisi di ATP si ha contrazione.



Nel **muscolo liscio** prevale un sistema che coinvolge la **fosforilazione** e la **defosforilazione** della **MyLC** regolatoria. Esiste una **chinasi** (**MLCK**, kinasi della catena leggera della miosina) che attiva la contrazione trasferendo un fosfato sulla catena leggera della miosina. C'è anche un enzima **fosfatasi** che idrolizza il fosfato e rilascia la LC (Light Chain) della miosina. Questa chinasi viene attivata dalla calcio-calmodulina.



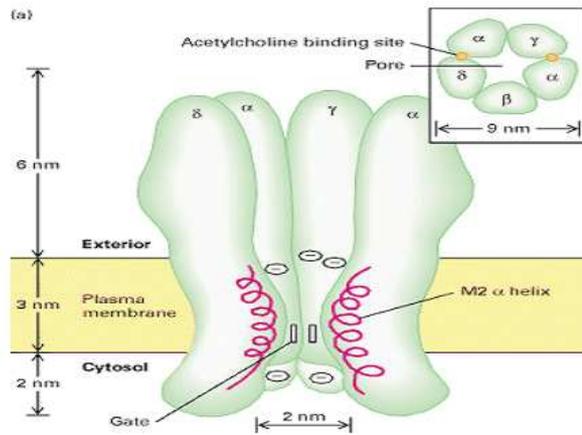
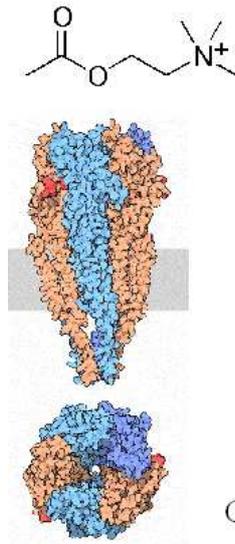
**MLCK**: kinasi della catena leggera della miosina. Le kinasi fosforilano utilizzando il fosforile di un nucleotide trifosfato. La MLCK è attivata dallo ione  $Ca^{++}$   
 Riassumendo: il  $Ca^{2+}$  si lega alla calmodulina, questa lega ed attiva la chinasi della catena leggera, che fosforila la MyLC, che a sua volta attiva la testa della miosina.



Più è alto il calcio, più la fosforilazione è maggiore e viceversa. In fase di rilassamento MLCK è inattiva, si attiva quando aumenta la concentrazione di calcio. Se questa cala, il calcio si stacca dalla Calmodulina che non rimane più legata alla miosina LC.

### ALTRI ESEMPI DI PROTEINE CHE CONTRIBUISCONO ALL'EFFICACIA DELLA CONTRAZIONE

Il recettore dell'acetilcolina, un recettore di membrana  
 L'**acetilcolina** è un agente vasodilatatore del muscolo liscio dei vasi.

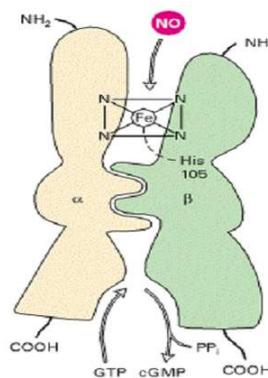
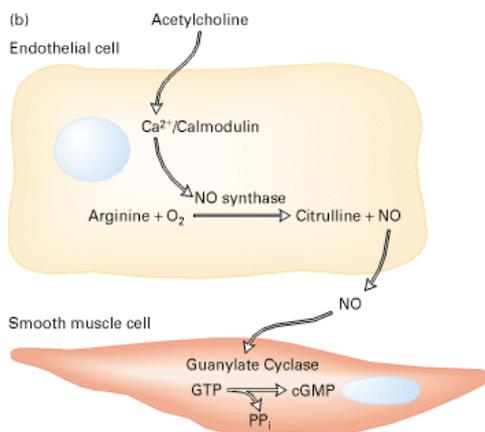


Canale cationico ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ) attivato da ligando  
Domini Transmembrana strutturati ad alfa elica

Il canale-recettore dell'acetilcolina è formato da 5 subunità transmembrana ( $\alpha$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ). Il legame con l'acetilcolina (rossa nel modello a sinistra e gialla in quello a destra) avviene sulle catena  $\alpha$ . Ciascuna subunità è formata da vari domini/regioni transmembrana, uno dei quali ha una distribuzione particolare di amminoacidi carichi negativamente: sono le regioni ad alfa elica che contribuiscono alla formazione della parete negativa del canale, perché al suo interno passano cationi ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ).

L'**acetilcolina** è importante nella regolazione della circolazione a livello delle fibre muscolari: è responsabile della vasodilatazione agendo sulle cellule endoteliali. Il meccanismo alla base di questo fenomeno dipende dal calcio.

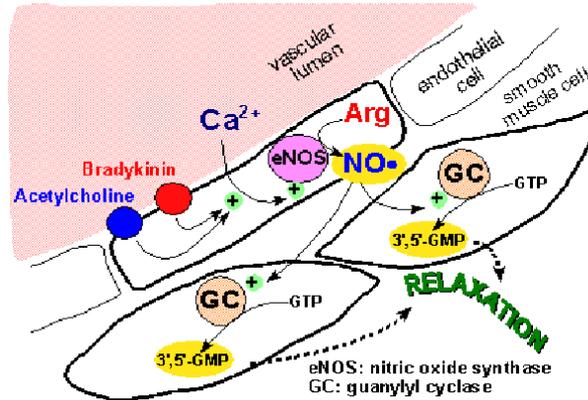
L'acetilcolina, tramite il ciclo dei fosfoinositoli (vedi oltre), aumenta il  $\text{Ca}^{2+}$  ed attiva la calcio-calmodulina. La  $\text{Ca}^{2+}$ +CaM interagisce con la proteina **NO sintasi** (sintasi del monossido d'azoto o ossido nitrico), aumentando la sintesi di NO. Questo viene rilasciato dalla cellula endoteliale ed entra nelle cellule muscolari lisce dei vasi dove attiva l'enzima **guanilatociclastasi**. Il **cGMP** (guanosin-monofosfato-ciclico) induce il rilassamento dei muscoli, attivando proteine chinasi che fosforilano specifiche proteine che determinano il rilassamento.



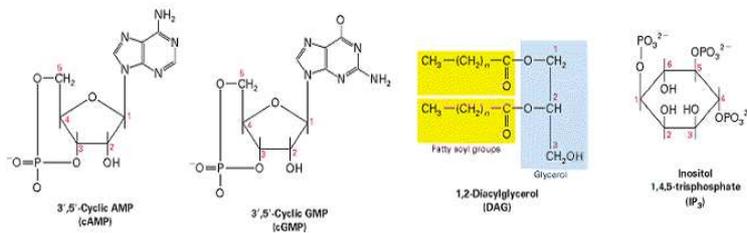
Guanilato ciclastasi:  
Eme come  
gruppo prostetico

**NO** è un **messaggero extracellulare ed intracellulare** perché è prodotto dall'endotelio, ma agisce sul mioblasto.

### Endothelium-dependent Vascular Relaxation



### APPROFONDIMENTO SUI MESSAGGERI INTRACELLULARI:



Nucleotidi

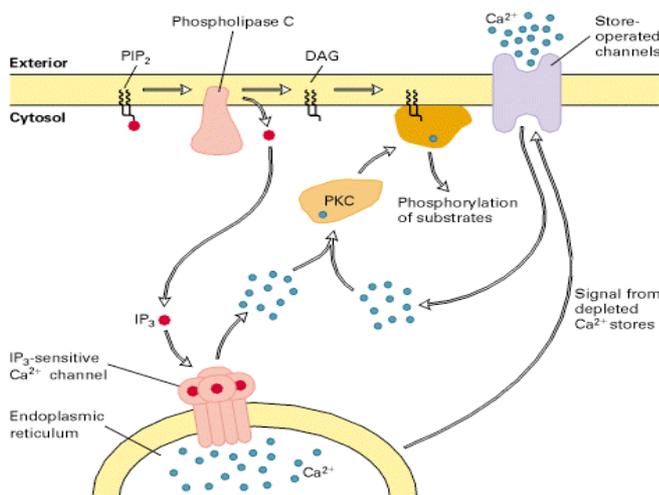
Lipidi

Alcool  
fosforilato

I messaggeri intracellulari principali sono: lo **ione Ca<sup>++</sup>**, i nucleotidi come **cAMP**, **cGMP**, lipidi come **DAG** e l'alcool fosforilato **inositolo trifosfato (IP<sub>3</sub>)**.

### Ciclo dei fosfoinositoli (IP) e PKC (proteine chinasi C)

**eccitazione della membrana**



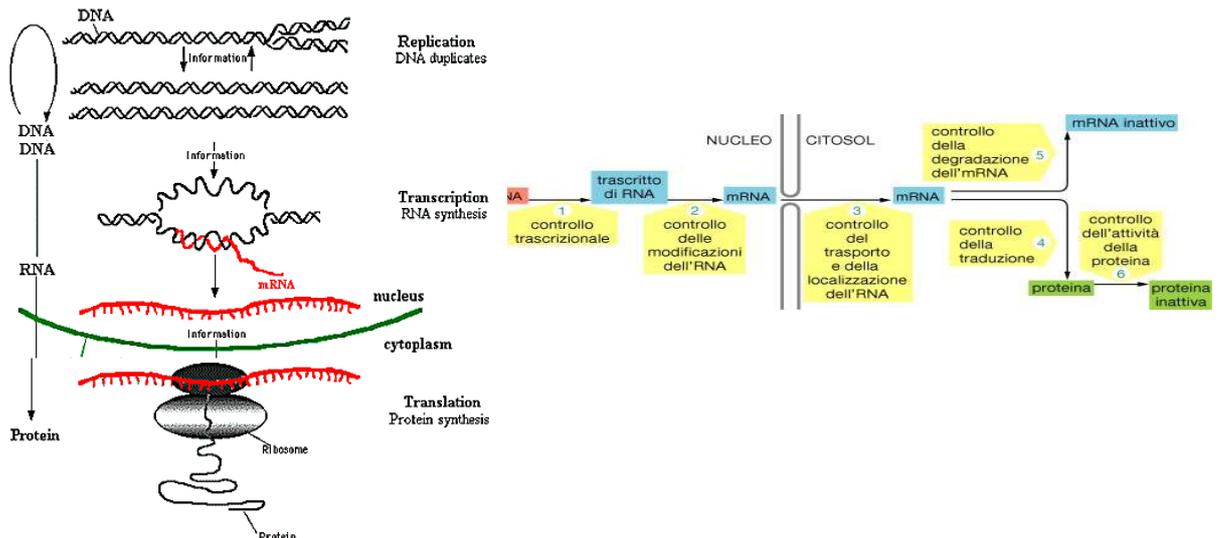
Nella membrana c'è **PIP<sub>2</sub>**, fosfatidil inositolo bifosfato. L'enzima fosfolipasi C, per eccitazione della membrana, scinde il PIP<sub>2</sub> in **PI** (inositolo fosfato) e **DAG** (diacilglicerolo). Sono entrambi messaggeri intracellulari, ma DAG sta sulla membrana a causa della struttura (ha 2 code di acido grasso idrofobiche), mentre PI si lega ad un recettore specifico sulla membrana del reticolo endoplasmatico (RE), detto **IPR**, recettore di IP, che è il canale di uscita degli ioni calcio.

Il calcio nel citoplasma si lega alle **PKC, proteine chinasi C**, che, posizionandosi sulla membrana, ne fosforilano alcune proteine. Insieme al DAG, la PKC attiva **canali di membrana** per il passaggio di calcio nel citoplasma, amplificando il segnale.

Quindi sia PI che DAG sono messaggeri intracellulari che intervengono per l'apertura di canali per il calcio.

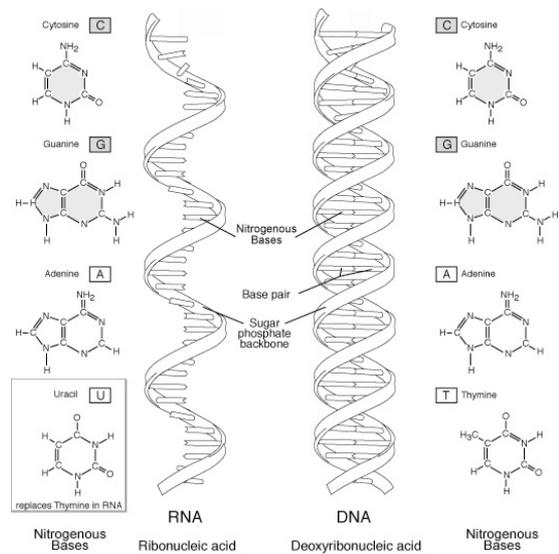
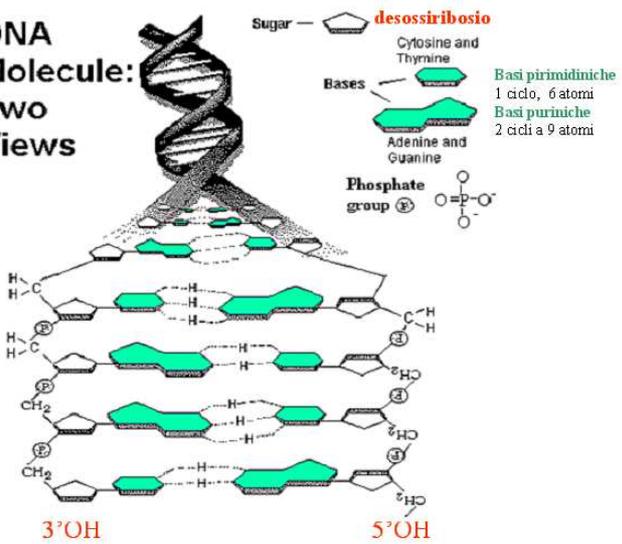
## IL FLUSSO DELL'ESPRESSIONE GENICA (DNA → RNA → proteine) ED IL SUO CONTROLLO

Le caratteristiche morfologiche e funzionali di ogni cellula ed organismo dipendono dal genoma che li caratterizza e dalla sua espressione, controllata a diversi livelli.

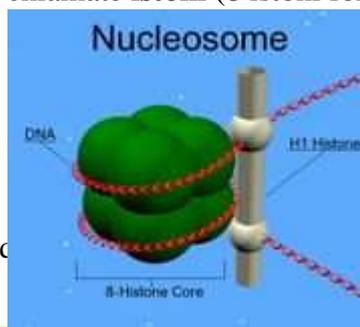


Il **DNA**, che contiene l'informazione genetica, è costituito da una struttura a **doppio filamento antiparallelo**. Ogni filamento è un polimero di desossiribonucleotidi monofosfati, caratterizzato da estremità 3' e 5' terminali legate ad un gruppo -OH.

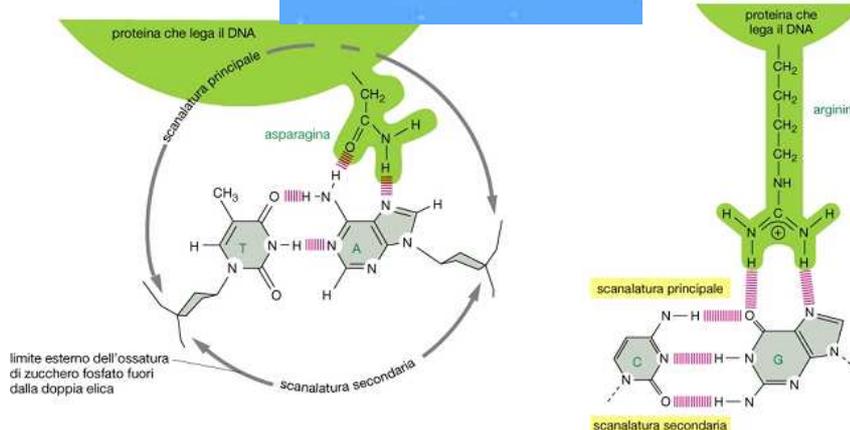
# DNA Molecule: Two Views



A differenza dei ribonucleosidi che caratterizzano l'RNA, il **desossiribonucleotide** è formato dallo zucchero **desossiribosio** (che, rispetto al ribosio, manca dell'ossigeno sul carbonio 2'). Lo zucchero è legato a livello del carbonio 1 (C1') ad una base **purinica (adenina o guanina, 2 cicli a 9 atomi)** o **pirimidinica (citosina o timina, 1 ciclo a 6 atomi)**, ed il C 5'partecipa ad un legame estere con un **gruppo fosfato** (caratterizzato da due cariche negative). Il DNA quindi è carico negativamente ed interagisce con proteine basiche chiamate **istoni** (8 istoni formano un nucleosoma).

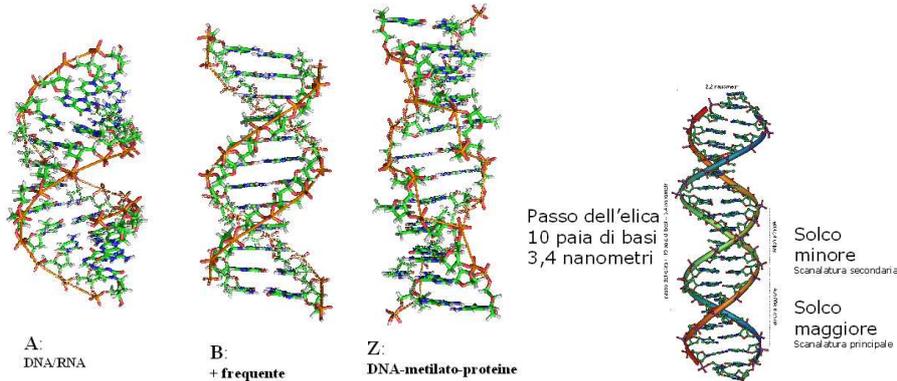


Le interazioni DNA-proteine sono controllate da ioni calcio, magnesio o sodio, o da ioni ammonio o salini.



Gli aa nelle proteine non solo riconoscono la carica nel DNA, ma riescono a leggere la sequenza delle basi.

## LA STRUTTURA/CONFORMAZIONE DEL DNA

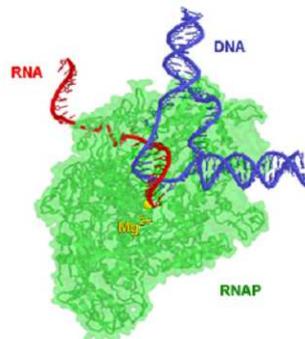


Il DNA può assumere varie conformazioni. La conformazione **B** è la più frequente nelle condizioni cellulari. La forma B presenta un ben distinto solco maggiore e solco minore: il primo più accessibile al riconoscimento e legame da parte dei fattori trascrizionali, il secondo meno accessibile e quindi di scarsa lettura. La diversità della struttura dipende dalle sequenze nucleotidiche e da varie condizioni saline e modifiche delle basi. Tale diversità implica una variabilità della funzione trascrizionale.

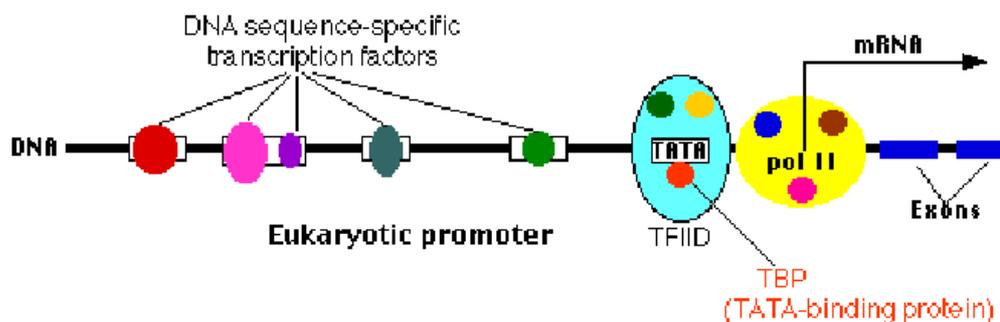
L'**RNA** è ad **unico filamento** e presenta la base **uracile** invece della timidina. Lo zucchero è il ribosio avente un gruppo -OH in posizione 2'.

La **trascrizione del DNA in RNA** (ad es. mRNA, RNA ribosomiale, tRNA ed altri RNA) avviene ad opera delle RNA polimerasi. Avviene sia per il genoma nucleare che per quello mitocondriale.

La RNA polimerasi II (RNA pol II, RNAP II) catalizza la seguente reazione:

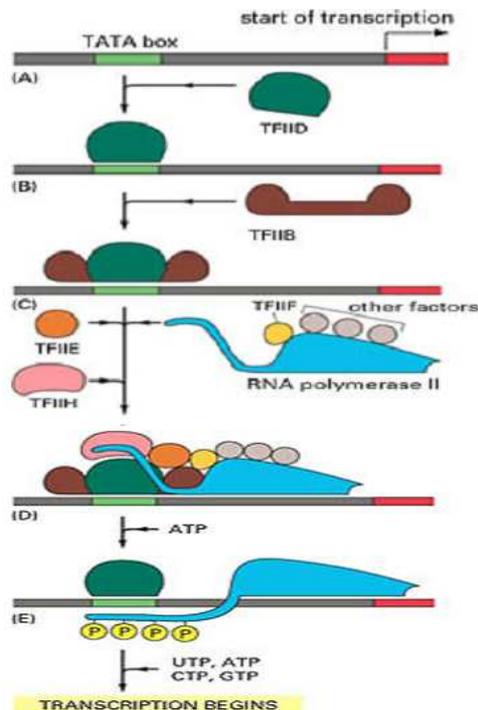


La RNA pol II (complesso di 12 proteine) trascrive i geni che codificano per proteine. Essa si lega al promotore del gene, una regione variamente ampia che contiene sequenze specifiche dette elementi (fattori cis), riconosciute da fattori trascrizionali (fattori trans).



Il sito di inizio (freccia) è preceduto da sequenze segnale quali la **TATA Box** (timina-adenina x 2). I **fattori trascrizionali** sono proteine che, legandosi a siti specifici sul DNA, aiutano la RNAP II a posizionarsi bene sul sito d'inizio. Vi sono **fattori generali** della trascrizione, come quelli che contribuiscono alla formazione del complesso d'inizio, all'allungamento e alla terminazione della

trascrizione (vedi immagine successiva) e che sono presenti in tutte le cellule. Inoltre, vi sono **fattori trascrizionali specifici** che sono indispensabili al controllo dell'espressione di geni specifici (specificità di tessuto, stadio/tempo..., ad esempio le sfere colorate dal rosso al verde dell'immagine precedente).



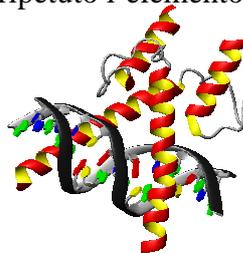
Perché la trascrizione abbia inizio, l'enzima RNAP II deve essere fosforilata sulla coda Carbossi-terminale.

### IL CONTROLLO DELL'ESPRESSIONE GENICA

Il controllo dell'espressione genica avviene prevalentemente a livello dell'inizio della trascrizione, grazie all'interazione del DNA con proteine specifiche, che legandosi a sequenze "enhancer-attivatrici", o "silencer-silenziatrici" determineranno il livello dell'espressione del gene. Numerose, anche centinaia, possono essere le proteine che interagiscono in una regione promotrice per controllare la trascrizione del gene.

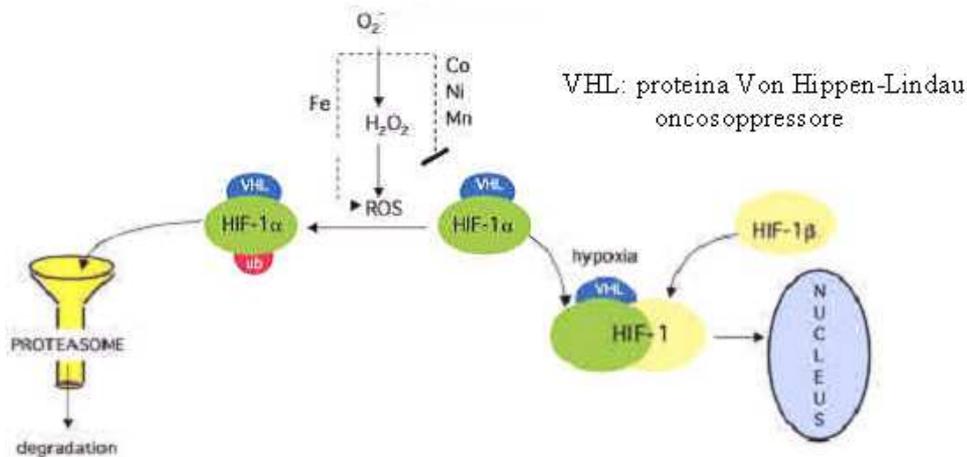
### HIF1, HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR, FATTORE INDUCIBILE DALL'IPOSSIA.

**HIF-1** è una proteina eterodimerica formata da una subunità  $\alpha$  (120 kDa) e una subunità  $\beta$  (91/94 kDa); presenta una regione a struttura helix-loop-helix (elica, ansa, elica) con la quale interagisce col DNA, nelle sequenze in cui è presente e ripetuto l'elemento 5'ACGTG3'-.



Questo dimero si forma quando c'è carenza di O<sub>2</sub> nella cellula (sotto il 6%), e fa in modo che la RNAP II trasciva geni responsivi all'ipossia, che codificano cioè per proteine che permettono di reagire alle condizioni ipossiche.

Diminuita ossigenazione o aumentato consumo di O<sub>2</sub> → diminuita conc. di O<sub>2</sub> nella cellula → aumentata attività di HIF1 → Aumentata espressione genica → Variazione di risposte fisiologiche cellulari o sistemiche



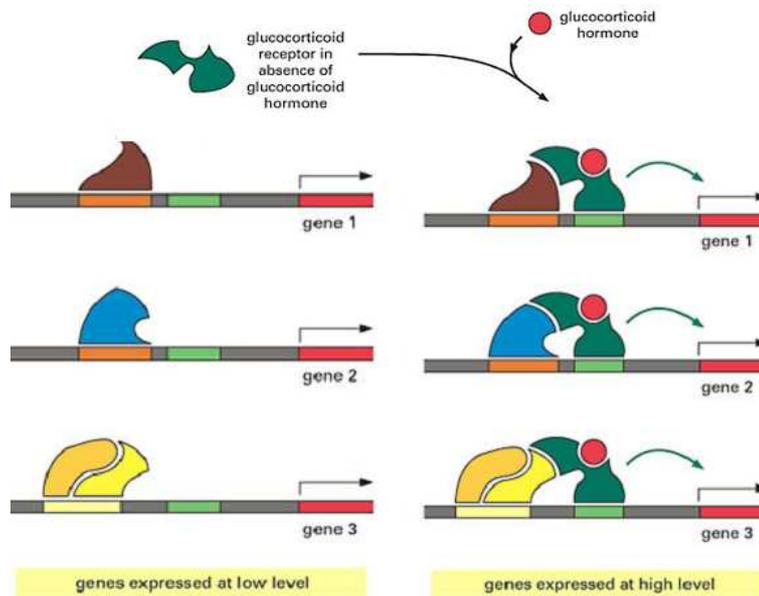
L'ipossia e la chelazione con ferro aumentano l'emivita dell'HIF1 $\alpha$ , permettendo la formazione degli eterodimeri funzionalmente attivi HIF1 $\alpha$ -HIF1 $\beta$

In condizioni di normossia HIF1 $\alpha$  (che nella cellula è sempre trascritto e tradotto) viene rapidamente degradato mediante la **via ubiquitina-proteasoma** (HIF1 si lega a Ub –ubiquitina- e VHL che lo trascinano dentro il proteosoma) dove viene degradato fino a singoli amminoacidi. In caso di ipossia, HIF1 $\alpha$  si lega a HIF1 $\beta$ , ed insieme entrano nel nucleo per legarsi al DNA, riconoscendo l'elemento responsivo a HIF, e inducono la trascrizione dei seguenti geni:

- Epo (Eritropoietina)
  - LDH-A (lattato deidrogenasi)
  - ET-1 (fattore di crescita endoteliale)
  - Transferrina (Tf) + recettore di Tf
- } aumentata distribuzione di O<sub>2</sub>
- VEGF, fattore di crescita dell'endotelio vascolare
  - PDGF- $\beta$ , fattore di crescita delle piastrine
  - bFGF, fattore di crescita dei fibroblasti
- } maggior vascolarizzazione
- glicolisi potenziata (trasportatori del glucosio GLUT-1)
  - adenilato kinasi (sintetizza ATP nel citoplasma fosforilando ADP)
- } diminuito consumo di O<sub>2</sub>

### RECETTORI STEROIDEI: FATTORI TRASCRIZIONALI ATTIVATI DA LIGANDO (ORMONE)

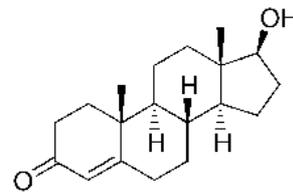
Nella categoria dei fattori trascrizionali vi sono i **recettori nucleari**, i quali non sono altro che fattori trascrizionali attivati dal legame con un ligando. Un esempio di recettori nucleari è quello dei **recettori per gli ormoni steroidei** (ormone glucocorticoide). Solo se sono legati all'ormone, questi fattori trascrizionali possono legare il DNA e controllare il processo trascrizionale. Un recettore steroideo può regolare più geni.



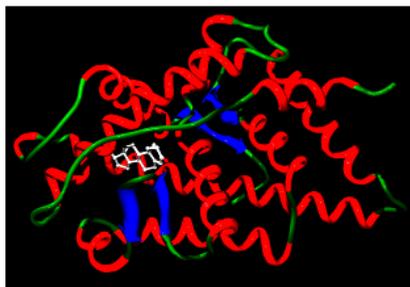
(ad esempio, interazione col gene per la miosina, creatina kinasi etc., attivando o reprimendo a seconda del gene).

Gli **ormoni steroidei** (caratterizzati da 4 anelli e coda alifatica) sono derivati dal colesterolo, divisi in tre categorie: sessuali (testosterone, progesterone), gluco-corticoidi (regolatori della glicemia), mineralcorticoidi (mantengono il bilancio idro-salinico).

### Gli ormoni steroidei (sessuali, glucocorticoidi, e mineralcorticoidi)



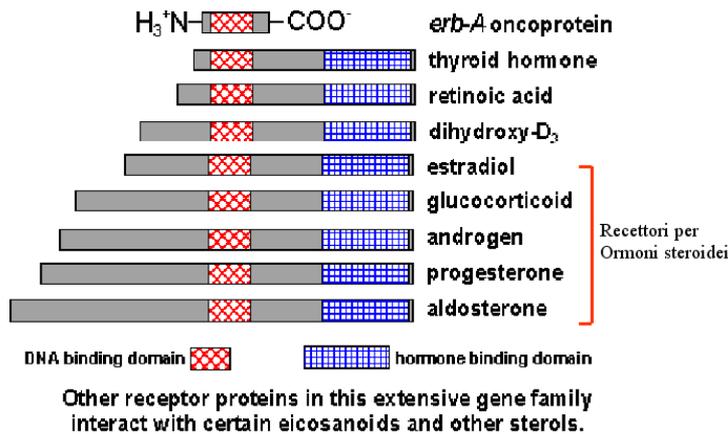
“testosterone”



legandosi ad uno specifico  
recettore nucleare  
(fattore trascrizionale  
attivato dal ligando)

Maintenance of muscle mass and strength.../but...prostate hypertrophy and neoplasia !

La famiglia dei recettori nucleari ha come capostipite un'oncoproteina, **erb-A**. Queste proteine presentano un dominio di legame per l'ormone (parte carbossi-terminale, blu nella figura seguente), un dominio di legame col DNA (porzione interna, rossa), e un parte aminotermine dove ci sono domini importanti per l'interazione con altri fattori trascrizionali, detti di transattivazione.

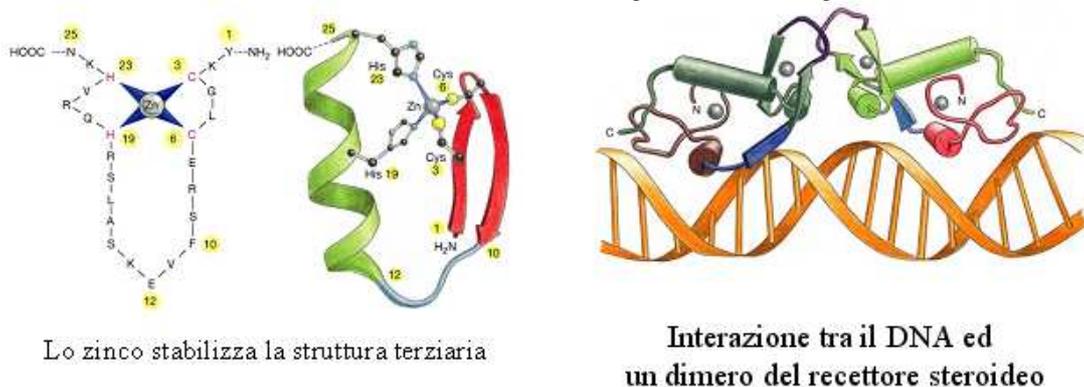


Fanno parte di questa famiglia anche il recettore per la vitamina D e per l'acido retinoico, ambedue importanti per lo sviluppo scheletrico.

Come indicato nell'immagine successiva, il recettore può essere inattivato da una proteina inibitrice (grigia), generalmente una **HSP** (heat shock protein, proteina da shock termico) che si lega al dominio -COOH terminale della proteina, regione blu). L'ormone (sferetta rossa), legandosi al -COOH terminale, attiva il recettore, che cambia forma, si libera della HSP e va nel nucleo. Qui, il recettore attivo si lega ad una **sequenza nucleotidica specifica (elemento, barre rosse)** del DNA e stimola l'apparato trascrizionale ad iniziare, per esempio, la trascrizione del gene bersaglio (giallo).



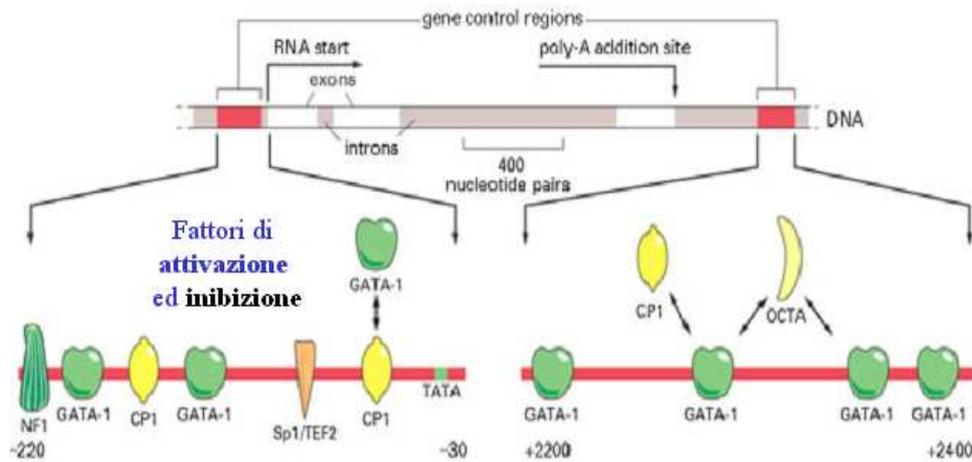
Il dominio della proteina recettore che ne determina il legame al DNA è strutturato a **dita di zinco**. Questi ioni, che coordinano i residui amminoacidici (in rosso) di cisteina (C) o istidina (H) della immagine sottostante a sinistra, determinano una struttura terziaria della proteina idonea per l'interazione col DNA.



Si parla di **REGIONI DI CONTROLLO DEL LOCUS (LCR), regioni del controllo genico del locus**, per quelle sequenze che permettono al gene od ai geni contenuti in una determinata regione (locus) cromosomica di essere trascritti, o viceversa spenti, indipendentemente dall'attività trascrizionale dei geni a loro adiacenti sul cromosoma. Ovvero, ci sono regioni di controllo della trascrizione, per cui ogni cellula può esprimere i propri geni in modo determinato (**SELETTIVITA' DI ESPRESSIONE**), come capita ad esempio per l'espressione dei geni globinici. Il locus contenente i geni di tipo beta globinici sul cromosoma 11 è espresso solo nelle cellule eritroidi e non in altri tessuti. I geni del collagene sono espressi in fibroblasti e non nelle cellule eritroidi. Il differenziamento cellulare è quindi determinato dal tipo e dal cocktail dei fattori trascrizionali presenti nella cellula e legati alle regioni LCR.

Tali regioni sono ricche di sequenze per fattori trascrizionali e possono essere ripetute anche numerose volte. Una stessa sequenza può legare più fattori, sia con funzione attivatoria che con funzione inibitoria. Tali

fattori possono competere per lo stesso sito. Nei geni globinici, ad esempio, ci sono fattori specifici di attivazione (GATA-1) dei geni per le catene globiniche dell'Hb.



## IL TRASCRITTOMA

Tutte le cellule umane di uno stesso individuo hanno lo stesso **genoma**, ma posseggono un diverso **trascrittoma**, cioè **diversi sono i geni che vengono trascritti sia per qualità che per quantità in ogni tipo cellulare**. L'insieme degli mRNA che caratterizza quella particolare cellula è il **trascrittoma** di quella cellula.

**Quale è il trascrittoma delle cellule muscolari? Quali sono i geni essenziali perchè una cellula diventi un mioblasto?**

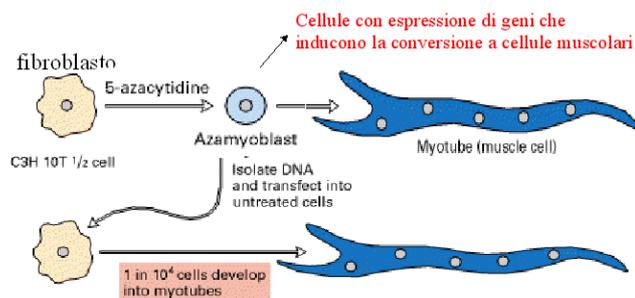
Per rispondere bisogna disporre di mioblasti e identificare gli mRNA espressi in quella cellula.

**Come disporre di mioblasti?**

Chi ha affrontato inizialmente lo studio della identificazione dei geni responsabili per la miogenesi ha deciso di utilizzare fibroblasti, cellule che hanno una derivazione comune a quella dei mioblasti. Nei fibroblasti **i geni muscolo-specifici sono silenti** perchè sono **ipermetilati**: nelle sequenze CpG la C viene metilata a <sup>m</sup>CpG (metil-citosina). Le <sup>m</sup>C legano proteine che portano ad una struttura cromatinica compatta. Ad esempio, possono legare gli enzimi HDAC (istone deacetilasi) che, staccando gli acetili dagli istoni, ne ripristinano i residui positivi di lisina aumentandone il legame al DNA. La loro azione è opposta a quella delle HAT, istone acetil trasferasi, che riducono le cariche negative degli istoni e attivano la cromatina.

Pertanto, la **metilazione genica** è un processo associato alla **repressione del DNA**. La metilazione è svolta da enzimi **DNA-metilasi** che inseriscono i **gruppi metili CH<sub>3</sub> sulla citosina**.

La **azacitidina**, analogo della citidina, agendo da inibitore competitivo della metilasi, è un agente demetilante perchè inibisce la metilazione. Il trattamento di cellule con azacitidina quindi **demetila il DNA ed attiva geni repressi** dalla metilazione.

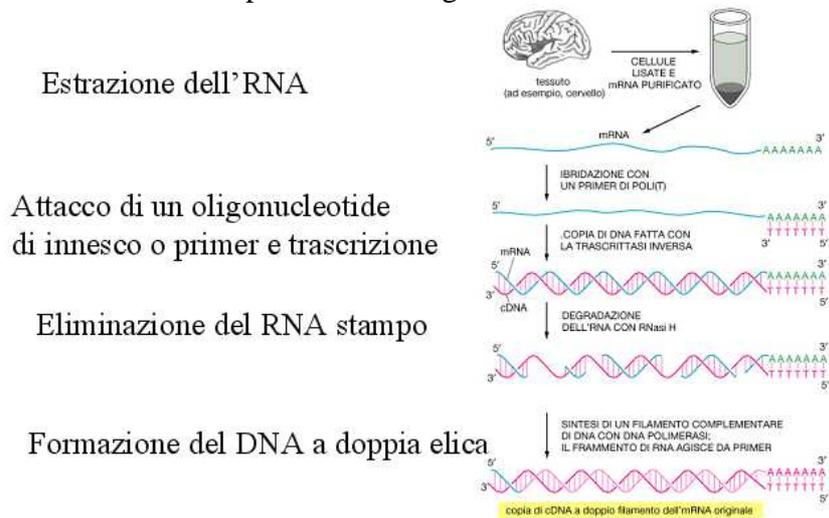


Trattando i fibroblasti murini con l'agente demetilante si ottengono **azamioblasti** (cellule con espressione di geni che inducono la conversione a cellule muscolari). Infatti, tali cellule contengono i geni responsabili

della miogenesi in forma attiva perché il loro DNA è in grado di trasformare dei fibroblasti in miociti e miotubi.

### MA COME STUDIARE GLI mRNA?

Per studiare l'RNA messaggero, che è una molecola instabile, bisogna trasformarla nella sua copia stabile, cioè in DNA. Per studiare gli RNA di una cellula bisogna quindi copiare i suoi mRNA in cDNA (DNA copia dell'mRNA). Per sintetizzare il cDNA si procede all'estrazione dell'RNA dalle cellule o tessuto di interesse ed alle procedure di seguito indicate.

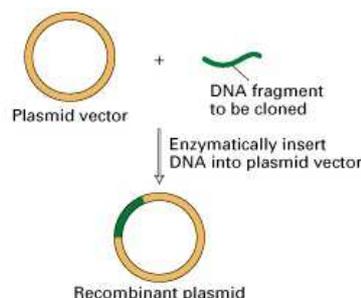


Quindi si sfrutta la caratteristica dell'estremità 3' dell'RNA, cioè la **coda di poly-A** (poliadenilato). Si utilizza l'attacco per complementarità di un **oligonucleotide poly-T** (politimidilato) alla coda di poly-A; questo fungerà da **innesco** (o primer) per la retro-trascrizione dell'mRNA in DNA da parte di una DNA polimerasi RNA-dipendente (la **trascrittasi inversa**) e desossiribonucleosidi trifosfati. Grazie ad una RNasi H (ribonucleasi H, che idrolizza l'RNA in un ibrido DNA/RNA), si ottiene un filamento singolo di DNA che è una copia (cDNA) dell'RNA di partenza. Grazie ad una **Dna polimerasi** si procede alla sintesi di un nuovo filamento di DNA formando il DNA a doppia elica: cDNA a doppio filamento.

Poiché si è partiti da una miscela di mRNA presenti in un campione cellulare, quello che si ottiene a questo punto è una miscela di cDNA. Per studiare i cDNA, bisogna analizzarli singolarmente, ovvero separarli uno per uno e moltiplicarli tanto da poterne disporre di quantità idonee per l'analisi della sequenza nucleotidica o per la loro espressione. Per fare questo bisogna procedere al clonaggio genico.

### IL CLONAGGIO GENICO

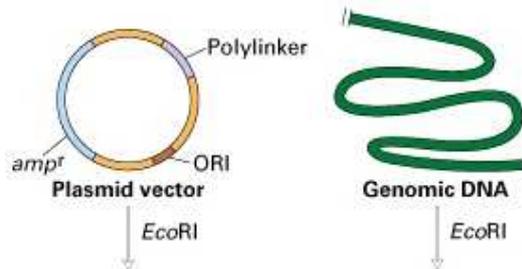
Per clonaggio di un frammento di DNA o di cDNA si intende un insieme di tecniche che permettono di ottenere più copie di una stessa sequenza nucleotidica grazie alla sua inserzione in un DNA vettore ed alla produzione di un clone trasformato col DNA ricombinante.



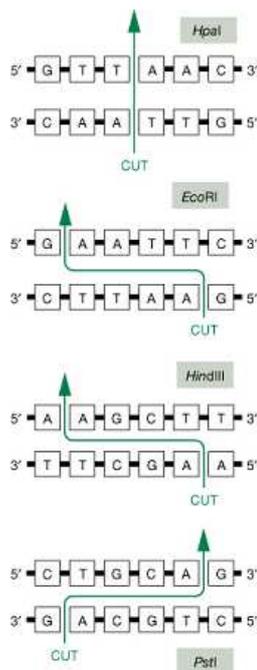
Il **DNA vettore** è un DNA circolare che deve essere linearizzato dal taglio con enzimi di restrizione. Pertanto, il DNA deve avere siti riconosciuti da enzimi di restrizione (**siti di restrizione**) singoli, in genere raccolti in una sequenza denominata **polylinker**. In tali siti,

infatti si dovrà inserire il frammento da clonare. Il vettore è un'entità mobile perchè in grado di uscire/entrare liberamente tra le cellule (ovvero in grado di essere isolato dal DNA dell'ospite, manipolato e quindi riinserto nell'ospite). Il vettore deve essere in grado di replicarsi autonomamente dalla replicazione dell'ospite e deve pertanto possedere una sua **origine di replicazione (ori)**. Il vettore deve avere sequenze che ne permettano l'identificazione, ovvero dei **geni marcatori** (es.  $amp^r$ , gene per la resistenza all'ampicillina), i quali conferiscono la resistenza ad antibiotici. Pertanto, solo le cellule o i batteri che contengono il vettore con una specifica resistenza, potranno crescere in un mezzo di coltura in presenza di quell'antibiotico.

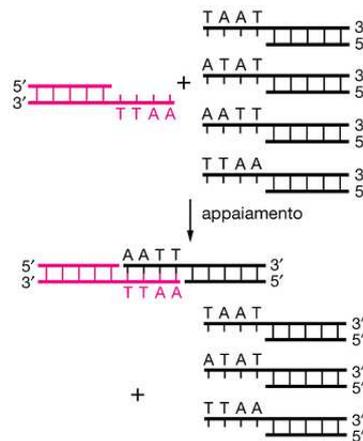
(b) Insertion of *EcoRI* restriction fragments



**Le endonucleasi di restrizione**, usate per aprire il vettore o tagliare il DNA in frammenti specifici, sono forbici molecolari che tagliano il DNA in modo **sito-specifico**, a livello di sequenze specifiche.



Le nucleasi di restrizione producono frammenti di DNA che possono essere uniti

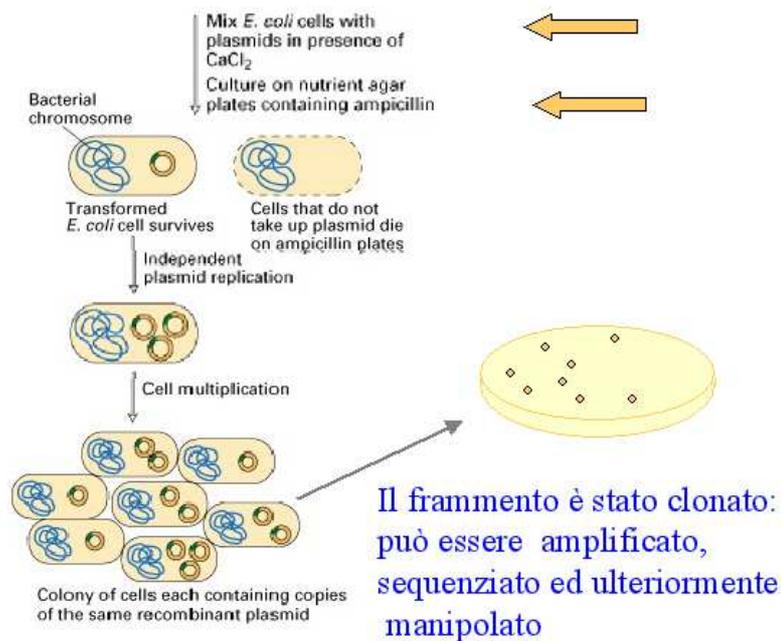


Grazie alla **coesività** delle estremità dei frammenti di restrizione, le stesse forbici sono spesso usate per tagliare il DNA vettore ed il frammento che dovrà essere inserito nel vettore. Il frammento verrà legato covalentemente al vettore grazie ad una **DNA ligasi**. A questo punto si è prodotto il **DNA ricombinante**.

Si possono clonare frammenti di cDNA a doppia elica e frammenti derivati dal genoma di un organismo. Frammenti minori di 10 Kb si clonano in genere in plasmidi batterici, frammenti di dimensioni maggiori in vettori di origine virale o loro ibridi.

## TRASFEZIONE DI BATTERI CON UN PLASMIDIO RICOMBINANTE

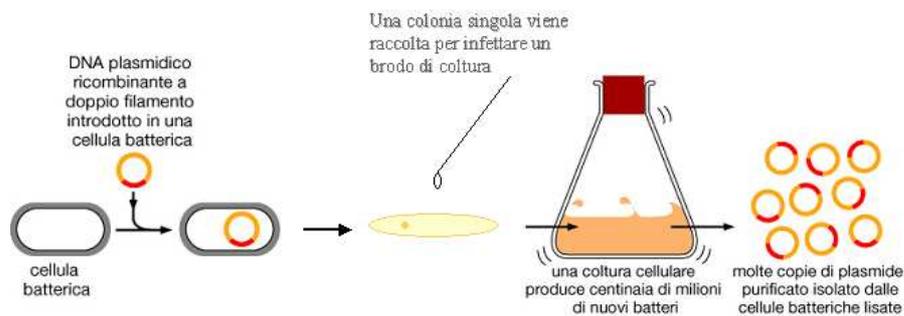
Una volta prodotto il vettore ricombinante, bisogna procedere alla sua purificazione mediante clonazione in cellule o batteri, di solito derivati dei batteri *E. coli*. Batteri e DNA ricombinanti vengono mescolati in rapporti opportuni e, grazie ad aumento della concentrazione dello ione calcio o con altre tecniche, si modifica la parete batterica/cellulare in modo da renderla permeabile al DNA ricombinante. Dopo un certo tempo si procede alla riparazione delle membrane ed isolamento delle cellule/batteri che hanno conservato al loro interno il DNA ricombinante (un ricombinante/un batterio) mediante crescita su terreni selettivi.



Il terreno di coltura deve contenere l'agente selettivo ovvero l'antibiotico per il quale il vettore conferisce la resistenza. Ciò consentirà la crescita solo dei batteri col vettore che formeranno delle colonie di batteri (aventi tutti lo stesso DNA ricombinante, ovvero lo stesso tratto di DNA clonato).

**Ciascuna colonia rappresenta un clone.**

Se si è partiti per il clonaggio con un solo frammento di DNA, si avranno cloni dello stesso frammento, utili per purificarne ed amplificarne la sequenza, che verrà successivamente caratterizzata per sequenza nucleotidica e funzione.

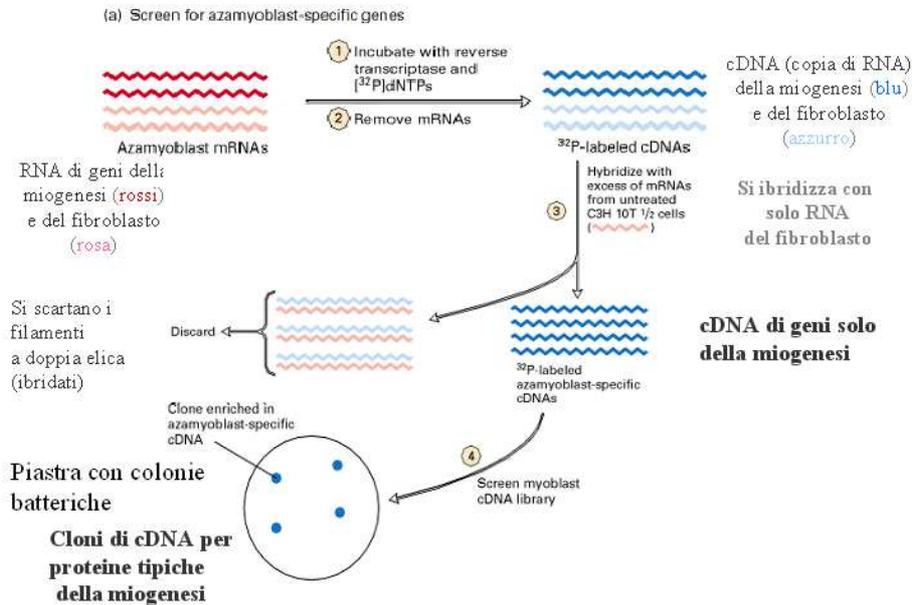


Se si è partiti da cDNA ottenuto da RNA estratto da una cellula/tessuto, l'**insieme dei DNA ricombinanti** (ovvero delle colonie) rappresenta la **libreria o genoteca di cDNA** di quella cellula/tessuto. Se si parte dal DNA di un individuo/tessuto (DNA frammentato da nucleasi di restrizione o per sonicazione) si otterrà la **libreria (o genoteca) del genoma** di quell'individuo o di quel tessuto (ad esempio, tessuto neoplastico).

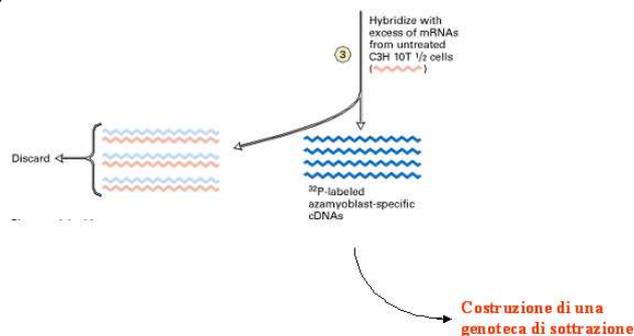


## GENOTECA DI cDNA DI MIOBLASTO OTTENUTA PER SOTTRAZIONE

Si procede alla marcatura del cDNA a doppia elica dell'azamioblasto e da questa miscela verranno isolati cDNA tipici del mioblasto. Allo scopo, il cDNA dell'azamioblasto viene denaturato ed ibridato con RNA del fibroblasto. La popolazione dei filamenti ibridi DNA e RNA verranno scartati, mentre verrà conservata la popolazione dei filamenti di DNA non ibridati che corrisponderanno alla componente mioblastica del sistema.

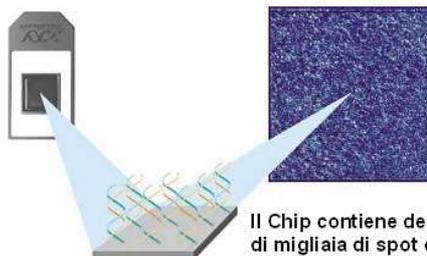


Il DNA radioattivo del mioblasto servirà per analizzare una libreria/genoteca di sequenze espresse nei mioblasti (**Libreria o Genoteca di cDNA** è l'insieme dei cDNA di quel tessuto, rappresenta le sequenze espresse in quel tessuto od in quello stadio differenziativo). Alternativamente, questo cDNA mioblastico potrà essere inserito in un vettore e clonato. L'insieme dei cloni costituirà **una genoteca di sottrazione**.



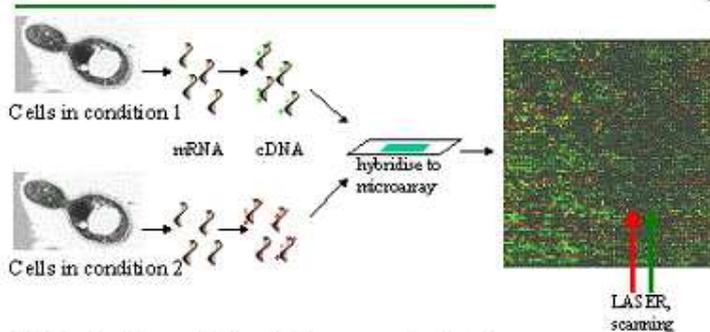
Ancora, il DNA radioattivo potrà essere usato per scrinare **un microarray/chip** sul quale sono state legate le sequenze espresse in muscolo. Questa tecnica permette di studiare oggi molto rapidamente gli RNA

### Analisi di microarray/microchip



Il Chip contiene decine di migliaia di spot di oligonucleotidi/ frammenti di DNA ciascuno dei quali corrisponde ad un gene

presenti in una cellula o tessuto, ovvero il profilo di espressione di quella cellula o tessuto. Si può altresì studiare contemporaneamente l'espressione di 2 diversi tipi di cellule (normale e patologica) sfruttando sonde marcate in maniera differenziale (cDNA della cellula normale in verde, quello della cellula patologica in rosso). L'analisi microscopica al laser di quel chip ci permetterà, per esempio, di identificare i geni che vengono accesi o spenti con la trasformazione neoplastica di un tessuto.



Il cDNA delle cellule 1 è marcato in fluorescenza verde  
 Il cDNA delle cellule 2 è marcato in fluorescenza rossa

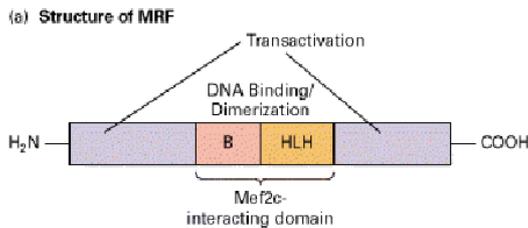
L'analisi finale permetterà di valutare le sequenze ibridate dall'uno e/o dall'altro cDNA:  
**Geni iperespressi**  
**Geni ipoesspressi**  
**Geni non modificati**

## I FATTORI DEL DIFFERENZIAMENTO MIOBLASTICO

La famiglia **MRF** (**muscle-specific regulatory factors**) raccoglie le proteine prodotte da geni per fattori trascrizionali che si legano ai promotori nel DNA di geni importanti per il differenziamento mioblastico quali la desmina, la troponina I, la catena leggera della miosina, etc.. I prodotti dei geni **MEF** invece non inducono la miogenesi, ma aiutano i prodotti dei geni MRF a farlo.

### MRFs muscle-regulatory factors

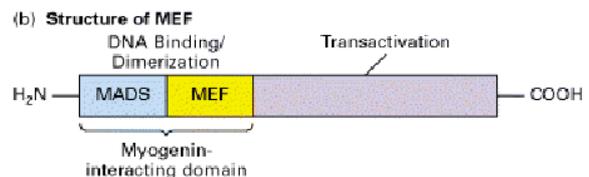
Appartengono alla famiglia di proteine **bHLH - basic-helix-loop-helix - leganti il DNA**



- . Espressi in molti tessuti
- . Etero-dimeri con E2A (bHLH)
- . Legano specifici e multipli *E box* (CANNTG)
- . La proteina E2A è espressa in vari tessuti

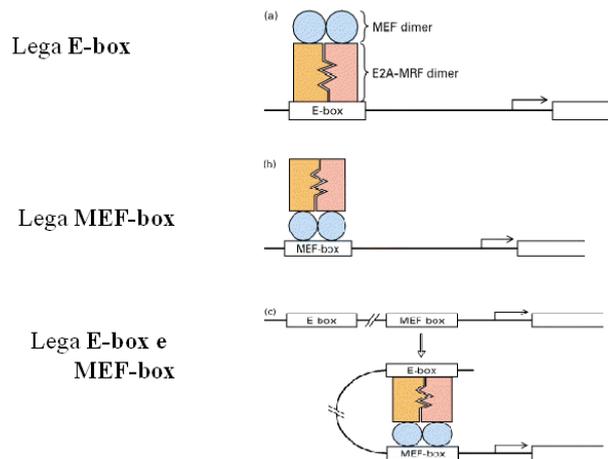
### MEFs muscle enhancer-binding factors

Famiglia MADS



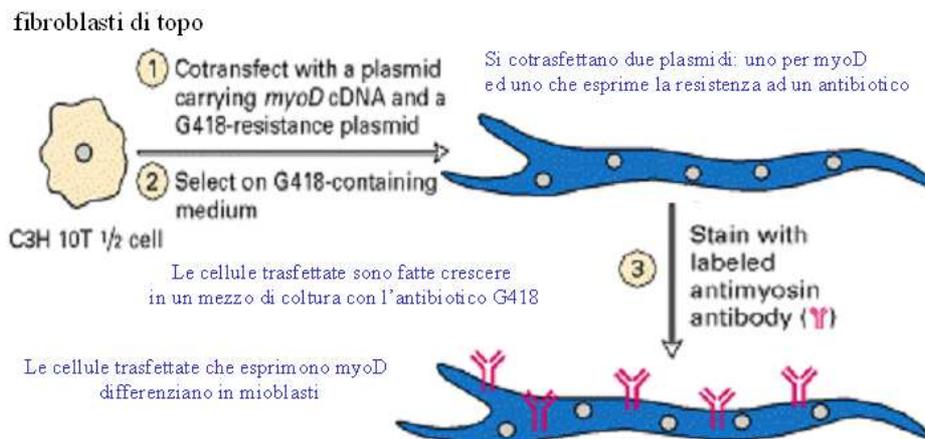
Interagiscono con MRFs-E2A

Il complesso **MRF-E2A-MEF**



Il gene **Myo-D** (myogenic differentiation1) è un membro della famiglia MRF, assieme a **Myf5**, **MRF4** e **Myogenina**. Appartiene alla classe dei fattori trascrizionali basici con dominio di attacco al DNA di tipo helix-loop-helix (HLH), che agiscono come dimeri. Sono presenti anche in tessuti non muscolari.

**L'attività miogenica di Myo-D** è stata dimostrata “*in vitro*” utilizzando il cDNA di Myo-D clonato in un vettore di espressione. Questo vettore è stato trasfettato in fibroblasti nei quali l'espressione del vettore (trascrizione dell'inserto in mRNA e sua traduzione in proteina) ha indotto il differenziamento mioblastico



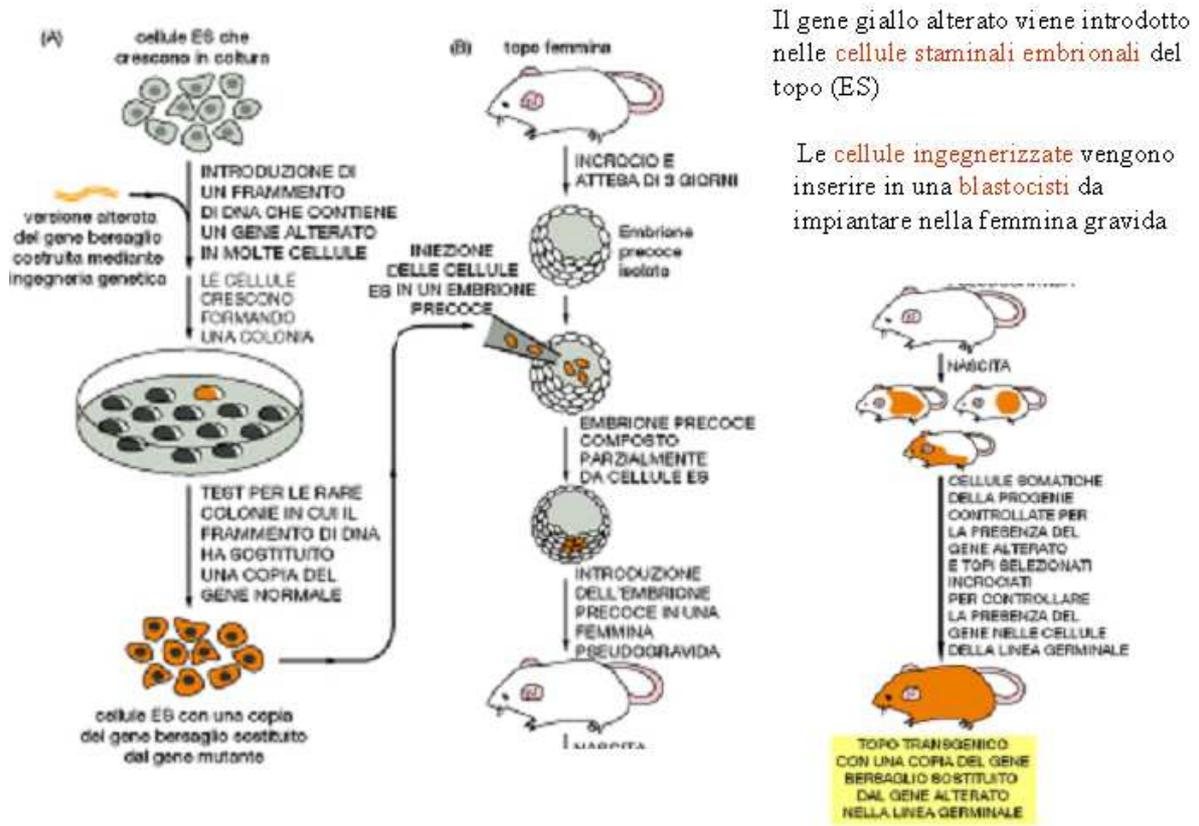
La funzionalità del plasmidio di espressione di myoD è anche dimostrata dalla induzione delle proteine muscolari come la miosina che viene riconosciuta dall'anticorpo specifico

## I TOPI KNOCKOUT E TRANSGENICI

La funzione di una proteina può essere dedotta sia dallo studio degli effetti dell'espressione del suo gene o cDNA in una cellula trasfettata (come mostrato sopra per Myo-D), oppure andando a studiare gli effetti della perdita/alterazione della sua espressione in topi in cui è stato eliminato il gene che la codifica (**topo Knock-out/knock-in**).

# T

## Procedimento per sostituire i geni nei topi

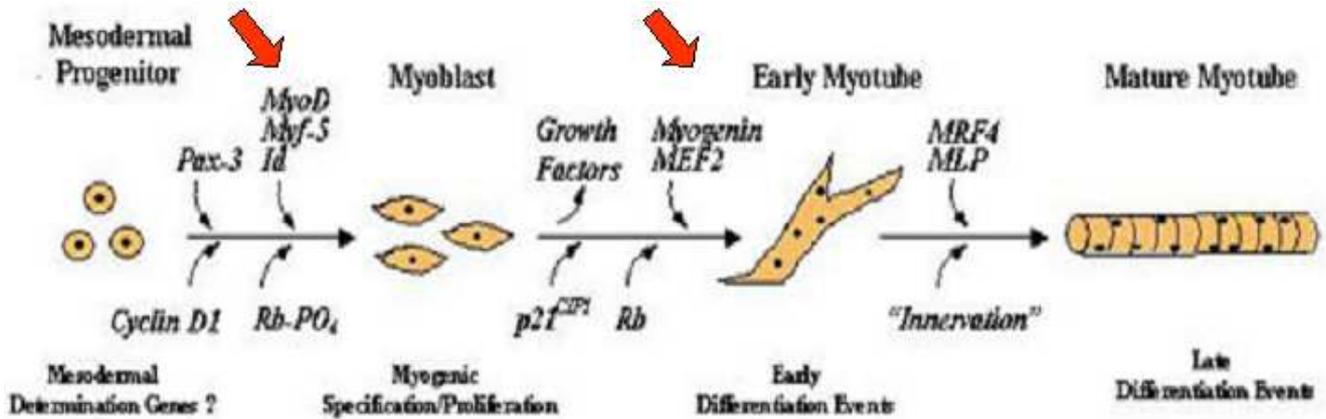


Bisogna conoscere il gene che si vuole studiare ed aver clonato la sequenza genica mutata (deleta totalmente, parzialmente con altre mutazioni). Questi **vettori ricombinanti** vengono trasfettati in **cellule staminali embrionali** in terreno selettivo per permettere la crescita alle sole cellule trasfettate. Le cellule col gene mutato vengono inserite nella **blastocisti** di una femmina gravida. A termine della gravidanza si avranno dei **topini mutati eterozigoti** dalla cui unione si otterranno i topi knockout omozigoti. Questa tecnica è stata applicata per capire la funzione dei geni della miogenesi.

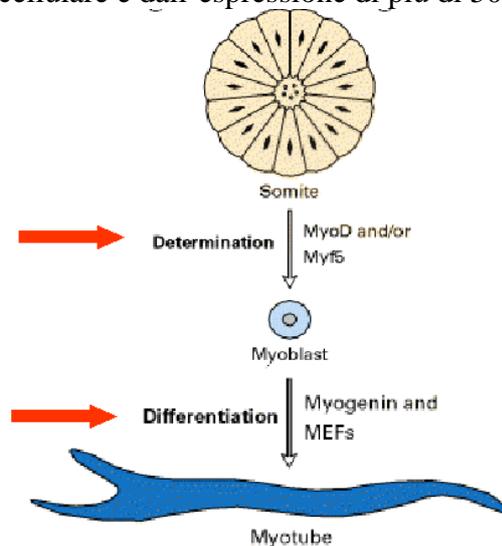
Gli effetti del **knockout dei geni miogenici** in topo sono riassunti nella tabella seguente:

Gene mutato	fenotipo			Ruolo della proteina
	vitale	mioblasto	muscolo	
<i>myoD</i>	Si	+	+	?
<i>myf5</i>	Si	+	+	?
<i>myoD-myf5</i>	No	-	-	Formazione mioblasti o loro sopravvivenza
<i>myogenina</i>	No	+	-	Differenziamento dei mioblasti in muscolo

Se si elimina myoD o myf 5 il topo è vitale. Se ne deduce che le funzioni di myoD e myf5 sono sovrapponibili, fenomeno noto come **ridondanza genica**. Infatti, quando si eliminano sia Myo-D sia Myf-5 non si ottengono organismi vitali e non c'è mioblasto. Se togliamo la myogenina non c'è vita, c'è comunque il mioblasto ma non il muscolo. La miogenina è espressa in uno stadio più avanzato dello sviluppo, come di seguito indicato.



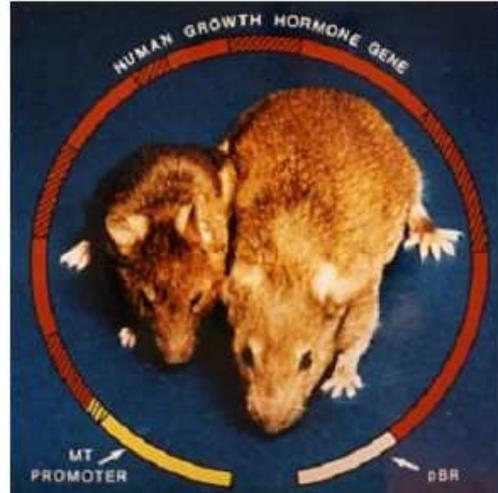
Durante lo sviluppo, le cellule progenitrici mesodermali vengono indotte a diventare diverse linee cellulari, inclusa quella muscolare. I progenitori delle cellule muscolari (i mioblasti) rimangono in uno stato proliferativo finché non sono istruite da Myo-D alla induzione mioblastica (commitment/determinazione) inizialmente e poi a differenziare. Il differenziamento è accompagnato dalla fusione cellulare e dall'espressione di più di 50 geni muscolo-specifici.



Come è possibile eliminare un gene da un organismo, è anche possibile fare esprimere un gene esogeno in tutte le sue cellule: **topo transgenico**. Di seguito sono messi a confronto topi knockout per il **recettore dell'ormone della crescita (GH)** e topi transgenici per il **GH**.



**Topo knockout per alterazioni nel gene per il recettore dell'ormone della crescita**



**Topo transgenico per l'ormone della crescita**

Minore sopravvivenza

Sia gli eterozigoti, sia, ed ancora di più, gli omozigoti per il knockout del recettore del GH sono di dimensioni minori del controllo che possiede il gene wild-type (non mutato); coerentemente, il topo che contiene ed esprime un numero maggiore di copie del gene per il GH è di dimensioni maggiori del controllo.

Un altro esempio di topo transgenico è quello che iperesprime il cDNA dell'enzima PEPCK-C (fosfoenolpiruvato carbossi-chinasi C, necessario alla gluconeogenesi) soltanto nel muscolo scheletrico, perchè nel vettore il cDNA è localizzato a valle del promotore dell'actina del muscolo scheletrico (è sotto il suo controllo tissutale). Questo topo ha una maggiore attività in gabbia e maggiore capacità d'esercizio (corre più a lungo del controllo: fino a 6 Km, ad una velocità di 20m/min, mentre i controlli si fermano dopo 0,2 Km), ha un numero maggiore di mitocondri e maggiore sopravvivenza, dimostrando che l'iperespressione di questo enzima rimodella il metabolismo energetico e contribuisce ad una maggiore longevità (P. Hakimi et al, 2007).

### PEPCK-C in Skeletal Muscle

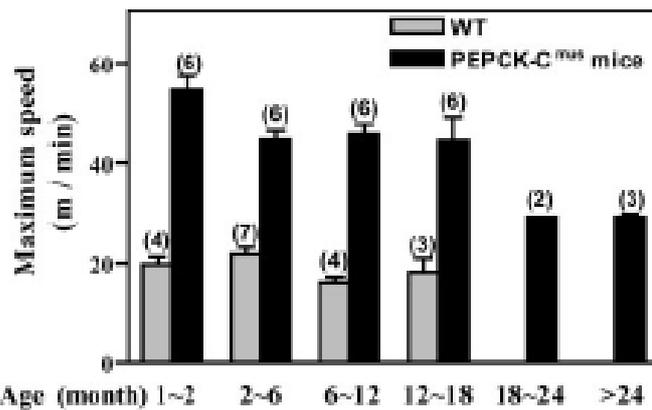
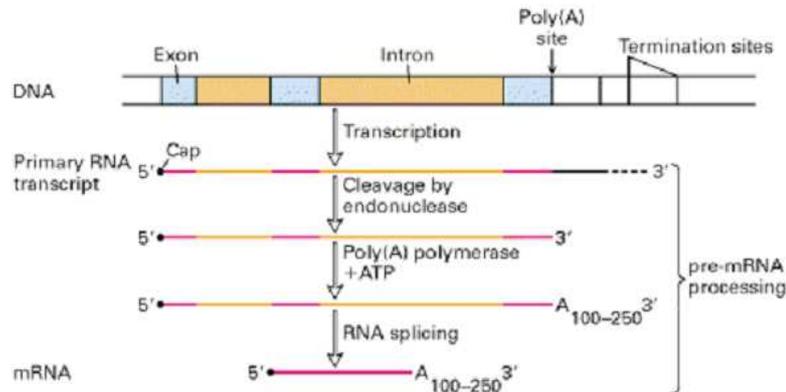


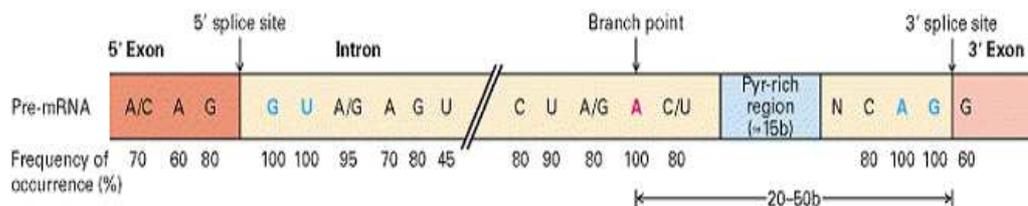
FIGURE 9. Running ability of PEPCK-C<sup>trans</sup> mice with age. Trained PEPCK-C<sup>trans</sup> mice and controls (WT) of varying ages were tested for their ability to run on a treadmill using the third protocol as described in detail under "Experimental Procedures." The mice were acclimated to the treadmill (at a grade of 0°) for 30 min at a speed of 10 m/min, after which time the speed of the treadmill was increased 1 m/min every min, until the mice reached exhaustion. The number of animals tested is indicated in parentheses.

## TRASCRIZIONE E MATURAZIONE DEL TRASCritto NUCLEARE



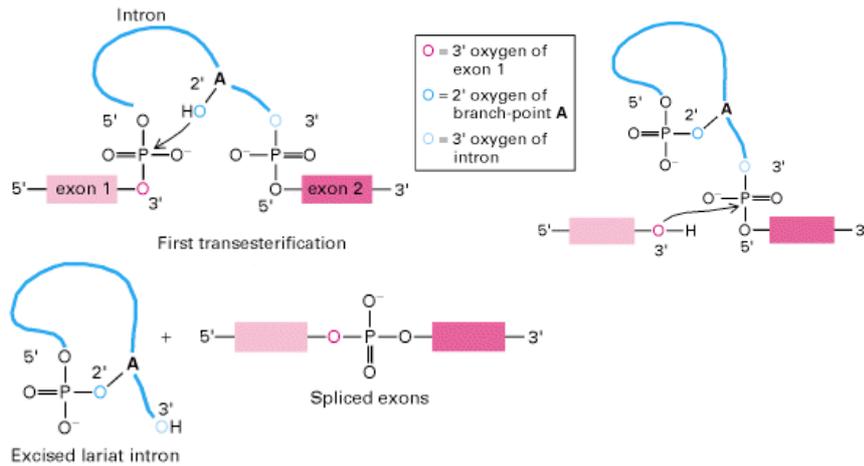
Tutto il gene (la sequenza di DNA) che codifica per una proteina (esoni ed introni compresi) viene trascritto in RNA nucleare eterogeneo (hnRNA) che maturerà in RNA messaggero (mRNA). Il trascritto primario subisce infatti un processo di **maturazione** caratterizzata dall'aggiunta di un **cap** all'estremità 5' terminale (aggiunta di 7-metilguanossina) e dall'aggiunta di una **coda di poliadenilato, poly-A** (100-250 unità di AMP) all'estremità 3' terminale. Complessi ribonucleoproteici tagliano le sequenze introniche, contribuendo all'operazione dello **splicing (taglio delle sequenze introniche e ricucitura delle sequenze esoniche trascritte)**.

Se l'mRNA è processato male, ad esempio per mutazione del **dinucleotide GU** o **AG** (le sequenze **consenso dello splicing**, che si trovano sempre all'inizio e alla fine di ogni sequenza intronica), la sequenza di mRNA risulta differente (non codifica per la proteina corretta, ma per un suo prodotto proteico tronco instabile) e l'mRNA viene degradato.

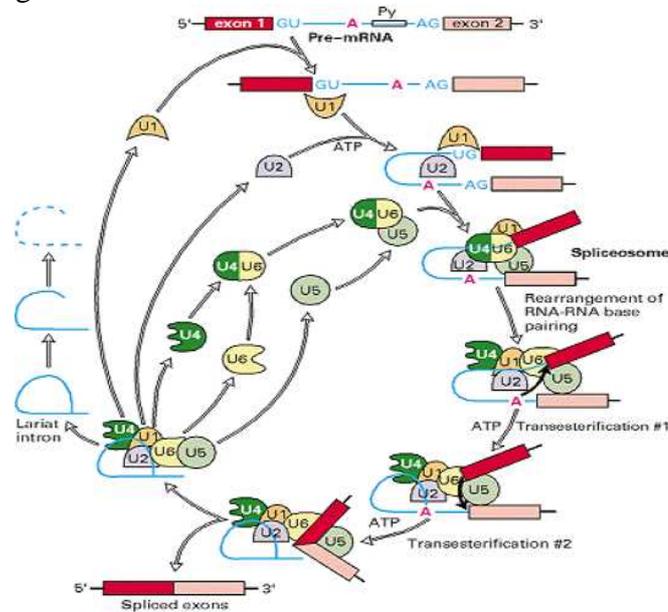


Verso l'estremità 3' dell'introne c'è una regione ricca di pirimidine (Pyr). A monte della regione polipirimidinica c'è un adenilato (A), sito indispensabile per l'inizio della rottura dell'introne, detto **sito di ramificazione (branch point)**.

Lo splicing avviene mediante 2 reazioni di **transesterificazione** (indicate dalle frecce sottostanti), perché si rompono dei legami esterei e se ne formano di nuovi, permettendo l'unione dell'estremità 3' di un esone con quella 5' del successivo. L'introne rimane nel nucleo come un lariat (cappio) e viene degradato.



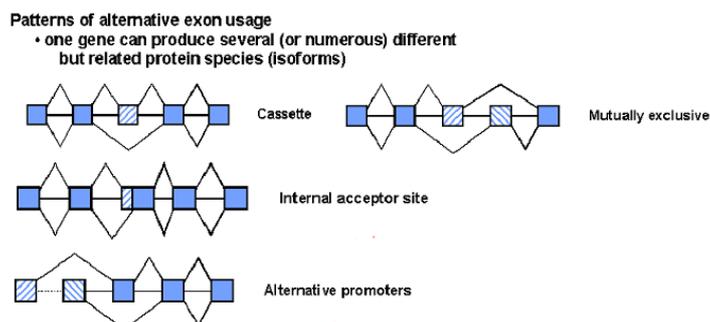
Perchè avvenga lo splicing si deve formare il complesso ribonucleoproteico dello **spliceosoma**. Lo spliceosoma è costituito da piccoli RNA nucleari (**RNA U: U1, U2, U4, U5, U6** che riconoscono il trascritto per complementarità con le sequenze consenso), e da particolari **proteine snurp (snRNP, piccole particelle nucleari ribonucleoproteiche)** che ripiegano l'RNA nella struttura funzionale allo splicing.

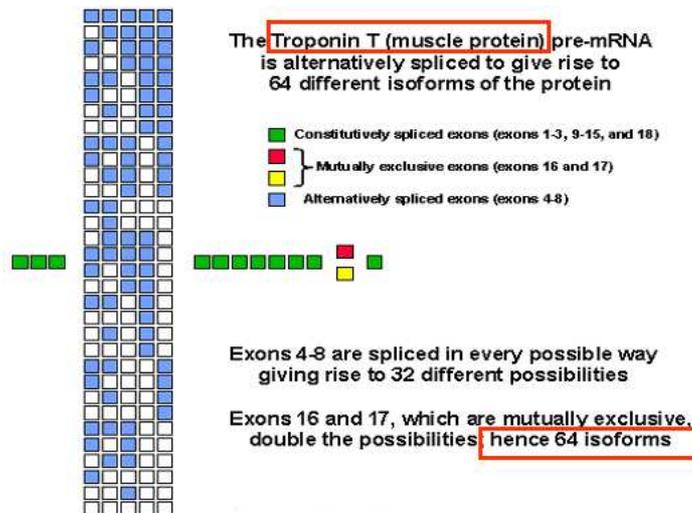


Il processo di splicing richiede energia (ATP) che è necessaria non per i tagli e ricuciture, ma per il rimodellamento dinamico delle proteine e degli RNA.

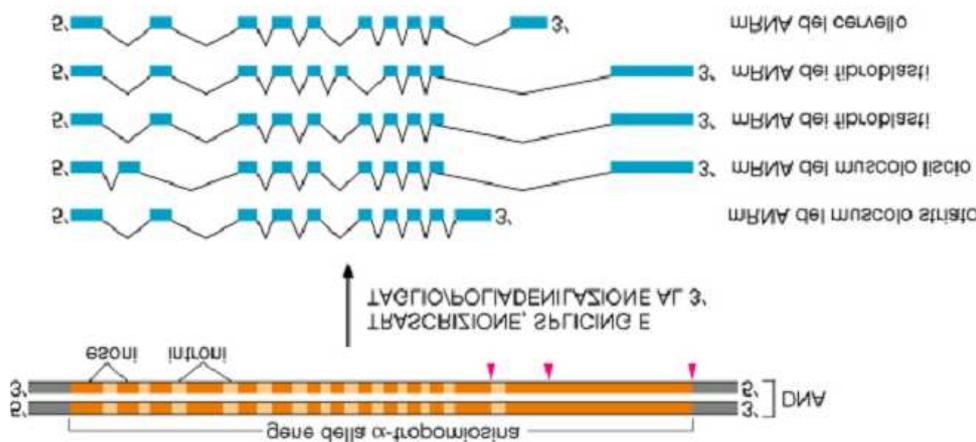
## SPLICING ALTERNATIVO

Si tratta di un processo grazie al quale gli esoni di un gene possono essere uniti in disposizioni differenti. Pertanto, da un solo gene possono essere prodotti più di un RNA e quindi più di una proteina.





Nell'esempio su indicato, il pre-mRNA per la **Troponina T** (una subunità del complesso troponinico) che contiene 18 sequenze esoniche trascritte, può dare origine a 64 diversi mRNA e quindi ad altrettante isoforme proteiche. Le prime tre sequenze esoniche vengono sempre mantenute, le 5 successive vengono ricucite in modo variabile, e la 16a e 17a sono alternative. Un altro esempio è il trascritto del gene che codifica per la  **$\alpha$ -tropomiosina** (proteina fibrosa sita sopra la fibra di actina, che impedisce il legame tra miosina e actina durante la fase di riposo).



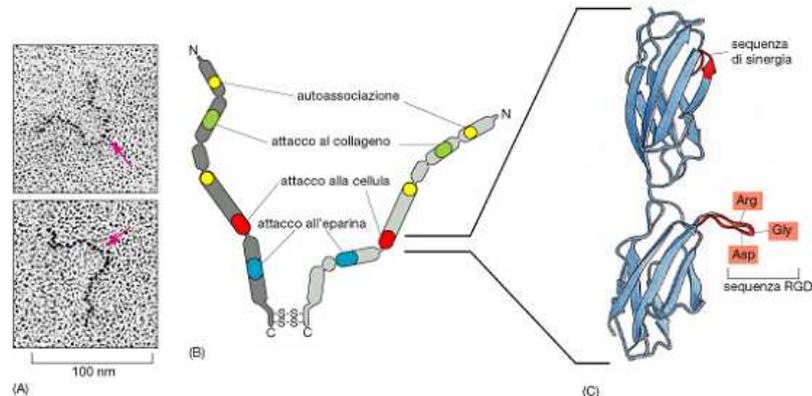
tratti grigi: sequenze non tradotte (untranslated) UTR 3' e UTR 5'  
tratti arancioni: esoni, tratti gialli: introni

Lo splicing alternativo e l'utilizzo di siti alternativi per il termine della trascrizione permettono la produzione di 5 diversi RNA e quindi isoforme proteiche espresse specificamente in diversi tessuti muscolari e non muscolari.

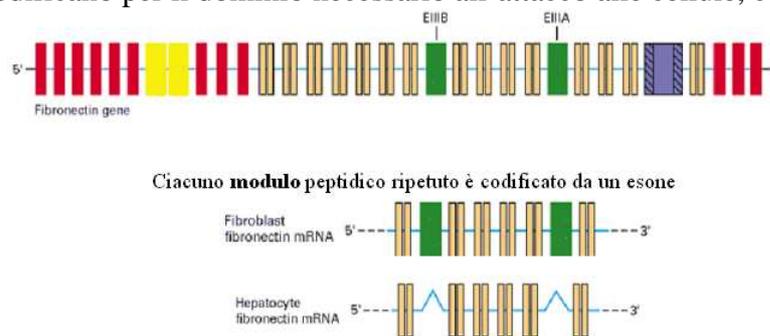
Pertanto, l'espressione tessuto specifica di una proteina, o di sue isoforme, si può realizzare attraverso lo splicing alternativo, come osservato per l'espressione della **fibronectina**. Questa è una importante componente della matrice extracellulare, assieme al collagene e ai proteoglicani, e fondamentale per la migrazione delle cellule durante lo sviluppo embrionale. E' costituita da due catene polipeptidiche simili unite da ponti disolfuro vicino all'estremità C-terminale.



Sono organizzate in **domini** (colori diversi) con cui legarsi: ai recettori sulla superficie delle cellule, ai collagene, alla fibrina, ai proteoglicani (colla molecolare). I domini contengono moduli di sequenze aa.



Per svolgere la funzione di ancoraggio, la proteina presenta vari domini organizzati in regioni specifiche per il legame con collagene, autoassociazione, fibrina, proteoglicani e recettori delle membrane cellulari (integrine). E' codificata da unico gene il cui trascritto ha un processamento diverso a seconda che avvenga nell'epatocita (fegato) o nel fibroblasto, dando origine a **due proteine diverse**, una tipica della **matrice**, una tipica del **plasma**. Le due **sequenze esoniche EIIIB e EIIIA**, che codificano per il dominio necessario all'attacco alle cellule, contenente un'ansa con

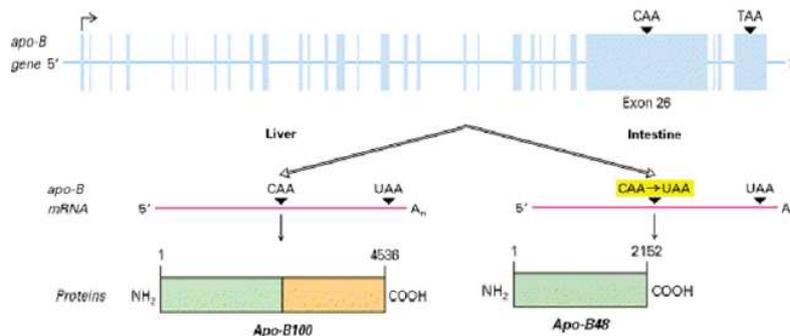


**Arg-gly-asp-ser** sequenza del modulo che media il legame con le cellule; la mancanza di EIIIA e EIIIB rende **la fibronectina secreta dal fegato meno adesiva!**

la sequenza arginina, glicina e aspartato (arg, gly, asp, RGD), sono sottoposte a splicing alternativo: nel fegato vengono perse nel processamento del trascritto. Pertanto, la fibronectina epatica manca di questi RGD, risultando meno adesiva ed è libera di circolare nel plasma.

## EDITING, LA MODIFICA POST-TRASCRIZIONALE DELLE BASI

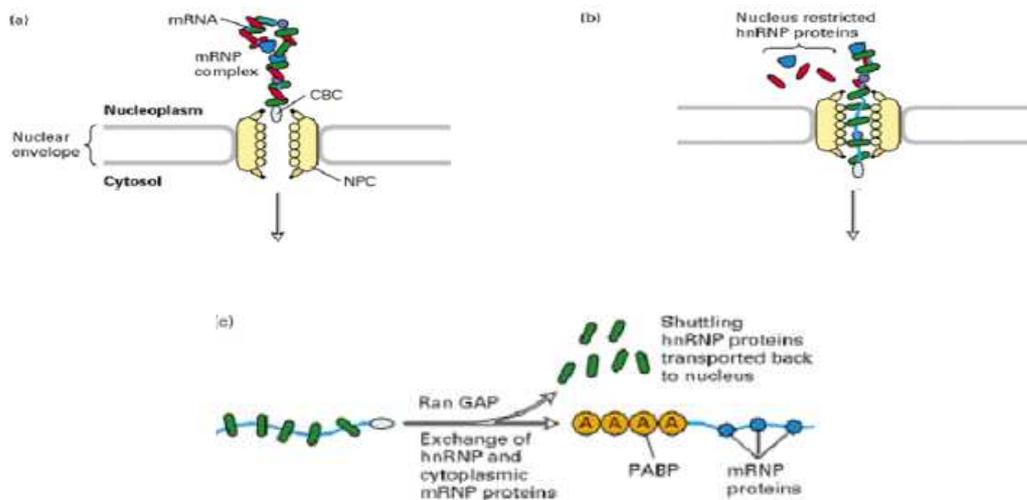
Il trascritto nucleare può andare incontro anche a **editing dell'RNA**, in cui una base del messaggero viene modificata da enzimi nucleari. E' il caso del messaggero per l'**ApoB**, che codifica per una apolipoproteina. Le apolipoproteine formano l'involucro proteico che trasporta i lipidi nelle lipoproteine plasmatiche; quanto maggiore è la componente lipidica, tanto minore è la densità delle lipoproteine. La proteina espressa dal gene *apoB* è espressa in due tessuti diversi, fegato e intestino tenue.



Il gene contiene 29 esoni. Nell'esone 26 c'è una particolare CAA. Nel nucleo delle cellule del fegato il trascritto conserva la sequenza CAA: la traduzione citoplasmatica di questo mRNA produce la proteina **B100** di 4536 aa, presente nelle lipoproteine VLDL, LDL, IDL; nel nucleo delle cellule intestinali, la C di CAA del mRNA viene trasformata da enzimi demetilanti in U. Ne risulta che il codone senso CAA diventa un codone nonsense UAA di arresto della traduzione. Si produce così una proteina più piccola, **ApoB48** di 2152 aa, che è necessaria per l'assorbimento dei lipidi della dieta e il loro trasporto nei chilomicroni.

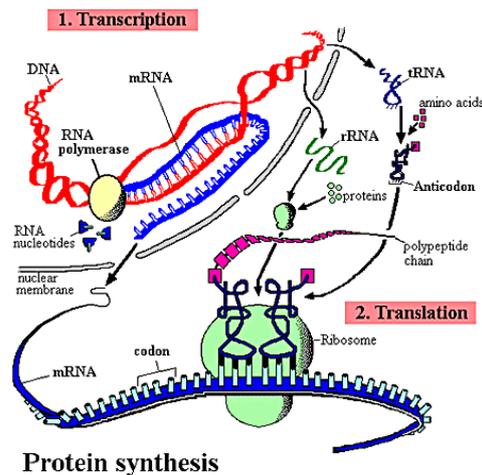
### IL TRASPORTO NUCLEARE

La membrana nucleare presenta dei pori per il passaggio di molecole in entrata ed uscita estremamente controllato.



L'uscita del trascritto di mRNA è legata alla sua associazione a numerose proteine. Alcune di queste accompagnano il trascritto fino al poro (tipo CBP, Cap Binding Protein) e rimangono nel nucleo, altre lo portano nel citosol (tipo PolyA binding protein, PABP) ed altre ritornano nel nucleo. Pertanto, l'esporto nucleare attraverso i pori è un ulteriore sito di controllo dell'espressione genica negli eucarioti.

## LA TRADUZIONE o BIOSINTESI PROTEICA

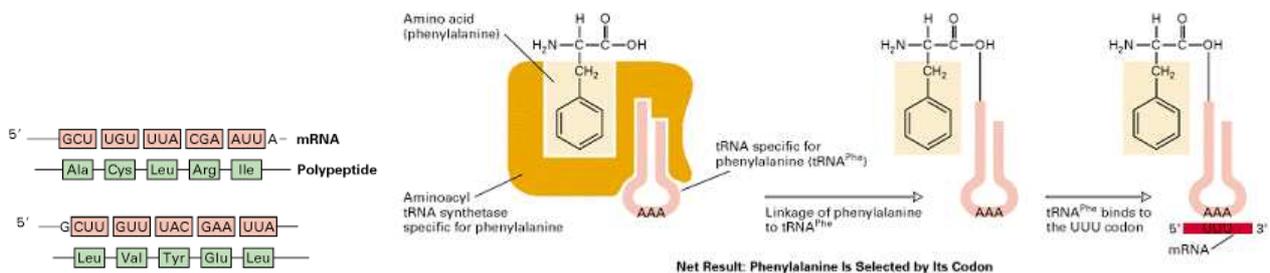


Protein synthesis

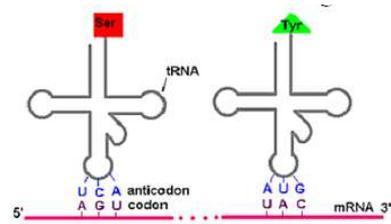
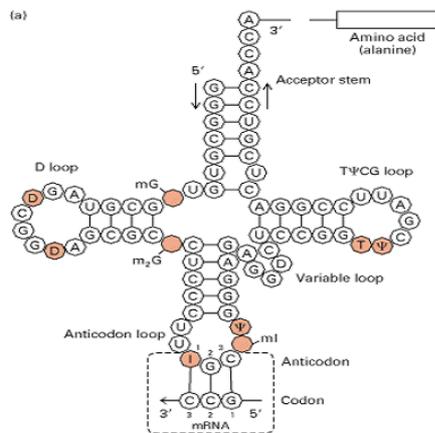
### L'RNA messaggero

La sintesi delle proteine mediante la traduzione degli mRNA è un processo citoplasmatico. Le sequenze nucleotidiche di un RNA messaggero (mRNA) nella sua parte codificante sono lette come triplette di basi: le triplette che costituiscono il codice genetico. La sequenza codificante è caratterizzata da una “**open reading frame**”, “cornice aperta di lettura”, cioè una serie di triplette di basi con senso perchè codificanti per aa. Se si sfasa la cornice, si cambia la lettura. Nelle fasi non corrette, si incontrano molte triplette nonsense, non c'è una cornice aperta di lettura!

La traduzione del linguaggio dei nucleotidi in quello degli amminoacidi richiede la presenza di enzimi, le **amminoacil tRNA sintetasi** (spazio giallo), che caricano selettivamente gli RNA transfer (**tRNA**) con l'amminoacido giusto.



Il tRNA ha un sito di legame per l'mRNA (anticodone) e, alla sua estremità 3' terminale, un sito di legame per l'amminoacido. L'amminoacido è legato all'RNA mediante il C del gruppo carbossilico, lasciando libero il gruppo amminico. Le proteine infatti iniziano con l'estremità amminica libera, e terminano con l'estremità carbossilica libera. Il tRNA contiene basi insolite: **diidrouridina (D)**; **pseudouridina (ψ)**; **basi mutilate (mG)**, **inosina (I)**. Quest'ultima, che si forma nel metabolismo delle basi puriniche, contribuisce alla degenerazione del codice (un amminoacido codificato da più di un codone) trovandosi come prima base dell'anticodone e potendosi appaiare con più di una base.

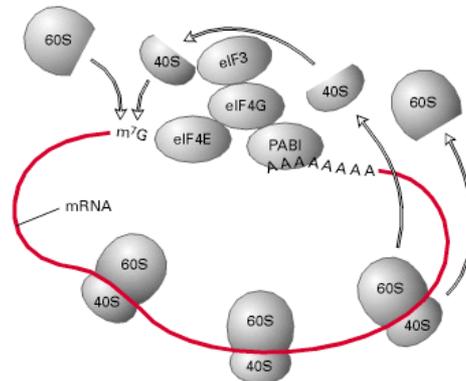
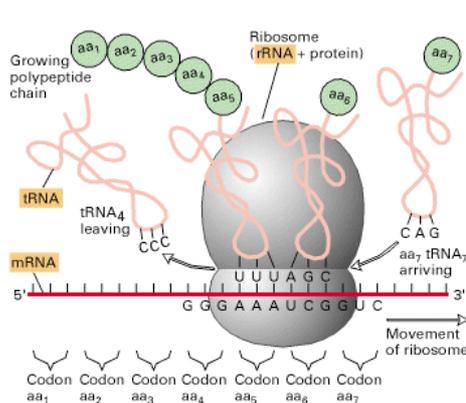


		2nd base in codon					
		U	C	A	G		
1st base in codon	U	Phe Leu	Ser Ser	Tyr STOP	Cys STOP	U C A G	3rd base in codon
	C	Leu Leu Leu	Pro Pro Pro	His Gln Gln	Arg Arg Arg	U C A G	
	A	Ile Ile Met	Thr Thr Thr	Asn Lys Lys	Ser Arg Arg	U C A G	
G	Val Val Val	Ala Ala Ala	Asp Glu Glu	Gly Gly Gly	U C A G		

Il **codice genetico** è ridondante e universale: 64 triplette diverse, 61 codificano per un amminoacido, 3 sono triplette di stop. **AUG** che codifica per metionina è il codone di inizio della traduzione. Viene perso quando le proteine subiscono modifiche postraduzionali proteolitiche, come accade alle proteine di secrezione e di membrana. **UAA, UAG, UGA** sono i codoni di stop. Alcune triplette codificano per uno stesso amminoacido. Più triplette possono codificare lo stesso amminoacido (es. leucina).

## I RIBOSOMI

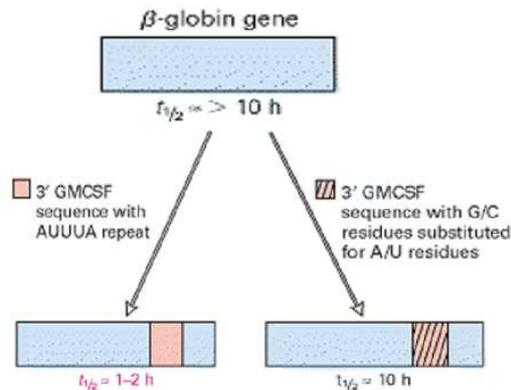
Il **ribosoma** è un complesso ribonucleo proteico composto da due subunità, caratterizzate dalla presenza di rRNA e numerose proteine. La **subunità minore**, formata dall'rRNA 18S e da 30-40 proteine, contiene il sito dove scorre il messaggero. La **subunità maggiore**, formata dall'rRNA 28S, 5S, 5,8S e da 40-50 proteine, permette di costruire il sito A destinato ad accogliere l'amminoacil tRNA, e il sito P per il peptidil tRNA.



Per formare il complesso di inizio, assemblare il ribosoma, iniziare, allungare e terminare la traduzione occorrono numerose proteine dette **fattori traduzionali**. Ci sono **fattori di inizio eIF** (eukaryotic initiation factors), di **allungamento e di termine**. Nel citoplasma il riciclo dei ribosomi e poliribosomi (più di un ribosoma per messaggero) è facilitato dalla circularizzazione dell'mRNA mediata dai fattori di inizio: si può ricominciare più velocemente la traduzione e sintetizzare più proteine. Inizio, allungamento e termine richiedono l'idrolisi del GTP per funzionare. La sintesi proteica costa molta energia: circa due GTP per ogni legame peptidico, a cui bisogna aggiungere il costo della produzione dell'RNA, catena polinucleotidica costruita a partire da nucleotidi trifosfati!

## IL CONTROLLO TRADUZIONALE

L'efficienza della traduzione dipende dai livelli dell'mRNA, dei ribosomi, dei fattori traduzionali e dell'ATP che ricarica il GDP a GTP. La concentrazione di un messaggero dipende dalla sua **stabilità**. Quanto maggiore è la stabilità dell'mRNA, rappresentata dal suo tempo di dimezzamento, tanto maggiore è la sua attività traduzionale. In genere, la stabilità dipende soprattutto da sequenze presenti nella regione 3' dell'mRNA.



Ad esempio, se nel gene per una  $\beta$ -globina inseriamo in 3' la sequenza AUUUA, presente nell'mRNA per il fattore GMCSF (granulocyte/macrophage colony stimulatory factor), si riduce la stabilità del messaggero globinico ad un tempo di dimezzamento di circa 1-2 h invece di più di 10 h, il valore originario. Sono queste sequenze responsabili dell'instabilità perchè se mutiamo le sue A/U con G/C, viene ripristinata la stabilità del messaggero originaria.

## CONTROLLO TRADUZIONALE OPERATO DA IONI FERRO

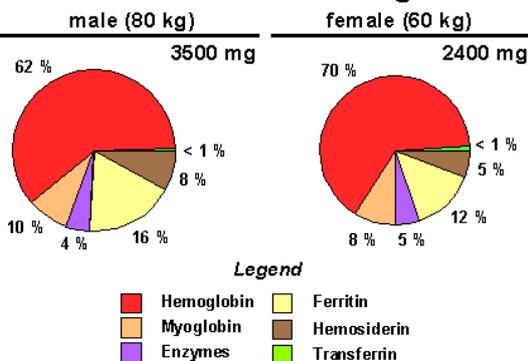
**Funzioni del ferro e proteine che lo legano.** Numerose sono le funzioni cellulari del ferro, quali ad esempio:

- reazioni di **ossido-riduzione nel metabolismo energetico**: è presente in molti enzimi del sistema che produce ATP;
- componente strutturale e funzionale dell'Hb e mioglobina: è necessario per il **trasporto dell'ossigeno**.

Lo ione ferro nell'organismo si trova principalmente nell'Hb, ma anche nella mioglobina, ferritina, emosiderina, in enzimi e nella transferrina.

Nei maschi il Fe totale è circa 3500 mg, nelle femmine 2400 mg.

### Distribution of Iron in an Average Human



### Causes of Iron Deficiency

#### Infants

premature birth  
twins and more  
maternal deficiency  
fetal blood loss

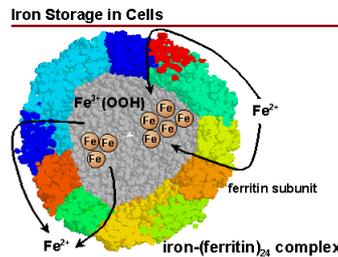
#### Adults

abnormal blood loss  
(rarely a depletion of an initially normal store of iron)

gastric or duodenal ulcers  
gastric or colon carcinoma  
gastritis caused by NSAID's  
anti-coagulant therapy  
excessive menstrual bleeding  
strenuous exercise

**La carenza di ferro nell'adulto può anche essere causata da esercizio muscolare protratto.**

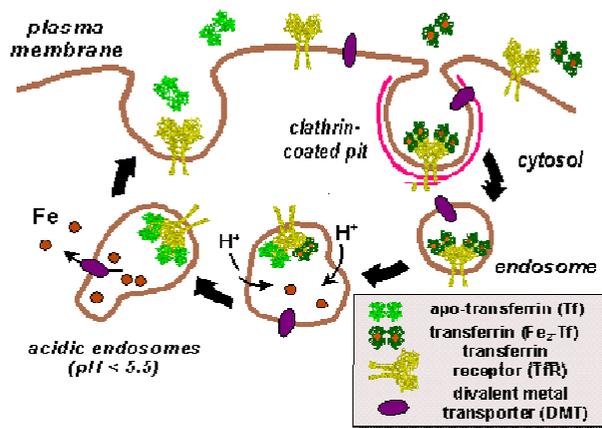
L'accumulo del  $\text{Fe}^{3+}$  nella **ferritina** del fegato e del midollo osseo è dovuto alle sue subunità leggere (L) e pesanti (H) che ne permettono l'accumulo fino a 4500 atomi in complessive 24 subunità.



Il  $\text{Fe}^{3+}$  è anche presente nella **emosiderina** dei tessuti.

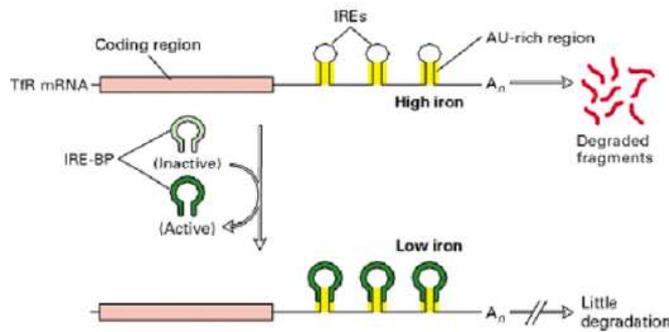
Il ferro viene **assunto a livello intestinale**. Il ferro in circolo è sottoforma di ione ferroso  $\text{Fe}^{2+}$ , mentre quello contenuto nella ferritina è ferrico  $\text{Fe}^{3+}$ . Il ferro non circola libero (sarebbe tossico), ma legato alla **transferrina (Tf)**.

Circola legato alla transferrina ed entra per endocitosi mediata da un recettore

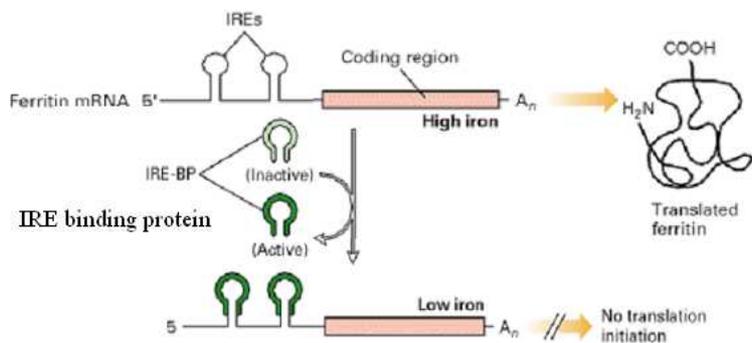


Il ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) si lega all'**apotransferrina (apo-Tf)** e diventa **ferro-transferrina**. Questa si lega al **recettore della transferrina (TfR)** di membrana. La membrana con i recettori legati al ligando si affossa e forma un endosoma (un vacuolo). L'**endosoma** viene riempito di protoni acidificando l'interno fino a pH 5.5. A causa dell'acidità il ferro si stacca dalle proteine a cui è legato e, grazie al suo trasportatore di ioni bivalenti DMT, entra nel citoplasma per essere utilizzato o depositato.

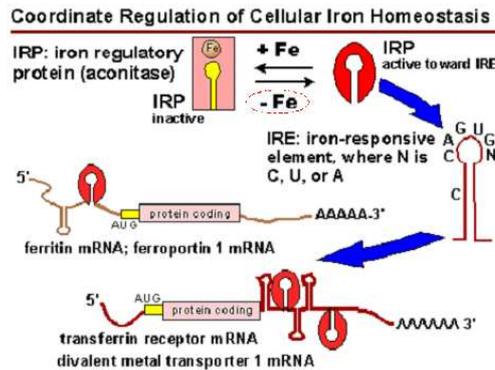
**Regioni di controllo della traduzione e ferro** Nelle regioni 5' e 3' degli mRNA possono esistere sequenze in grado di interagire con proteine sensibili al ferro. Queste sequenze o elementi ricche in A/U/G sono note come IRE (Iron Responsive Elements) e legano le IRP (iron regulatory protein), dette anche IRE-BP (IRE binding proteins). Il legame avviene quando le proteine sono prive di ferro, ovvero quando nella cellula il ferro è carente. Pertanto, quando il ferro è presente, le IRE-BP sono inattive e non si legano all'RNA. Consideriamo ad esempio, le IRE presenti nella regione 3' del messaggero per il recettore della transferrina (TfR). In assenza di IRE-BP che lo proteggano, il messaggero per il TfR subisce degradazione. E' infatti uno spreco per la cellula esprimere questa proteina se la cellula possiede già al suo interno il ferro.



Quando nella cellula c'è il ferro, questo deve essere opportunamente accumulato. Pertanto il messaggero della ferritina deve essere tradotto. Questo è possibile perchè le sequenze IRE, che si trovano nella regione 5' del suo messaggero, sono libere lasciando i ribosomi in grado di formare i complessi di inizio e tradurre l'mRNA. Viceversa, quando manca il ferro, le sequenze IRE sono legate dalle IRE-BP ed i ribosomi non sono in grado di iniziare la traduzione.



Pertanto, il controllo della traduzione dei messaggeri per proteine che legano il ferro è controllato in maniera coordinata come di seguito riassunto (regolazione dell'omeostasi intracellulare del ferro nell'intestino):

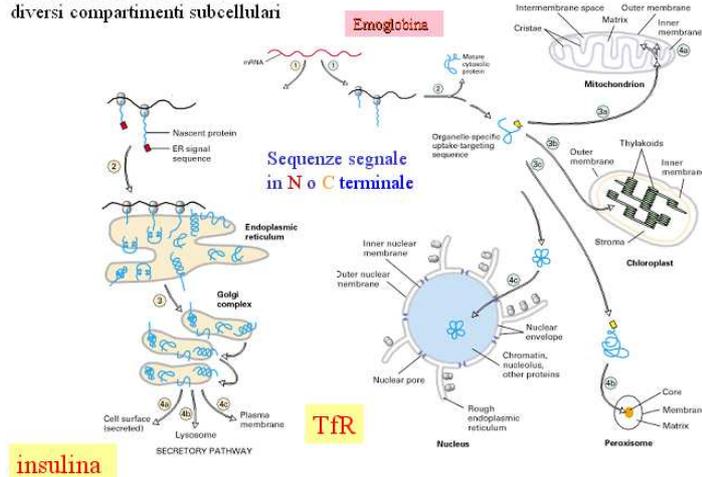


con ferro basso, non c'è traduzione per ferritina, c'è traduzione per TfR; con alto ferro, c'è traduzione per la ferritina, non c'è traduzione per TfR.

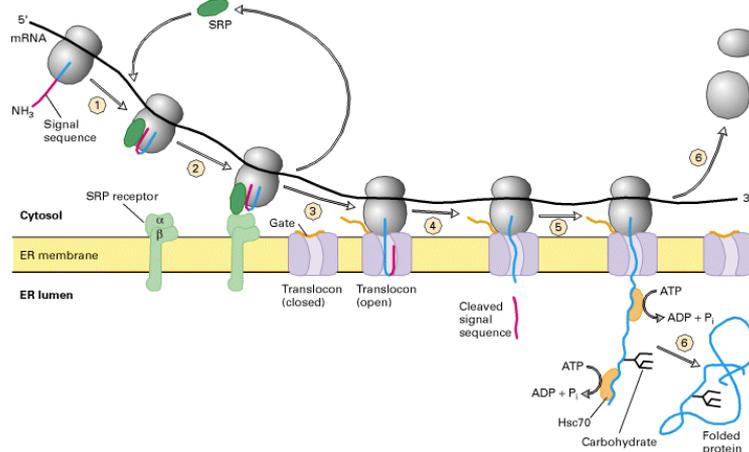
## TRADUZIONE DI PROTEINE DI MEMBRANA O DI SECREZIONE

La traduzione avviene nel citoplasma, ma molte proteine non sono citoplasmatiche e devono raggiungere distretti cellulari diversi, od essere secrete.

Proteine del citoplasma o di diversi compartimenti subcellulari



Occorrono delle sequenze-segnale nell'estremità carbossilica o in quella amminica perchè la proteina sia veicolata correttamente. Ad esempio, nella proinsulina umana ci sono una decina di aminoacidi nella parte N-terminale (peptide-leader, peptide segnale) che fungono da segnale perchè la proteina, in corso di sintesi, sia veicolata dal citoplasma al reticolo endoplasmatico e poi tagliata da una peptidasi del segnale.



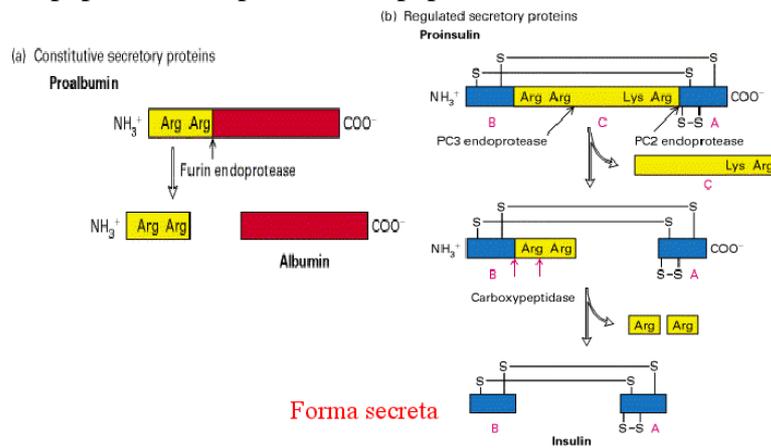
Per il riconoscimento del peptide segnale è richiesta una ribonucleoproteina, la **SRP** (particella di riconoscimento del segnale) che ricorda una piccola particella ribosomiale. Appena la proteina inizia ad essere sintetizzata, il peptide che esce dal ribosoma è la porzione amino-terminale con il peptide-segnale che viene riconosciuto dalla SRP. SRP legata al peptide conduce tutto l'apparato traduzionale con i ribosomi sul recettore per SRP che è localizzato sulla membrana del reticolo endoplasmatico (ER). SRP e il suo recettore sono **proteine G**, cioè utilizzano l'energia dell'idrolisi del GTP per funzionare. In questo modo la proteina di neosintesi cresce all'interno del RE rugoso, grazie a canali di trasferimento (transloconi) nella membrana dell'ER che ne favoriscono il passaggio dal citosol.

Nell'ER e nell'apparato di Golgi la proteina viene quindi assemblata, conformata e subisce una serie di modifiche.

## MODIFICHE PROTEOLITICHE DELLE PROTEINE

Molte proteine subiscono modifiche postraduzionali come, ad esempio, la formazione dei ponti disolfuro, la glicosilazione, la fosforilazione, la metilazione, etc, e modifiche proteolitiche, quale ad esempio, la perdita dei peptidi segnale che trasforma le **pre-pro-proteine** in pro-proteine nell'ER. Nel Golgi avvengono ulteriori modifiche (vedi nell'esempio già riportato a sinistra, la trasformazione della **pro-albumina** ad albumina). Anche la **pro-insulina**, che deriva dalla pre-pro-

insulina per perdita del peptide leader nell'ER, nei granuli di accumulo diventa insulina, la forma secreta, per perdita del peptide C ad opera di endopeptidasi.

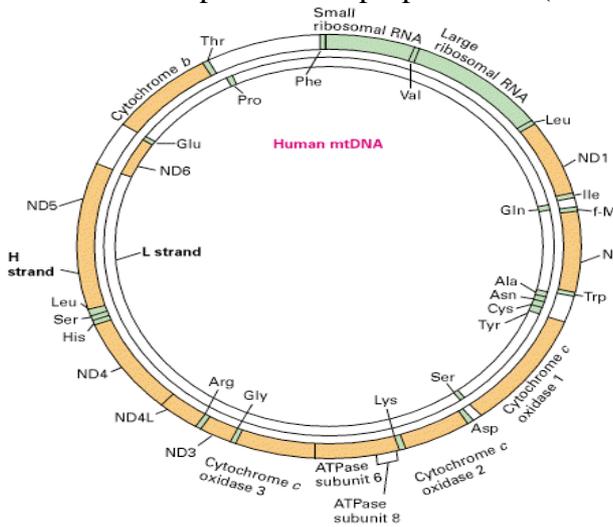


Molti enzimi sono prodotti come forme inattive (vedi i proenzimi della digestione): essi vengono attivati successivamente nel loro ambiente specifico mediante modifiche proteolitiche (es. il tripsinogeno che diventa tripsina nel duodeno).

## IL MITOCONDRIO

### DNA ED ESPRESSIONE GENICA MITOCONDRIALE

Il mitocondrio possiede un proprio DNA (**mtDNA**) che è evoluto dai batteri. La sua dimensione è di 16569 paia di basi. I due filamenti si distinguono in **pesante H** (perchè ha molte G, è ricco di geni senza introni, e ha poco DNA non codificante) ed in **leggero L** (ha molte C ed è povero di geni). Il mtDNA contiene la sua origine di replicazione e



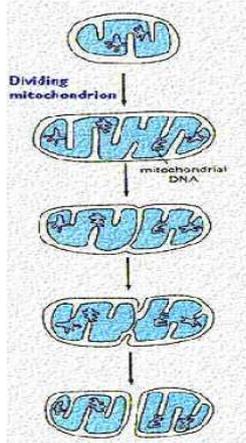
- Geni per RNA ribosomiali e tRNA
- Geni per alcune proteine del trasporto degli elettroni e per la sintesi di ATP

Il genoma mitocondriale codifica solo per 13 delle oltre 900 proteine mitocondriali. In particolare, codifica per **7 subunità della NADH Deidrogenasi del Complesso I** (CI, formato da 49 subunità); per nessuna subunità del CII

(formato da 4 subunità); per il **citocromo B** (Cyt B) del CIII (formato da 11 subunità); per la **Citocromo C Ossidase I, II, III** del CIV (formato da 13 subunità); e per la **subunità 6 e 8 della ATPase** del CV (formato da 16 subunità).

Il codice genetico è diverso da quello del DNA nucleare. Alcuni amminoacidi sono codificati da triplette diverse da quello umano e UGA non codifica per stop, ma per triptofano, trp, W.

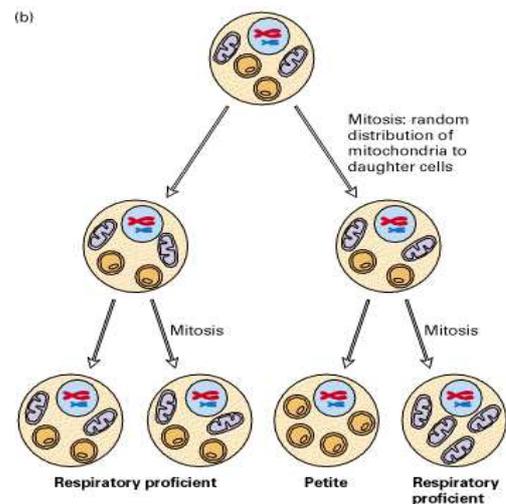
**Divisione ed eredità del mtDNA** Ogni cellula può possedere centinaia di mitocondri, ciascuno con fino ad una decina di molecole di DNA. Questo deriva dal fatto che il mitocondrio prolifera dividendosi per scissione, indipendentemente dalla divisione cellulare.



La replicazione del DNA non è limitata alla fase S, ma avviene **in tutto il ciclo cellulare**

Un aumento (5-10x) di mitocondri si ha quando un muscolo scheletrico a riposo viene stimolato ripetutamente.

**I mitocondri sono ereditati per via materna**



Nello zigote i mitocondri sono quelli derivati dall'ovulo, pertanto i mitocondri sono di **origine materna**, e le mutazioni del mtDNA sono a **trasmissione materna**.

La distribuzione delle molecole di DNA nelle cellule figlie è casuale (**eredità non mendeliana**). Ne risulta che molecole di mtDNA normale si separano casualmente da quelle mutate come nei lieviti. Le cellule che contengono una miscela di mtDNA normale e mutato si definiscono **eteroplasmiche**. Dall'esempio dello schema a destra si evince che, in cellule di lievito eteroplasmiche per mutazioni che alterano la respirazione (mitocondri tondi senza criste), la separazione dei mitocondri origina

cellule che respirano normalmente, altre che respirano meno, ed altre che non respirano per la presenza dei soli mitocondri mutati.

Pertanto, la gravità delle malattie causate da mutazioni del mtDNA dipende non solo dalla **natura delle mutazioni**, ma anche dalla **proporzione del DNA mutato rispetto a quello normale**. Nei soggetti con eteroplasmia, prima che compaiano disfunzioni e sintomi clinici, è necessario che il rapporto tra DNA mitocondriale mutato e il normale superi un valore soglia, che è tanto più basso quanto più il tessuto o l'organo ha elevato fabbisogno energetico. Infatti, le patologie legate a variazioni del mtDNA colpiscono soprattutto il sistema nervoso, cuore, muscoli, cioè quei tessuti che richiedono maggiore ATP.

In conclusione, tutte le cellule hanno mitocondri, ma le mutazioni del mtDNA colpiscono solo alcuni tessuti. Inoltre, le malattie legate ai mitocondri (quali, ad esempio, miopatie, anemia, diabete, contrazioni muscolari improvvise incontrollate-epilessia mioclonica), sono a comparsa tardiva e progrediscono con l'età.

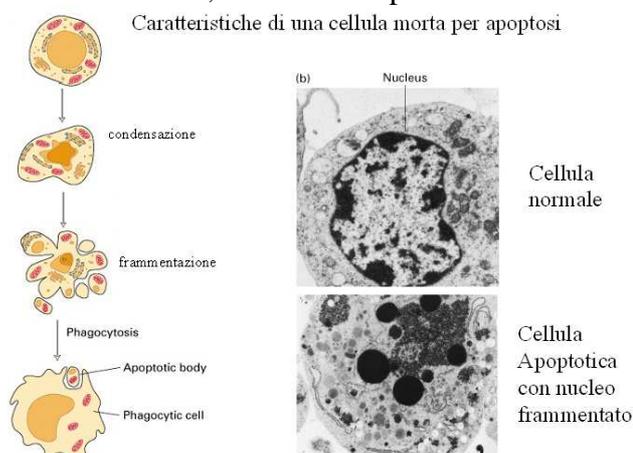
**Esempi di malattie da mutazioni del DNA mitocondriale** La neuropatia ottica ereditaria di Leber's, LHON, (una degenerazione del nervo ottico accompagnata da cecità progressiva), è causata da **mutazioni del gene** per la subunità 4 della **NADH-CoQ reductase**.

La MERRF, epilessia mioclonica a fibre muscolari "ragged" sfilacciate, associata a movimenti a scatti, perdita di cellule muscolari -miopatia-, con grandi aggregati di mitocondri anormali nelle cellule muscolari, è causata prevalentemente da **mutazioni del tRNA per la lisina**. Una mutazione è **MTTK A8344G** (MT: mitocondrio; T: tRNA; K: lisina A e G: adenina e guanina).

La sindrome di Kaerns-Sayre, KSS (degenerazione sistema nervoso: battito cardiaco anormale, oftalmoplegia progressiva, degenerazione del sistema nervoso centrale) è causata da **larghe delezioni** (~ 6 Kb) nel mtDNA. Quando il mtDNA si replica, si replica più rapidamente il DNA più piccolo (mutato) di quello normale. Ne deriva che col tempo aumenta il numero dei mtDNA mutati rispetto al numero dei DNA normali.

**Fosforilazione ossidativa e ROS** Bisogna ricordare che nel mitocondrio la fosforilazione ossidativa non produce soltanto l'energia dell'ATP, ma genera anche ROS (radicali liberi dell'O<sub>2</sub>, sottoprodotti del suo metabolismo come ione superossido, acqua ossigenata, ossigeno nativo, etc.). Inoltre, il mitocondrio partecipa alla regolazione dell'apoptosi, la morte programmata delle cellule. Pertanto, le **malattie degenerative e l'invecchiamento** possono derivare dalla **perdita della capacità energetica mitocondriale, da un aumento dei ROS e dell'attività apoptotica**.

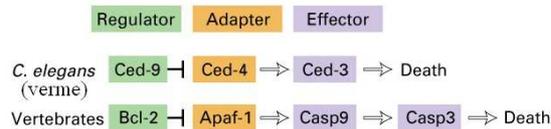
L'**apoptosi** è un processo fisiologico (significa distacco) caratterizzato da una sequenza ben definita di modifiche morfologiche. Le cellule diventano più piccole, si suddividono in frammenti, corpi apoptotici, uniti a membrane, e fagocitati da altre cellule. Le componenti intracellulari non vengono rilasciate nell'ambiente extracellulare, senza danno per le altre cellule.



Inizialmente, le cellule diventano più piccole (condensazione), quindi si frammentano ed i frammenti apoptotici, richiusi da membrane, vengono catturati da fagociti.

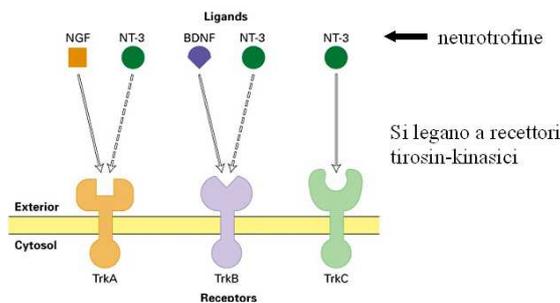
L'apoptosi è alla base dello sviluppo degli organismi pluricellulari: ad esempio, porta alla eliminazione di intere strutture (coda di anfibio), scolpisce tessuti specifici (perdita del tessuto interdigitale), regola il numero dei neuroni nel sistema nervoso. L'apoptosi serve per mantenere il bilancio nella produzione cellulare: un surplus di produzione porterebbe a trasformazioni neoplastiche. Un allenamento svolto male può provocare apoptosi di cellule (stato infiammatorio).

L'apoptosi viene attuata da **caspasi** (Casp1-9, proteasi che idrolizzano il legame peptidico in C-ter di un aspartato). Sono proteine conservate dagli invertebrati all'uomo, come effettori della morte cellulare:

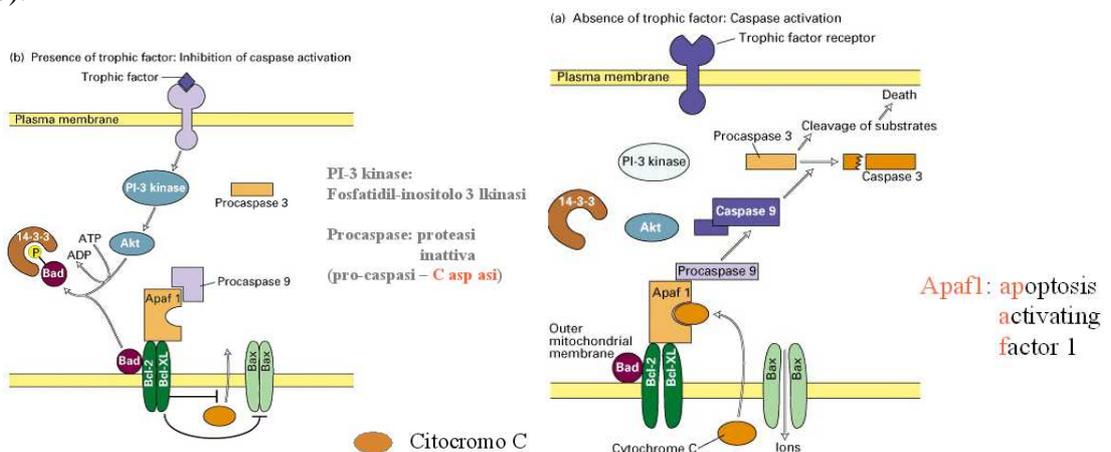


Le caspasi sono controllate dalle proteine regolatrici, anti-apoptotiche, come la proteina **Bcl-2** (è una proteina transmembrana localizzata nella membrana mitocondriale esterna, ma anche nucleare e del reticolo endoplasmatico); essa blocca l'adattatore **Apaf-1** (fattore di attivazione apoptotica). La famiglia a cui appartiene Bcl-2 include proteine con due attività: pro-apoptotica (Bax, Bad) ed anti-apoptotica (Bcl-x1 e Bcl-2).

Tutte le cellule hanno bisogno di **fattori trofici** per impedire l'apoptosi e quindi sopravvivere: ad es. le **neurotrofine**. Per funzionare queste molecole si devono legare a recettori specifici sulla membrana plasmatica.



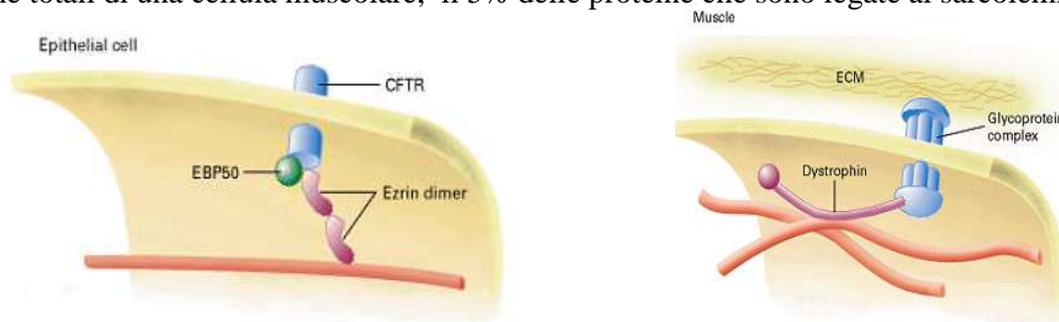
Questi recettori hanno un sito di legame extracellulare per le trofine (ad es. la neurotrofina NGF, nerve growth factor), e un sito intracellulare con attività enzimatica **tirosino-kinasica**. Una o più tirosine del recettore vengono fosforilate quando il recettore ha legato la neurotrofina, ed esse attivano altre proteine della sopravvivenza cellulare). Queste proteine influenzano la distribuzione subcellulare del **citocromo C**, cit C (proteina coinvolta nel trasporto degli elettroni), che è normalmente presente sulla membrana mitocondriale interna. Se il cit C passa nel citoplasma, attiva le caspasi. Bcl-2 fa in modo che il cit C rimanga dentro al mitocondrio (quindi ha un ruolo anti-apoptotico).



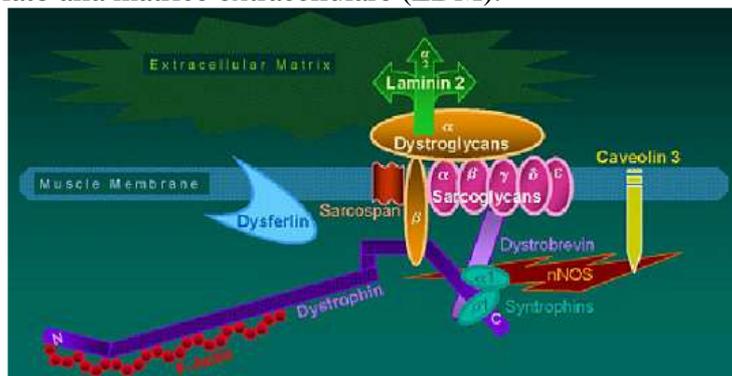
Se c'è il fattore trofico (nutritivo), le caspasi sono inattive (non c'è apoptosi); se non c'è il fattore trofico, le caspasi sono attivate (quindi c'è apoptosi).

## GENI PER IL FUNZIONAMENTO DEL MUSCOLO E LA DISTROFINA

Sono più di 19000 i geni richiesti per la formazione ed il funzionamento del muscolo. Questi includono geni per proteine che regolano il processo contrattile, geni per enzimi che degradano il glicogeno o acidi grassi per generare energia, e geni per proteine che mantengono l'integrità strutturale e le proprietà delle cellule muscolari. Di questi ultimi, uno tra i più noti è il **gene DMD**, nel locus del cromosoma Xp21. E' uno dei geni più grandi (2,4 megabasi, 2400 kb) formato da 79 esoni, trascritto in un mRNA di 14 kb, e codificante per una proteina di oltre 3500 amminoacidi, la **distrofina**. Questa è una proteina bastoncellare sarcoplasmatica subsarcolemmale (0.002% delle proteine totali di una cellula muscolare, il 5% delle proteine che sono legate al sarcolemma).



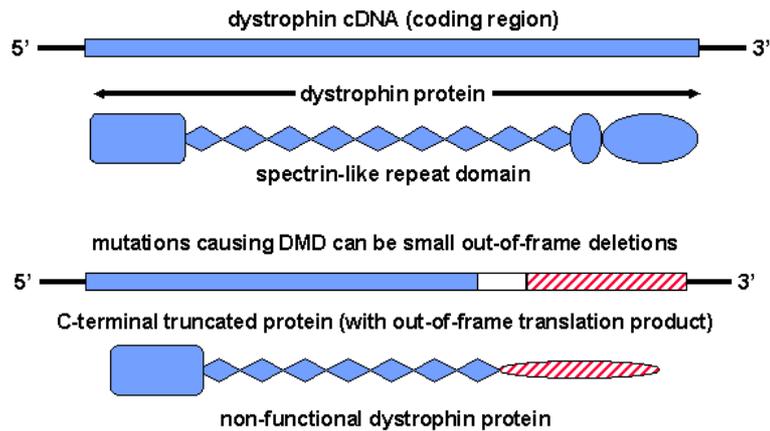
La distrofina ha **funzione di connessione fra la membrana ed il citoscheletro** della cellula (rappresentato dai filamenti di actina, rossi). La distrofina (viola) è ancorata alla membrana sarcoplasmatica mediante un complesso glicoproteico ( $\beta$ -dystroglicano, sarcoglicano, sintrofina, distrobrevina) agganciato alla matrice extracellulare (EDM).



Presenta 4 domini: I, N-terminale (336 aa), con siti d'attacco al citoscheletro; II (2704 aa), con 24 unità ripetute, a bacchetta, che mantengono distesa la proteina; III (325 aa), ricco di cisteine che lega almeno una proteina del sarcolemma; IV (320 aa), C-terminale, con siti per sintrofina e distrobrevina (funzione di ancoraggio) e con la NO sintasi (sintasi del monossido di azoto, nNOS, funzione di regolazione).

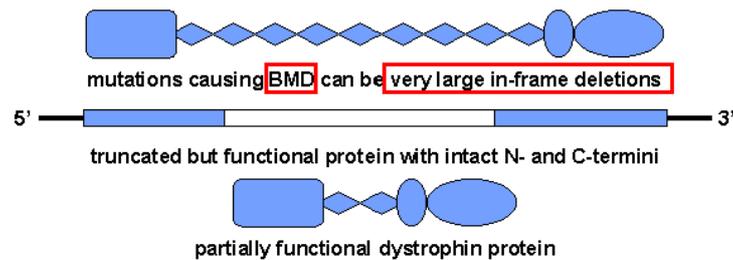
Il **gene DMD** è grande e complesso: ha 8 diversi promotori che trascrivono isoforme differenti. 4 promotori sono nella regione 5', ciascuno dei quali comporta differenze nelle sequenze trascritte del I° esone; sono attivi nelle cellule muscolari, cardiache, nei linfoblasti e nelle cellule del Purkinje della corteccia cerebellare. 4 promotori sono nelle regioni interne (introni 29, 44, 55 e 62) e trascrivono sequenze del III e IV dominio (importanti per l'interazione con la membrana) ed esprimono isoforme sintetizzate nelle cellule retiniche, embrionali e nervose, a funzione per ora sconosciuta.

La DMD (**distrofia muscolare di Duchenne**) è una malattia legata al sesso, trasmessa dalle madri ai figli maschi poiché il gene DMD è localizzato sul cromosoma Xp21.2 (femmine eterozigoti, 2 cromosomi X, maschi emizigoti perchè hanno un solo X). E' una **miopia progressiva**, con perdita di cellule muscolari; a 10-12 anni non si è più in grado di camminare. E' causata da mutazioni che sono prevalentemente delle **delezioni** del gene DMD (tratteggiato rosso).



Ne consegue che il gene mutato non codifica più per la proteina (mutazione Duchenne) perchè le proteine tronche mancano del III e IV dominio (ovali azzurri sul cDNA normale). La patologia è associata ad **un'elevata concentrazione di creatina-fosfo-chinasi (CPK) nel siero**. L'enzima muscolare citoplasmatico esce dal muscolo perchè la sua membrana è degenerata. Il dosaggio elevato della CPK nel plasma può indicare le femmine portatrici della malattia.

Esiste anche una variante, meno grave, **distrofia muscolare di Becker, BMD**, causata anche da grandi delezioni. Le delezioni però colpiscono solo il dominio II, ma non comportano errori nei moduli di lettura.



A seguito di tali delezioni si forma una distrofina corta, mancante di un segmento interno, ma parzialmente funzionante perchè possiede i domini carbossi-terminali, interagenti con la membrana; la malattia colpisce solo i cingoli, ma non gli organi interni.

In maschi DMD con **mutazioni di senso**, C3340Y (l'aa 3340 è mutato da cisteina a tirosina) o la base G10227A, la distrofina non si lega al beta distroglicano: la distrofina è quindi importante nel legare la F actina al sarcolemma.

## MUTAZIONI A CARICO DI ALTRI GENI

Malattia recessiva di McArdle. Mutazioni di un gene in 11q3, codificante per la glicogeno-fosforilasi muscolo-specifica (PYGM). Se uno dei due alleli è mutato non c'è patologia, che invece si ha quando entrambi gli alleli presentano la mutazione. Dopo l'esercizio fisico, specialmente prolungato: rigidità muscolare, crampi, miopatia, un fenotipo simile a quello di altri **difetti di enzimi muscolo-specifici** che compromettono l'utilizzazione del glicogeno. Sono malattie rare, e poco studiate.

Ma come è possibile identificare la presenza di mutazioni nel genoma?

## L'ANALISI DEL GENOMA

L'impiego delle tecniche del DNA ricombinante ha permesso di studiare a fondo l'organizzazione e l'espressione dei geni (di cui abbiamo finora parlato), e di individuarne con estrema precisione le variazioni normali e patologiche. Oggi è infatti possibile ottenere in breve tempo le sequenze nucleotidiche dell'intero genoma di un individuo ed analizzarle e confrontarle mediante tecniche di bioinformatica.

## POLIMORFISMI

Le sequenze del genoma degli esseri umani sono uguali al 99,9%. Il restante 0,1% è variabile tra individuo ed individuo ed è responsabile della diversità tra gli individui. Le differenze nucleotidiche chiamate polimorfismi sono **variazioni naturali distribuite in tutto il genoma** (circa una variazione ogni 200 nucleotidi), spesso localizzate in regioni non codificanti (e quindi raramente associate a patologie).

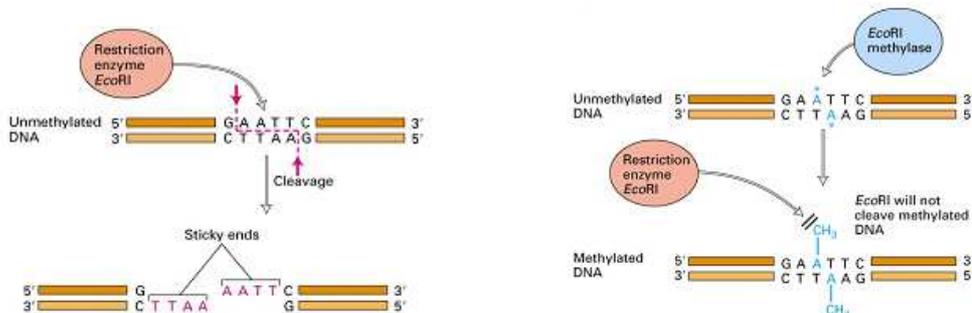
I **polimorfismi di singoli nucleotidi (SNP, pronuncia snip)** sono il tipo di variazione più comune.

Si trovano in punti del genoma ben mappati, in cui una gran parte della popolazione umana ha un nucleotide, l'altra ne ha un altro. Due genomi possono differenziare in circa  $2,5 \times 10^6$  di questi siti (1/1300 coppie di nucleotidi). Consideriamo ad es. la sequenza polimorfica AGCT**T**ACTA o AGCT**A**ACTA. Un individuo può essere omozigote T/T (ovvero possedere la T in ambedue le regioni alleliche ereditate una dal padre e l'altra dalla madre), oppure omozigote A/A, oppure eterozigote T/A.

Loci genici possono essere polimorfici anche perchè contengono **sequenze ripetute** in tandem (**STR e VNTR**, variable number of tandem repeats) come ad esempio il dinucleotide  $(CA)_n$ , ripetuto  $n$  volte. Queste regioni replicano con fedeltà relativamente bassa a causa dello slittamento che avviene tra lo stampo ed i filamenti di nuova sintesi durante la replicazione del DNA: il valore preciso di  $n$  può pertanto variare da un genoma all'altro. La maggior parte degli esseri umani sono eterozigoti per questo polimorfismo. Ne consegue che il polimorfismo da sequenze ripetute è più utile dello SNP per differenziare un individuo dall'altro.

## COME EVIDENZIARE I POLIMORFISMI DEL DNA

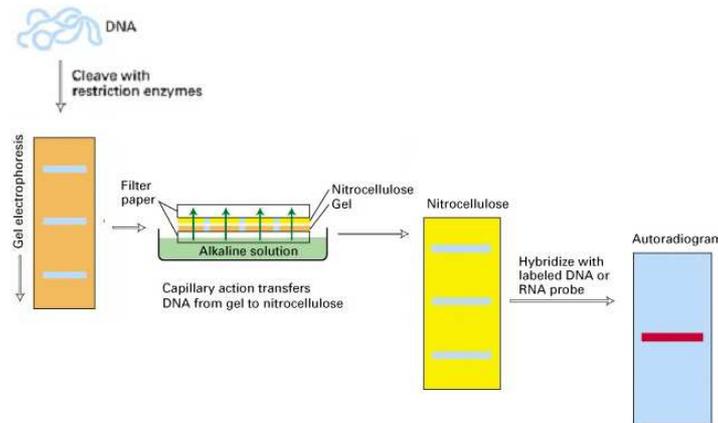
Per evidenziare i polimorfismi si possono utilizzare le variazioni nella **lunghezza dei frammenti di restrizione, RFLP** (restriction fragment length polymorphism). Gli **enzimi di restrizione** (già descritti nel capitolo dei DNA ricombinanti) sono forbici molecolari (DNAsi specifiche) prodotte da diversi ceppi batterici (nell'esempio EcoRI prodotta dall'*Escherichia coli* I) che tagliano il DNA a livello di siti specifici, formando, come presentato nell'esempio, frammenti con estremità coesive (sticky ends).



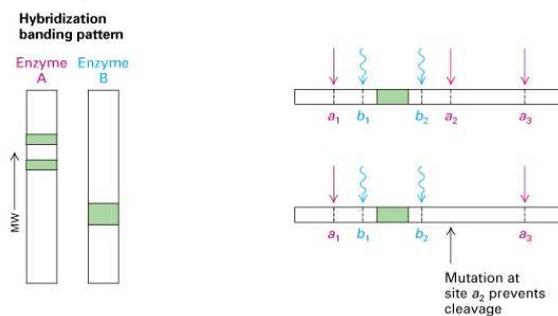
Gli **enzimi modificatori** (che metilano un nucleotide della sequenza specifica) modificano la sequenza nel DNA del batteri che produce quell'enzima, impedendo al batterio di tagliare il proprio DNA, ma non quello di un virus od altro organismo/ceppo batterico infettante il batterio.

Per analizzare i frammenti di DNA prodotti dalla digestione con enzimi di restrizione un tempo si utilizzava l'analisi **del Southern blotting**, che consiste nell'identificazione di frammenti di restrizione specifici all'interno di una miscela di frammenti di DNA (analisi RFLP). I frammenti di DNA ottenuti per digestione con l'enzima di restrizione vengono separati mediante elettroforesi in un gel di agaroso. I frammenti si separano in base alla loro dimensione: i più corti migrano più velocemente verso il catodo (+). Quindi, si dispone il gel su di un supporto che pesca tampone da una vaschetta, e sul gel si pone un filtro di nitrocellulosa, che verrà ricoperto di pannetti di carta assorbente. Per capillarità il tampone passa attraverso il gel ed il filtro di nitrocellulosa, facendo trasferire il DNA dal gel alla nitrocellulosa che non è attraversabile dal DNA. Il filtro di

nitrocellulosa verrà ibridato ad una sonda molecolare marcata (es, un frammento di DNA specifico o un cDNA plasmidico, marcato con  $^{32}\text{P}$ , fosforo radioattivo) che si legherà solo ai frammenti di DNA grazie alla sua complementarità con le sequenze contenute nei frammenti. L'analisi autoradiografica evidenzierà solo i frammenti ibridati (che hanno legato la sonda) perchè risulteranno marcati.

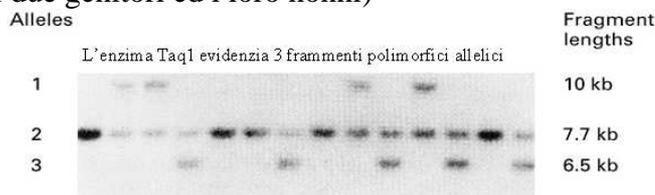


I **SNP** possono creare **variazioni nella lunghezza dei frammenti di restrizione**: se una mutazione crea o elimina un sito di restrizione, ci sarà un cambiamento nella dimensione del frammento di restrizione (il frammento di DNA prodotto da quell'enzima sarà accorciato se si sarà creato un nuovo sito, o allungato se se ne è perso uno, come nell'esempio successivo in cui figurano due frammenti invece di uno solo).

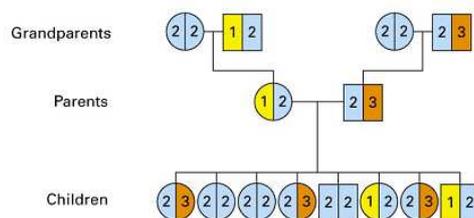


In pratica, la perdita per polimorfismo del sito di restrizione  $a_2$  si evidenzia per la comparsa di un frammento ulteriore, di peso molecolare maggiore, nella digestione con l'enzima A, ma non col B, perchè i suoi siti di riconoscimento non sono polimorfici. La variazione nella lunghezza dei frammenti di restrizione indicherà pertanto la presenza del polimorfismo. L'enzima A e la sonda specifica, perchè complementare al gene verde, evidenziano un RFLP e un sito che è variabile nella popolazione: questo è un **sito marcatore**.

Qui di seguito viene mostrato un esempio di analisi di RFLP con sonda del ch 5 in soggetti di una famiglia (8 bambini, i due genitori ed i loro nonni)



Ogni individuo possiede due alleli che lo possono rendere riconoscibile e distinguibile dagli altri

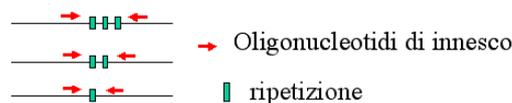


Se in una famiglia è presente una malattia il cui locus è localizzato molto vicino a questo sito marcatore, si può seguire l'ereditarietà della malattia seguendo l'ereditarietà del sito marcatore polimorfico (ad es, se il frammento di dimensione maggiore (1) cosegrega/è associato alla malattia, chi erediterà tale frammento dal genitore affetto, erediterà probabilmente la malattia). La tecnica del Southern però è una procedura complessa ed oramai sorpassata.

Attualmente, la tecnica di analisi detta **PCR, reazione di polimerizzazione a catena**, permette di identificare queste ed altre variazioni senza ricorrere alle sonde molecolari, ma semplicemente amplificando il DNA in cui è presente la regione polimorfica.

Per fare ciò è necessario conoscere la sequenza che si vuole amplificare, o almeno conoscere la sequenza nucleotidica ai lati di tale regione. L'enzima DNA polimerasi ha infatti bisogno degli inneschi, oligonucleotidi che offrano l'estremità 3' OH per l'inizio della reazione, ovvero per la formazione del legame fosfodiesterico con il desossiribonucleotide entrante. Per amplificare una sequenza di DNA occorrono pertanto, oltre al DNA da amplificare, ai desossiribonucleotidi trifosfati ed al tampone ideale:

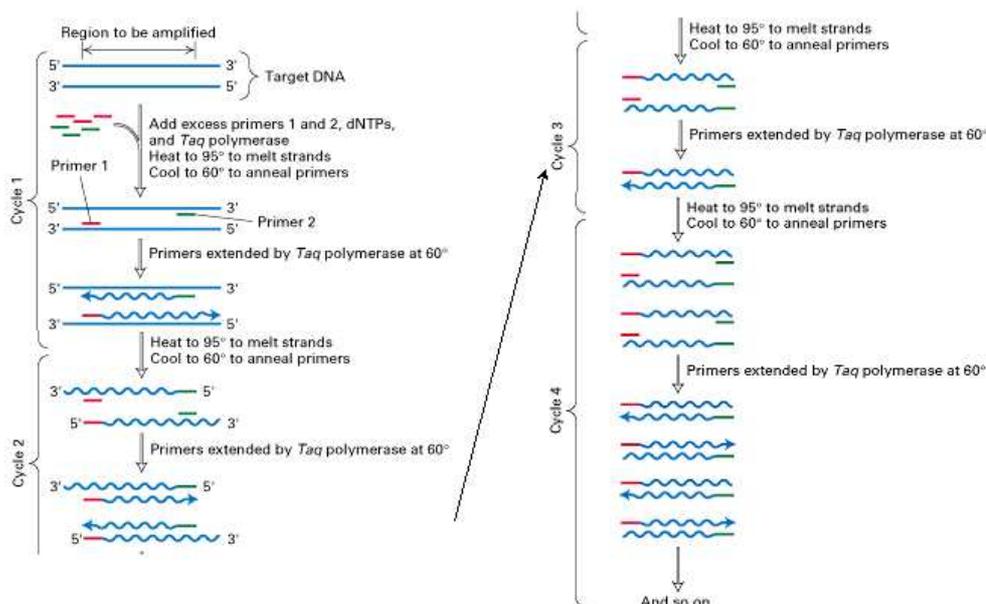
i **primer o oligonucleotidi di innesco** (circa 20 nucleotidi di lunghezza) complementari alle sequenze ai lati della regione che interessa perchè polimorfica contenendo, per esempio, una VNTR;



la **Taq DNA-polimerasi**, un enzima che, utilizzando desossiribonucleotidi trifosfati, polimerizza desossiribonucleotidi monofosfati usando come stampo il DNA e che ha un optimum di attività tra 60-70°C;

La procedura implica che

- 1) si porti a 100°C la soluzione di DNA per denaturarlo a filamento singolo;
- 2) si porti a 50°C per attaccare i primer di innesco al DNA
- 3) si riporti a 70°C la soluzione in modo che la Taq DNA-pol possa copiare i filamenti stampo come riportato nell'esempio seguente.



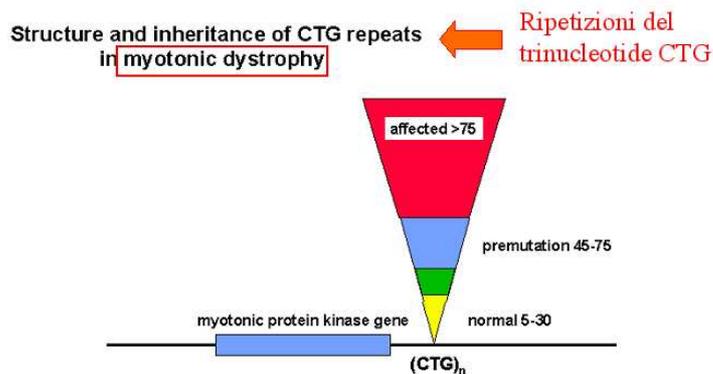
In conclusione, la PCR permette di amplificare sequenze di DNA a condizione che siano note le estremità del frammento. Ogni frammento verrà copiato a partire dall'innesco. La regione di DNA risulta amplificata esponenzialmente.

Questa tecnica viene sfruttata in **medicina legale** (nella tipizzazione di cellule e tessuti per distinguere il materiale genetico di provenienza da diversi individui come nei casi di identificazione

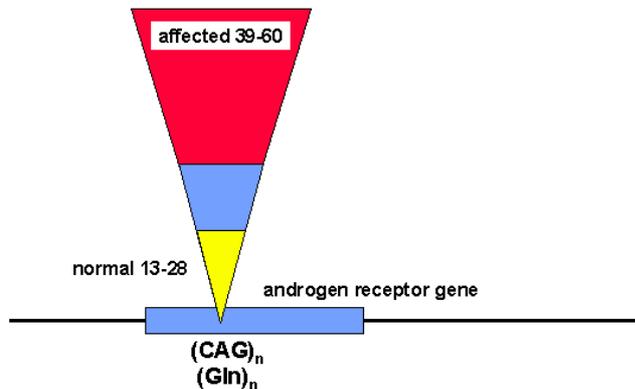
di paternità), **genetica umana** (identificazione di geni normali e mutati) e **ricerca di base** (identificazione di nuovi geni, studio della variabilità del genoma, etc.).

## POLIMORFISMI E PATOLOGIE

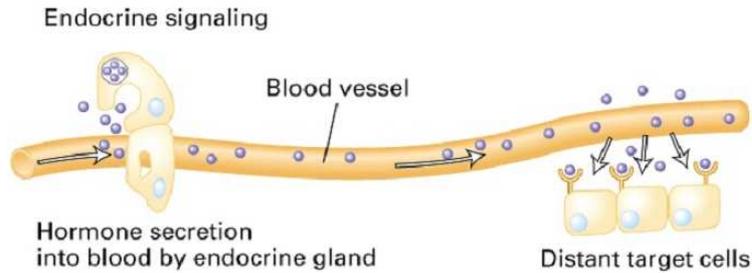
Se le variazioni polimorfiche avvengono in un gene, possono provocare patologie. E' il caso ad esempio della **distrofia miotonica**. Nella regione 3' non tradotta del gene che codifica per una kinasi della miosina (dystrophia myotonica-protein kinase) ci sono delle ripetizioni del trinucleotide CTG (da 5 a 37) che negli affetti sono 3 volte superiori (>75) a quelle normali. La malattia è caratterizzata da perdita progressiva della forza muscolare e da **miotonia**, una contrazione muscolare che persiste anche dopo la cessazione dello stimolo volontario: in altre parole, è come se il muscolo non "capisce" che il segnale nervoso è cessato e che è ora di rilasciarsi.



La **sindrome di Kennedy** (atrofia muscolare bulbare e spinale) è una distrofia causata da mutazioni del gene per il recettore dell'androgeno: il numero delle ripetizioni della sequenza CAG all'interno del gene, supera di circa 3 volte il valore normale. La tripletta ripetuta è tradotta in poliglutammina, con conseguente alterazione del recettore per l'androgeno, un fattore trascrizionale attivato dal ligando.



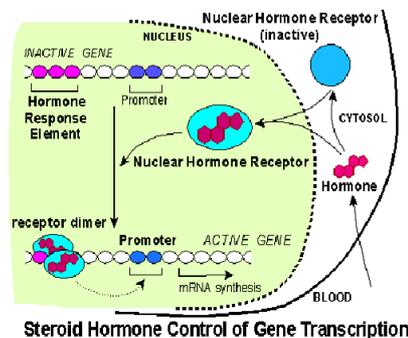
## FATTORI DI CRESCITA, ORMONI E TRASDUZIONE DEL SEGNALE



I fattori di crescita segnalano con un meccanismo simile a quello degli ormoni in quanto scorrono nel circolo sanguigno e agiscono sulle cellule bersaglio. In genere il segnale da parte di fattori di crescita è di tipo **paracrina**, se le cellule producono segnali per le cellule adiacenti, o di tipo **autocrino**, se le cellule producono il fattore per se stesse.

### ORMONI STEROIDEI E SEGNALAZIONE

Tra i fattori di crescita possono essere considerati anche gli **ormoni steroidei**. Come già visto, gli ormoni steroidei interagiscono con i **recettori nucleari**, i quali sono fattori di trascrizione attivati dall'ormone (il ligando).

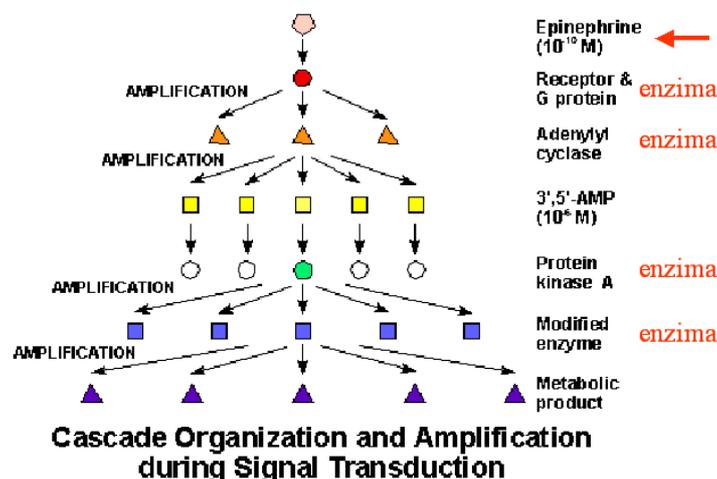


I recettori per gli ormoni steroidei appartengono alla superfamiglia dei recettori nucleari che ha come capostipite la oncoproteina erb-A ed include il recettore per gli ormoni tiroidei, gli acidi retinoici, la vitamina D ed altri in parte ancora orfani di una funzione (pag.25).

### ORMONI CON RECETTORI DI MEMBRANA E SEGNALAZIONE

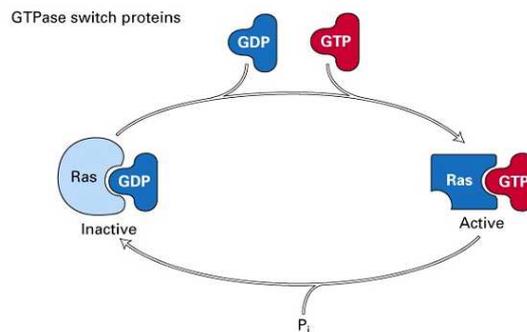
Anche il segnale dei fattori di crescita subisce il processo dell'**amplificazione** tipica del segnale ormonale

(bassa concentrazione dell'ormone in circolo, ma grande effetto intracellulare)

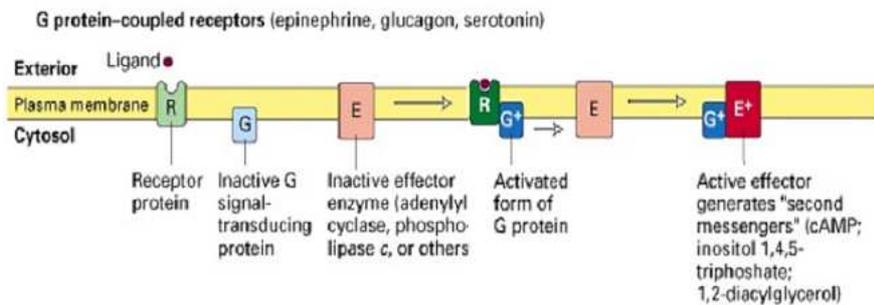


Il segnale inviato dagli ormoni che interagiscono con recettori di membrana (come l'epinefrina/adrenalina), attraversa la membrana plasmatica grazie all'interazione col recettore, e, grazie all'interazione con mediatori intracellulari, viene amplificato e distribuito nei vari distretti cellulari fino al nucleo dove agisce per lo più modulando la trascrizione e quindi l'espressione genica. In circolo la concentrazione del fattore/ormone è bassa ( $10^{-10/9}$ , nanomolare), ma il suo segnale nella cellula è vigoroso perchè gli intermediari/mediatori del trasferimento del segnale sono enzimi: hanno almeno un centinaio di molecole di substrato. Complessivamente, il segnale può essere amplificato anche di  $10^8$  volte.

L'epinefrina dell'esempio si lega al suo recettore (una proteina a 7 domini transmembrana) che per funzionare deve interagire con **proteine G** (ad attività GTPasica, in quanto idrolizzano un fosfato dal GTP formando GDP e  $P_i$ ). Queste proteine G sono etero-trimeriche, formate da 3 subunità: alfa (catalitica), beta e gamma (regolative). Le proteine G-alfa vengono attivate dal legame col GTP, ma sono inattive se legate a GDP.

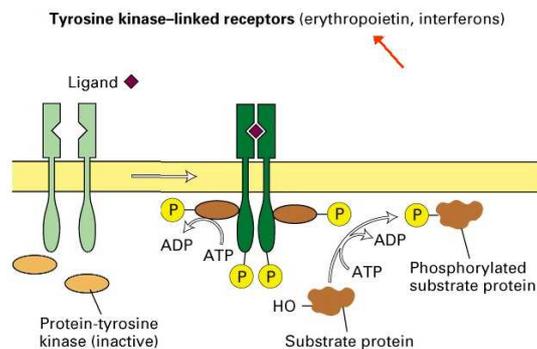


Le G $\alpha$  attive sono libere di scorrere lungo la membrana, legandosi ad esempio con l'enzima **adenilato ciclastasi** o con delle fosfolipasi, attivandole (1 ormone, 1 segnale produzione di  $10^2$  molecole di cAMP o di un altro messaggero intracellulare come l'inositolo fosfato).

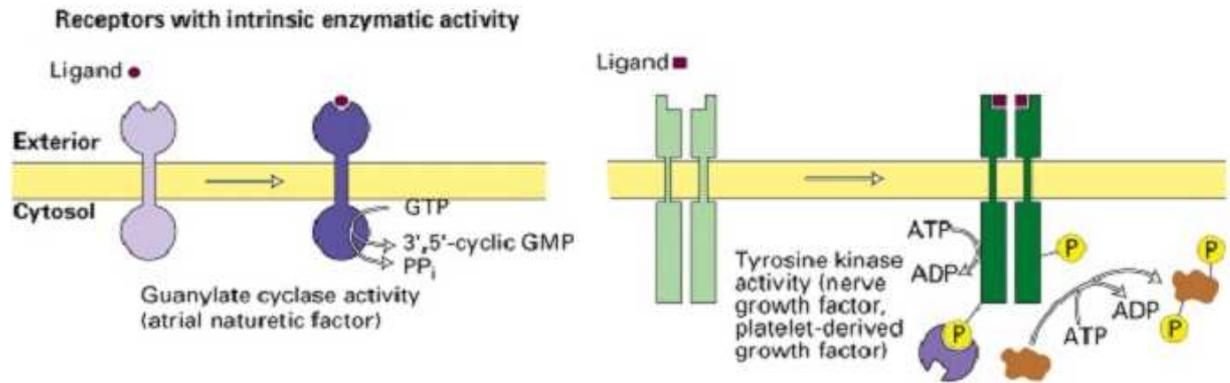


Il cAMP andrà ad attivare delle proteine che spesso sono chinasi che attivano altre proteine ( $10^4$ ) e così via. Anche il diacilglicerolo (DAG) è un messaggero che sta sulla membrana.

Esistono **recettori** (es., quello per l'eritropoietina) che per lavorare devono essere **accoppiati ad enzimi** che fosforilano il recettore, rendendolo riconoscibile da altre proteine che verranno, a loro volta, fosforilate.



Alcuni recettori hanno in sé un'attività enzimatica.



E' il caso di recettori con attività guanilato ciclasica (trasformando il GTP nel messaggero cGMP) o tirosin-chinasica (quello per il fattore di crescita del nervo etc.) che fosforilano sia il recettore stesso, autofosforilazione, sia altre proteine della trasduzione del segnale attivandole.

## GH (ORMONE DELLA CRESCITA), SOMATOTROPINA

Il GH è un ormone che gioca un ruolo importante nel controllo della crescita, inducendo la produzione epatica ed extraepatica di fattori di crescita di tipo insulinico (IGF1). Stimola il differenziamento e la proliferazione dei mioblasti. Stimola l'assunzione di aminoacidi e la sintesi proteica nel muscolo ed in altri tessuti. E' un peptide di 217 aa:

```

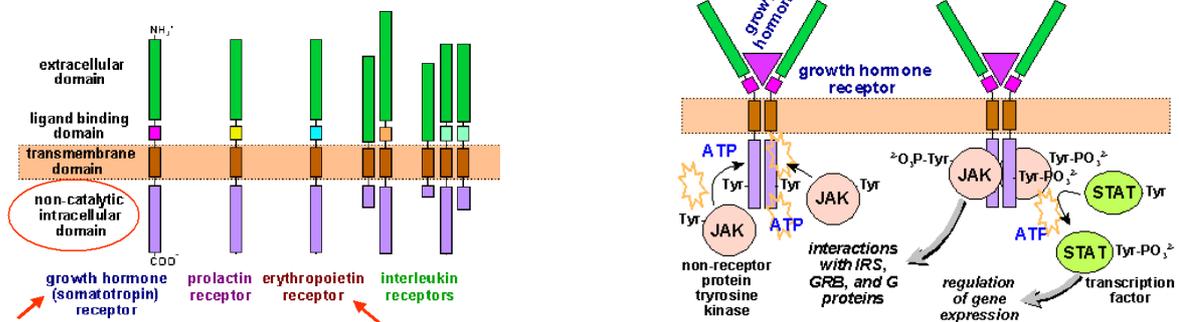
1  mapgsrtsll  lafgllclpw  lqegsafpti  plsrifdnam
   lrahrilhqla  fdtyqefeea

61 yipkeqkysf  lqnpqtslcf  sesiptpsnr  eetqqksnle
   llrlllliq  swlepqvflr

121 svfanslvvg  asdsnvdydl  kdleegiqtI
   mgrledgspr  tgqifkqtys  kfdtshndd

181 allknygllly  cfrkdmkve  tflrivqcrs
   vegscgf
    
```

Il GH interagisce con il suo recettore di membrana, simile a quello della eritropoietina. Tale recettore è costituito da una singola catena polipeptidica, caratterizzata da un dominio extracellulare col sito di legame dell'ormone, uno transmembrana, ed uno intracellulare privo di attività catalitica. Pertanto, per trasdurre il segnale, il recettore attivato deve associarsi ad una proteina kinasi.

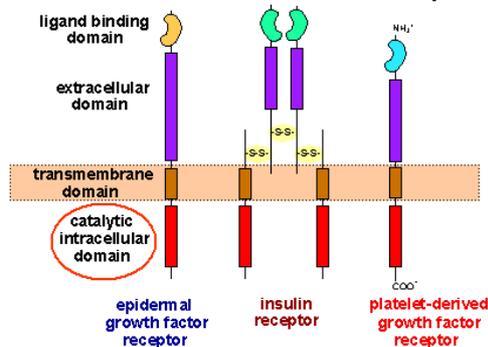


Quando il GH si è unito al suo recettore questo va incontro a dimerizzazione. A seguito della dimerizzazione, JAK, la Janus/Giano-kinasi, è capace di legare e di fosforilare in tirosine specifiche sia il recettore, sia se stessa. Questo complesso va quindi a fosforilare ed attivare STAT (fattore di trascrizione) che entra nel nucleo, regola la trascrizione, e determina l'attivazione dei fenomeni responsabili della crescita. JAK può attivare anche IRS, il substrato del recettore dell'insulina.

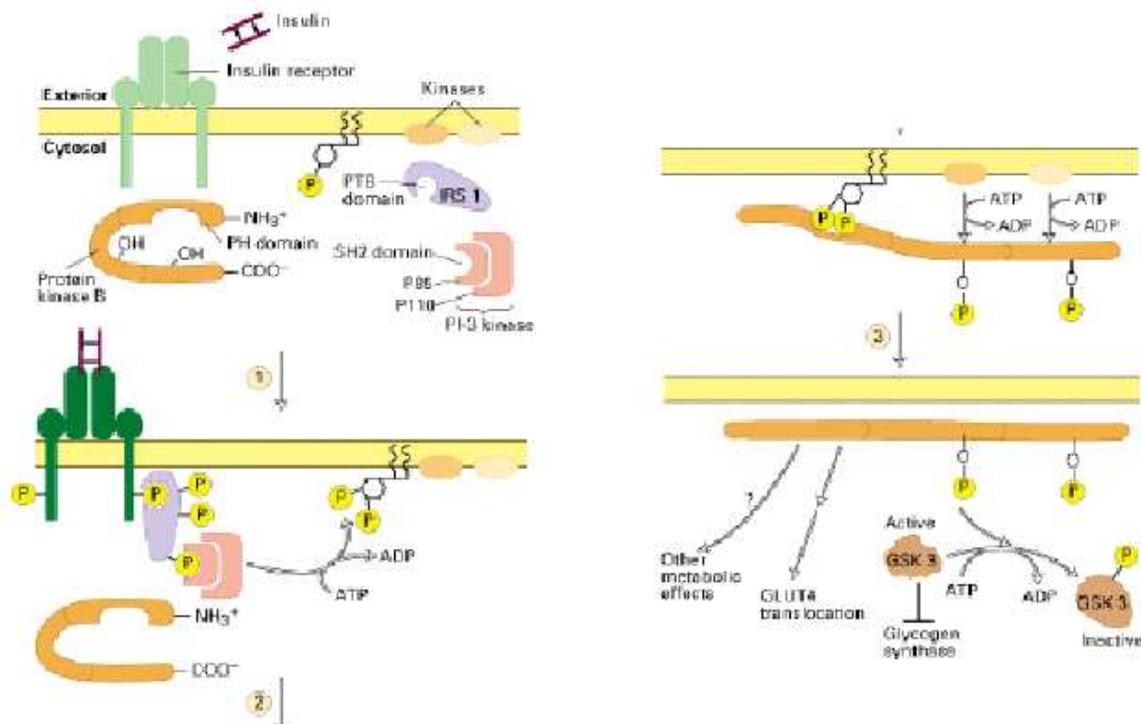
## IL RECETTORE DELL'INSULINA E TRASDUZIONE DEL SUO SEGNALE

L'**insulina**, proteina bicaenaria già citata, è un ormone anabolizzante e l'ormone della crescita per eccellenza. Essa stimola i processi di biosintesi proteica, polisaccaridica, lipidica e nucleica. Per fare ciò deve interagire col suo recettore nelle cellule bersaglio.

Il **recettore per l'insulina** appartiene alla classe dei recettori di membrana con dominio chinasi. Esso è costituito da 2 catene leggere che legano l'ormone, unite con ponti disolfuro a due catene pesanti transmembrana contenenti il dominio chinasi.



Quando l'ormone si lega al recettore insulinico (tappa1), questo si autofosforila. Le sequenze fosforilate vengono riconosciute dai domini PTB di IRS che quindi lega il recettore e ne viene fosforilato. IRS fosforilato viene riconosciuto e legato dall'enzima fosfatidilinositolo3kinasi (PI3Kinasi, formato dalle subunità p110 e p85) grazie al suo dominio SH2 (che riconosce e lega tirosine fosforilate) divenendo così in forma attiva.



**IRS:** Insulin receptor substrate

**PTB:** phospho-tyrosine-binding

**PKB/AKT** chinasi

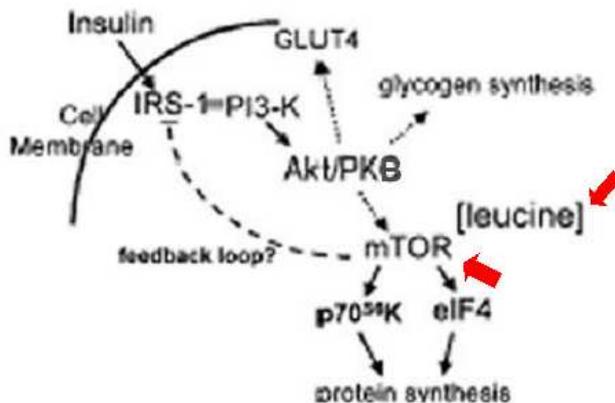
**PH:** pleckstrin homology

La PI3K attiva (tappa 2, pannello in alto a destra) va a fosforilare il fosfolipide di membrana fosfatidilinositolo3fosfato (PIP) che diviene bisfosfato. Il PIP<sub>2</sub> viene riconosciuto e legato dalla proteina chinasi B, PKB/AKT, grazie al suo dominio PH. Essa quindi si viene a trovare in vicinanza della membrana plasmatica, dove viene ulteriormente fosforilata da chinasi della membrana. La PKB attiva (tappa 3) va a fosforilare ed inattivare la GSK 3 (glicogeno sintasi chinasi 3) che, fosforilata, non è più capace di bloccare la glicogeno sintasi, la quale quindi procede alla sintesi del

glicogeno. Inoltre, la PKB/AKT attiva altri processi metabolici, inclusa la traslocazione in membrana del trasportatore del glucosio GLUT4. La cellula quindi risponde con un aumento di entrata del glucosio e di sintesi del glicogeno.

### IL SEGNALE INSULINICO E mTOR

L'insulina aumenta non solo la sintesi dei polisaccaridi e lipidi, ma anche quella delle proteine e del DNA. L'aumento della sintesi proteica è mediato dall'attivazione della chinasi **mTOR (mammalian Target Of Rapamycin)**.

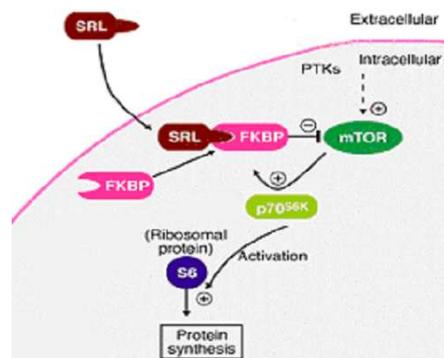
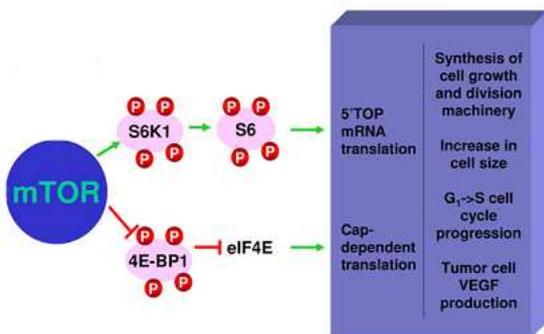


IRS-1, Insulin receptor substrate 1;  
 PI-3-K, phosphatidylinositol-3 kinase;  
 GLUT4, Insulin-dependent glucose transporter;  
 Akt, PKB; PKC, protein kinase C;  
**mTOR, mammalian target of rapamycin;**  
 eIF4, translational factor 4.

mTOR è un membro della famiglia delle **serin-treonin chinasi** che ha domini catalitici omolghi a quello della subunità catalitica della PI3K. mTOR viene anche attivato dalla leucina, uno degli aminoacidi ramificati, ed è considerato un sensore dell'ATP che regola la crescita cellulare.

I **bersagli** dell'attività chinastica di mTOR sono la S6K, ovvero la chinasi che fosforila la proteina ribosomiale S6 (che ne risulta attivata), e la proteina 4E-BP1 che inibisce il fattore traduzionale eIF4 (che diventa inibita). Ne consegue un aumento dei ribosomi (per aumento della traduzione di mRNA con estremità 5' terminali ricche in oligopirimidine, TOP) e dell'inizio della traduzione.

(RAPAMICINA/SIROLIMUS)



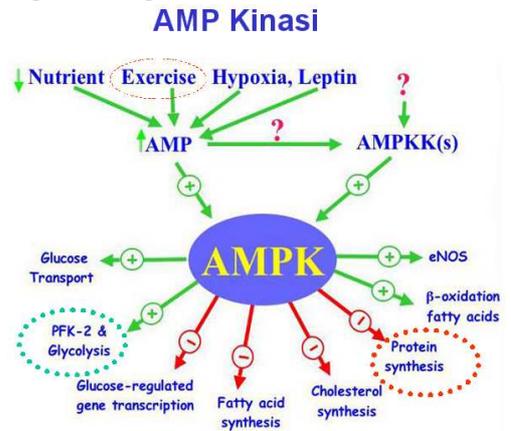
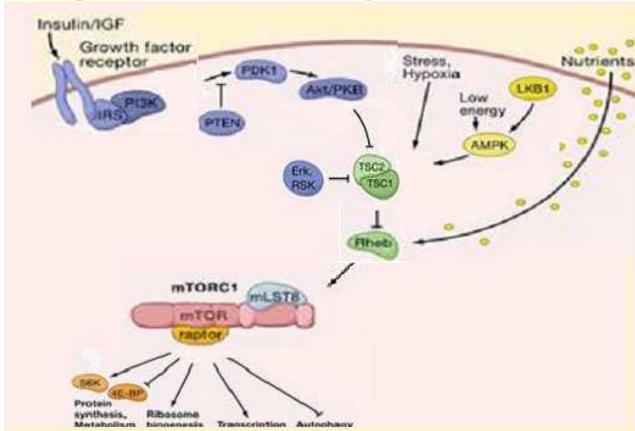
La **rapamicina** o sirolimus è un macrolide che, interagendo con una proteina (FKBP) si lega ad mTOR (il suo bersaglio) inibendone l'attività chinastica e quindi la sintesi proteica. Viene sperimentata in oncologia per ridurre la proliferazione delle cellule tumorali e viene usata nei trapiantati come immunosoppressore per evitare il rigetto dell'organo trapiantato.

mTOR si trova in forme complesse (TORC1 e TORC2), che sono regolate in modo altrettanto complesso. L'attivatore diretto di mTOR è la proteina **Rheb**, attivata da nutrienti come gli aa. Rheb è invece inibita dal complesso **TSC1/TSC2** che sono attivate dallo stress, l'ipossia e da bassi livelli di ATP, tramite la AMP-kinasi.

### CONTROLLO DELLA SINTESI PROTEICA MEDIATO DA AMPK

La **AMP chinasi** (AMPK) viene attivata da un calo dei nutrienti e da un aumento di AMP, il vero indicatore di carenza energetica della cellula. AMP si forma nel citoplasma per azione della adenilato kinasi che produce ATP da ADP ( $ADP + ADP \rightleftharpoons ATP + AMP$ ). Poichè la sintesi proteica

è un processo metabolico ad alto consumo energetico, l'attività della AMPK impedisce alla cellula di consumare risorse per la sintesi proteica ed altri processi di sintesi, inibendo mTOR via TSC1/2, potenziando però altre vie come la glicolisi e l'ossidazione degli acidi grassi.



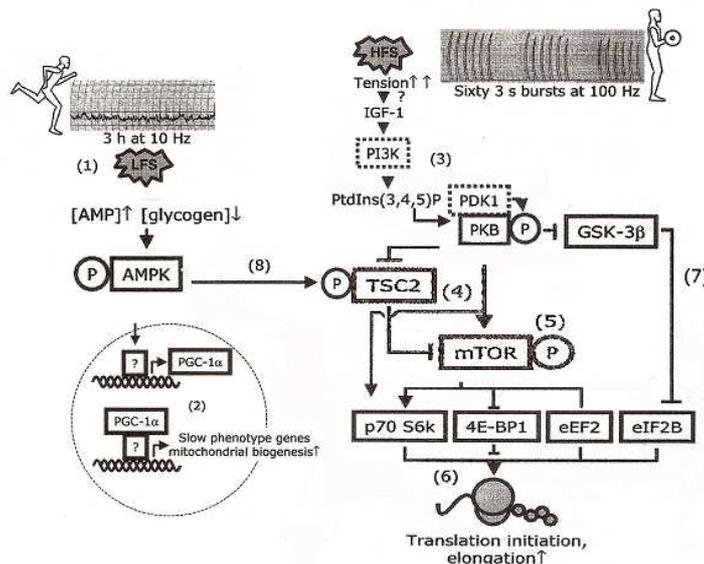
### AMMINOACIDI RAMIFICATI E mTOR

Leucina, isoleucina e valina sono amminoacidi essenziali ramificati che vengono degradati da reazioni del ciclo dell'acido citrico e dell'ossidazione degli acidi grassi e metabolizzati soprattutto nel muscolo scheletrico. Oltre ad essere substrati per la sintesi proteica e per la produzione di energia, sono precursori di altri aa e, soprattutto la leucina, di segnali metabolici. Si è visto che la somministrazione di amminoacidi ramificati (BCAA) aumenta l'attività di mTOR nel quadricipite, 1 e 2 ore dopo un esercizio di resistenza.

### mTOR, INVECCHIAMENTO E MASSA MUSCOLARE

Con l'invecchiamento si ha una perdita progressiva della massa muscolare scheletrica e un calo della sintesi proteica. In topi anziani si è osservato che l'esercizio di durata aumenta l'attività di mTOR e quella di AKT/PKB. Esperimenti su muscoli isolati sottoposti a stimolazione elettrica per simulare un'attività di durata (bassa frequenza) o di resistenza (alta frequenza), dimostrano che l'esercizio di durata attiva AMPK che, da una parte, stimola l'espressione di geni che potenziano il mitocondrio, dall'altra inibisce mTOR. In questo modo negli esercizi di durata si previene l'aumento della massa muscolare. Invece, nel lavoro di resistenza, l'aumento dei fattori di tipo insulinico e dell'attività di mTOR comporta un aumento della sintesi proteica e della massa muscolare.

### mTOR e lo switch AMPK-PKB



PGC1 $\alpha$ pa: Peroxisome activating factor receptor Gamma

