

La lunghezza degli acidi nucleici è molto più grande delle dimensioni dei compartimenti che li racchiudono

Compartment	Shape	Dimensions	Type of nucleic acid	Length
TMV	filament	$0.008 \times 0.3 \mu\text{m}$	1 single-stranded RNA	$2 \mu\text{m} = 6.4 \text{ kb}$
Phage ϕd	filament	$0.006 \times 0.85 \mu\text{m}$	1 single-stranded DNA	$2 \mu\text{m} = 6.0 \text{ kb}$
Adenovirus	icosahedron	$0.07 \mu\text{m}$ diameter	1 double-stranded DNA	$11 \mu\text{m} = 35.0 \text{ kb}$
Phage T4	icosahedron	$0.065 \times 0.10 \mu\text{m}$	1 double-stranded DNA	$55 \mu\text{m} = 170.0 \text{ kb}$
<i>E. coli</i>	cylinder	$1.7 \times 0.65 \mu\text{m}$	1 double-stranded DNA	$1.3 \mu\text{m} = 4.2 \times 10^3 \text{ kb}$
Mitochondrion (human)	oblate spheroid	$3.0 \times 0.5 \mu\text{m}$	~10 identical double-stranded DNAs	$50 \mu\text{m} = 16.0 \text{ kb}$
Nucleus (human)	spheroid	$6 \mu\text{m}$ diameter	46 chromosomes of double-stranded DNA	$1.8 \text{ m} = 6 \times 10^6 \text{ kb}$

ASSEMBLAGGIO DEL VIRUS TMV (Mosaico del tabacco)

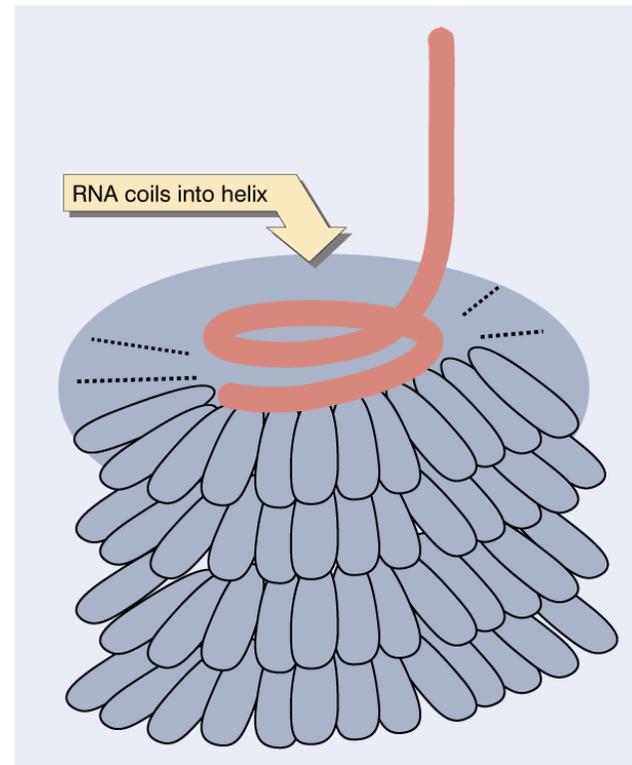
Ha 1 molecola di RNA a singolo filamento della lunghezza di 2mM

La posizione dell'RNA dentro il capsid è determinata dal legame dell'acido nucleico con le proteine.

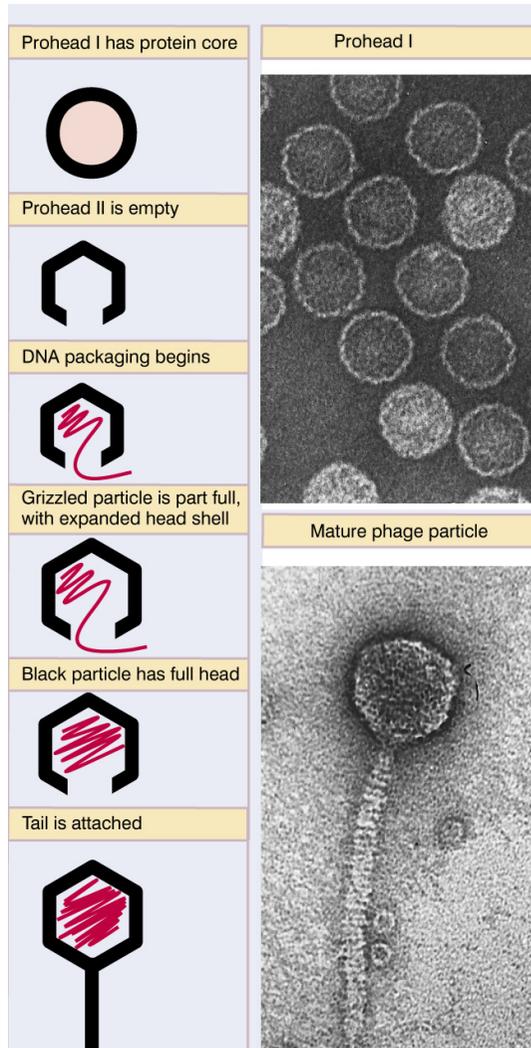
Viene assemblato in una forma **filamentosa** o a **bastoncino**

L'acido nucleico viene ad associarsi progressivamente seguendo un andamento a spirale con le proteine del rivestimento.

Parte da una forcina di nucleazione e prosegue in maniera bidirezionale.



MATURAZIONE DEL FAGO λ



Molto simile al fago T4

ha un **capside icosaedrico**

1 molecola di DNA a doppio filamento
della lunghezza di $55\mu\text{M}$

Il capsid viene prima assemblato
e poi riempito con l'acido nucleico

Traslocazione e condensazione sono
entrambi sfavorevoli dal punto di vista
energetico.

La traslocazione implica l'idrolisi dell'ATP.
Della condensazione si sa molto poco, forse
coinvolge proteine di impalcatura all'interno
del capsid.



Nucleoide di *E. coli* che fuoriesce da una cellula lisata

Il cromosoma dei batteri si chiama

NUCLEOIDE

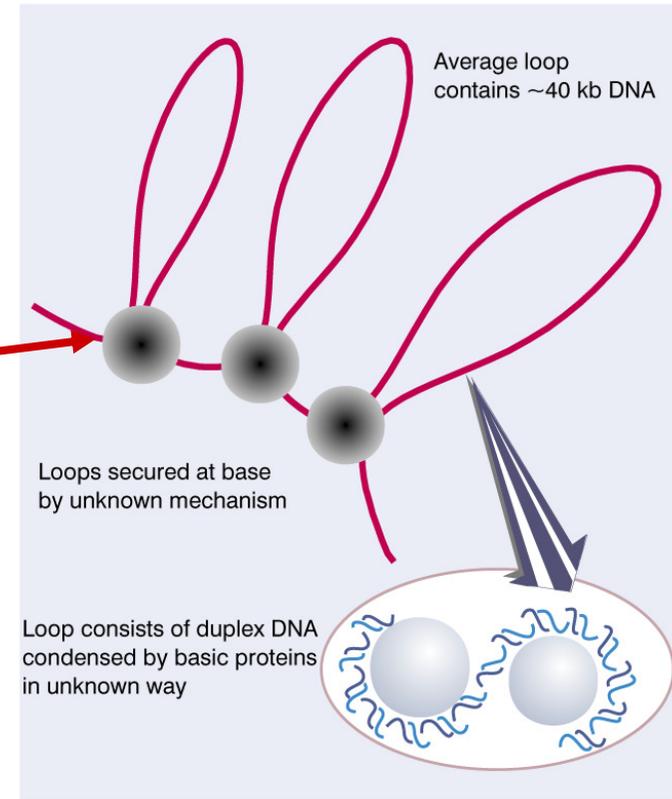
Questa struttura non presenta un fuso mitotico e quindi in seguito alla replicazione la separazione dei due cromosomi si avvale dell'attacco alla membrana cellulare



La struttura ad anse del nucleotide batterico assicura l'efficiente condensazione del DNA all'interno della piccola cellula.

La lunghezza media di un'ansa è di 40 Kb.

Come siano organizzate le proteine che tengono insieme i domini e come interagiscono con il DNA non è stato del tutto chiarito



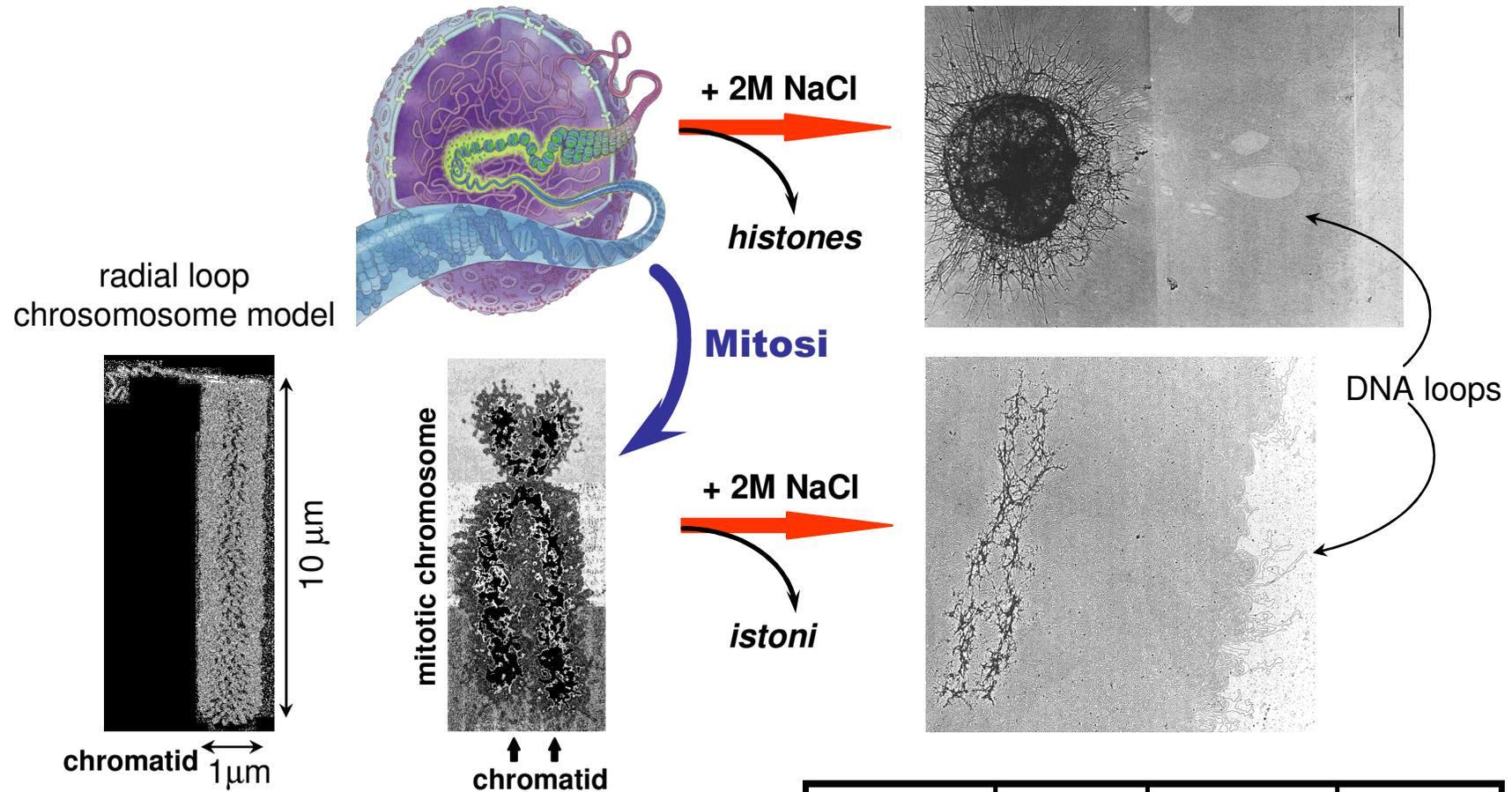
Proteine che legano il NUCLEOIDE di *E. coli*

HU: Condensa il DNA

H1: lega sequenze curve

P: ha proprietà di legame al DNA

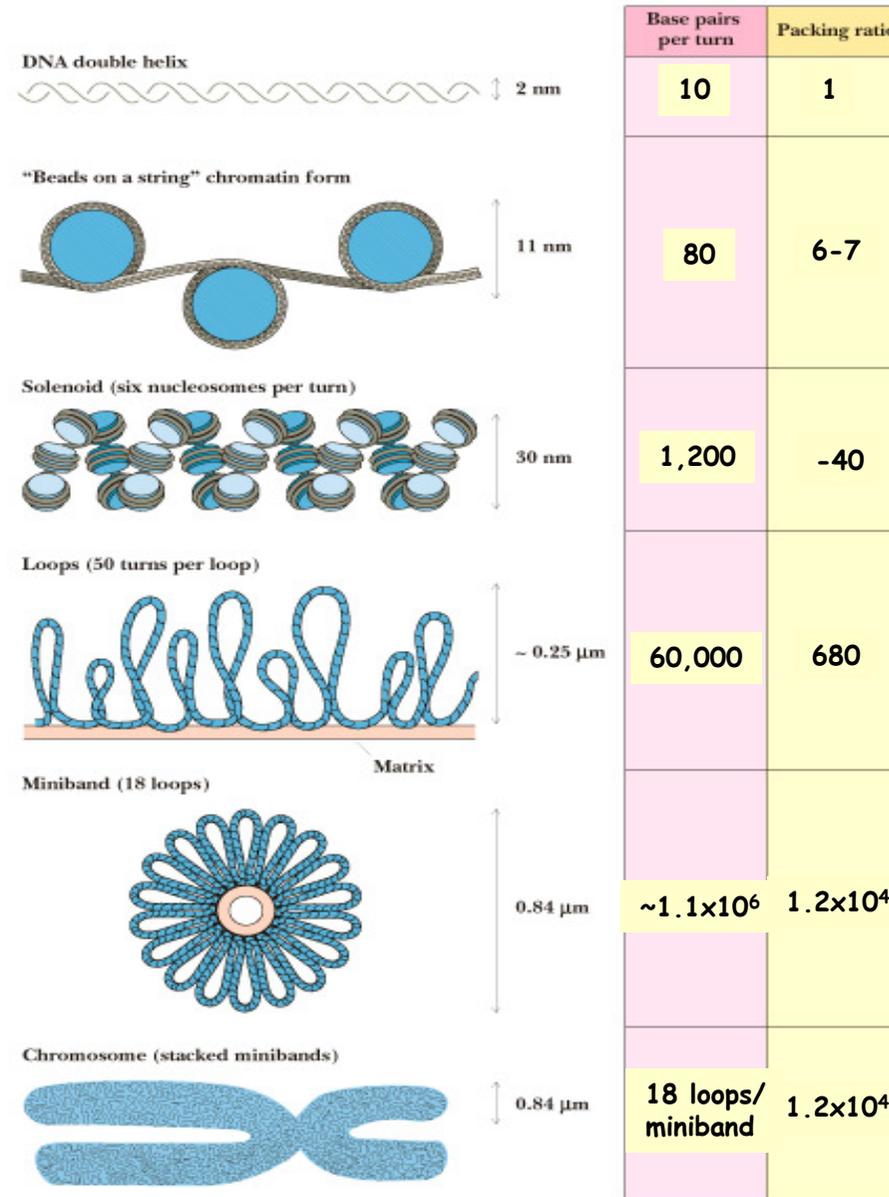
Compattamento Nucleo-cromosoma

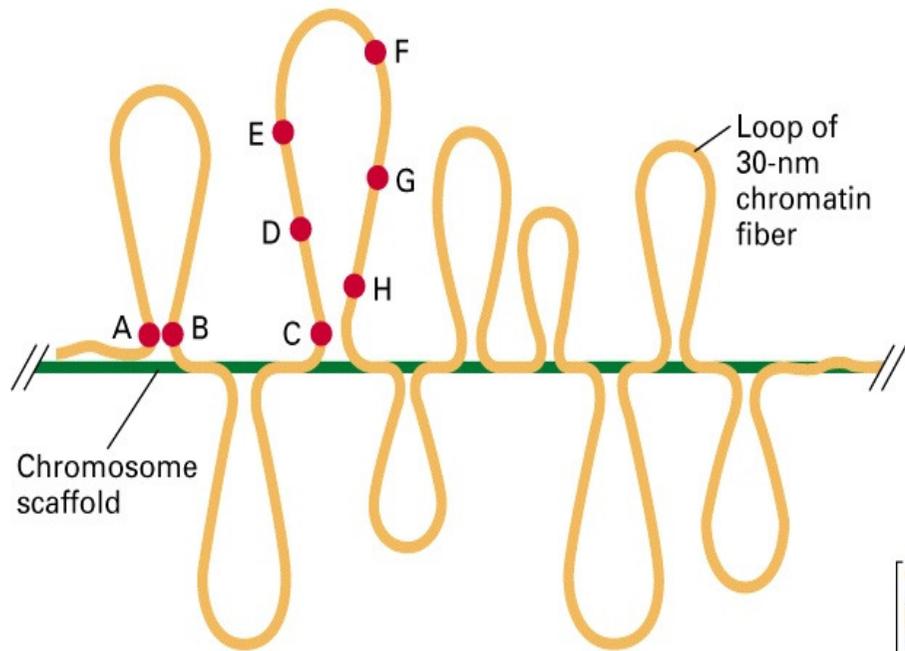


			compact size	DNA	length	compaction
nucleus (human)	2 x 23 = 46 chromosomes	92 DNA molecules	10 μm ball	12,000 Mbp	4 m DNA	400,000 x
mitotic chromosome	2 chromatids, 1 μm thick	2 DNA molecules	10 μm long X	2x 130 Mbp	2x 43 mm DNA	10,000 x
DNA domain	anchored DNA loop	1 replicon ?	60 nm x 0.5 μm	60 kbp	20 μm DNA	35 x

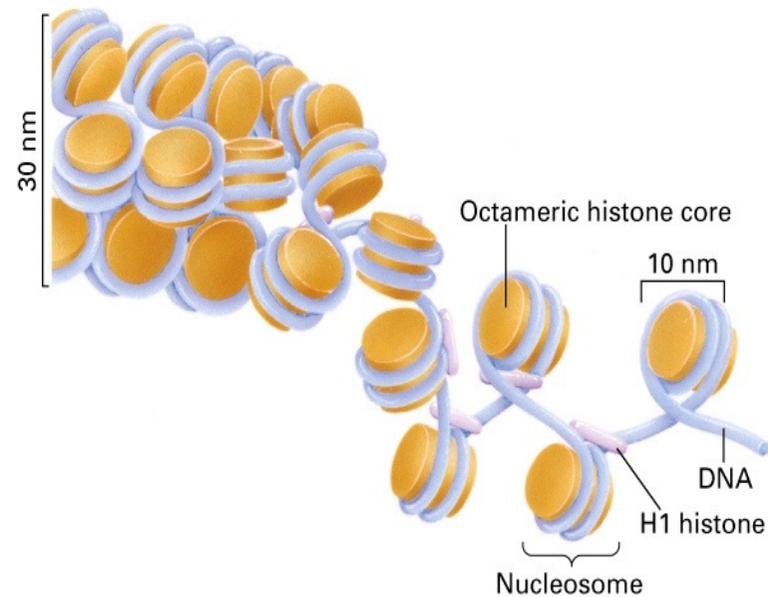
Compaction by chromosome scaffold / nuclear matrix

Livelli di compattamento della cromatina





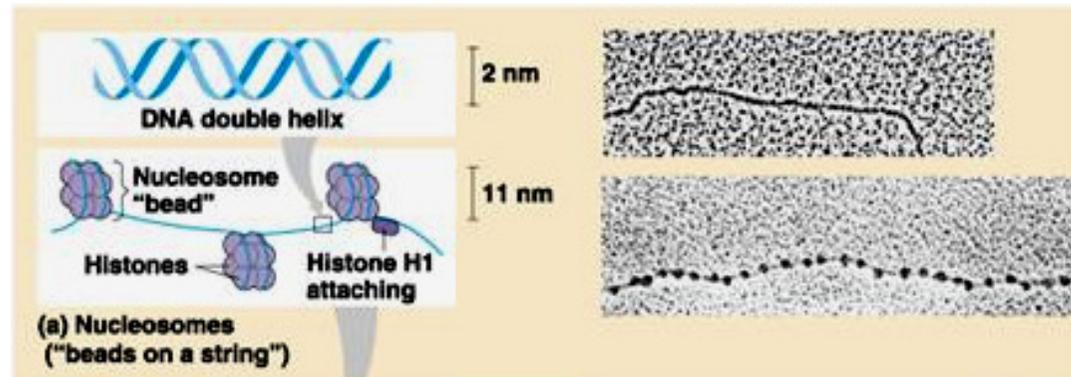
Ogni ansa è formata da una fibra che può contenere sia regioni da 10nm (meno condensate, più accessibili) sia regioni da 30nm (più condensate, meno accessibili)

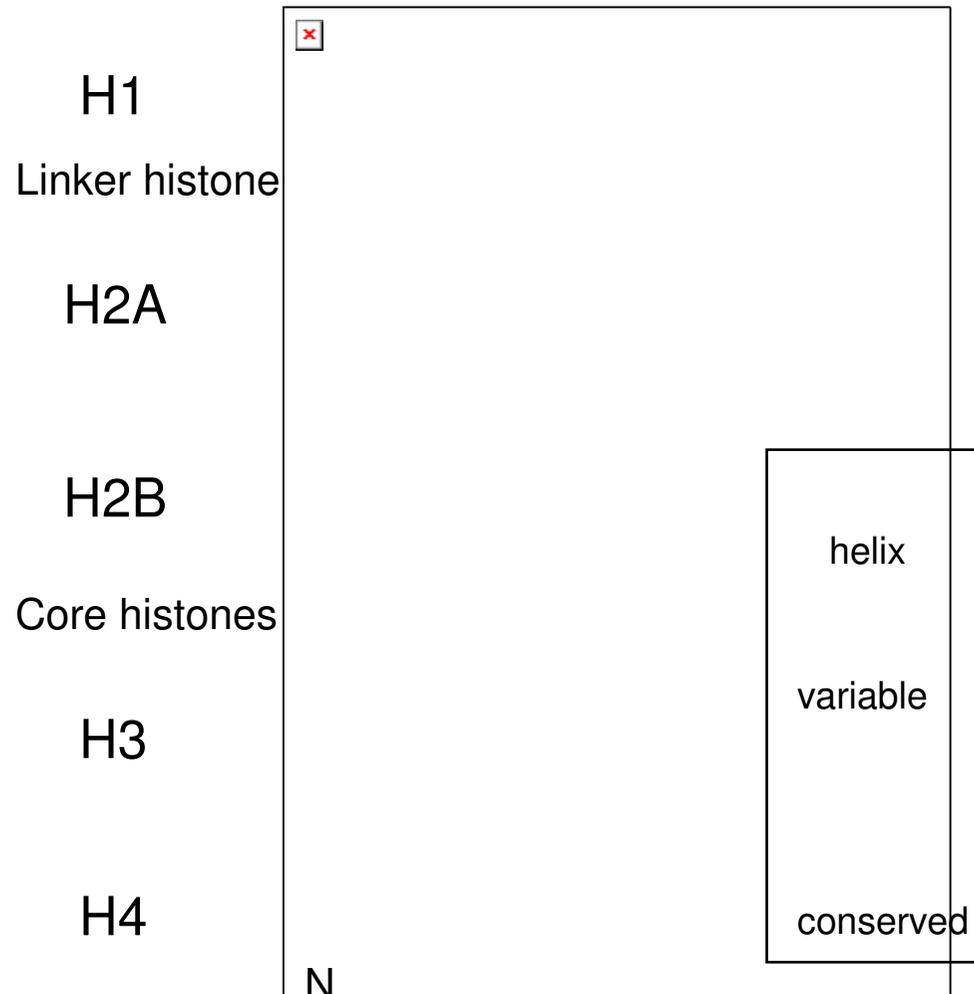


STRUTTURA DEL NUCLEOSOMA

L'unità di base della struttura cromatinica.

Primo Livello: Fibra da 10 nm





ISTONI

proteine piccole,
basiche altamente
conservate,

Histone acetylation

is a reversible modification of lysines in the N-termini of the core histones.

Result:

- reduced binding to DNA
- destabilization of chromatin

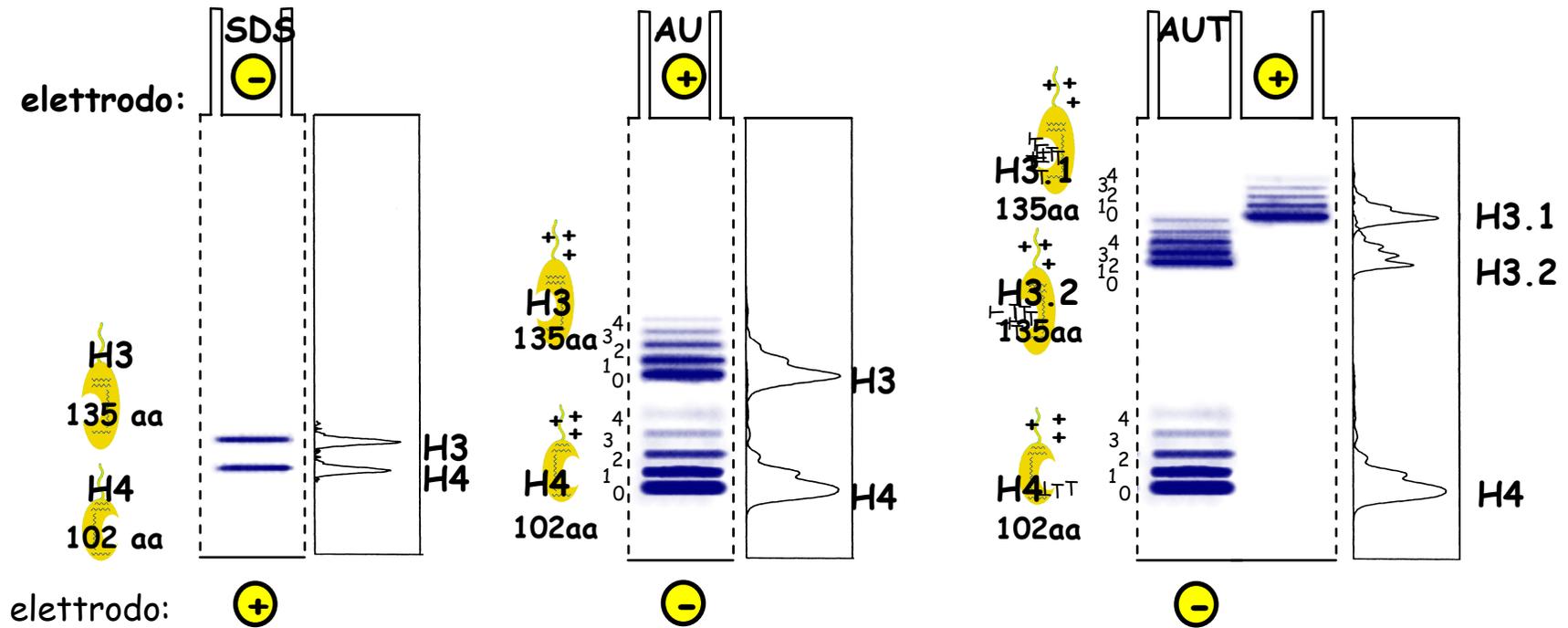
Histone Type	Molecular Weight	Number of Amino Acids	Approx. Content of Basic Amino Acids
H1	17,000–28,000	200–265	27% lysine, 2% arginine
H2A	13,900	129–155	11% lysine, 9% arginine
H2B	13,800	121–148	16% lysine, 6% arginine
H3	15,300	135	10% lysine, 15% arginine
H4	11,300	102	11% lysine, 4% arginine

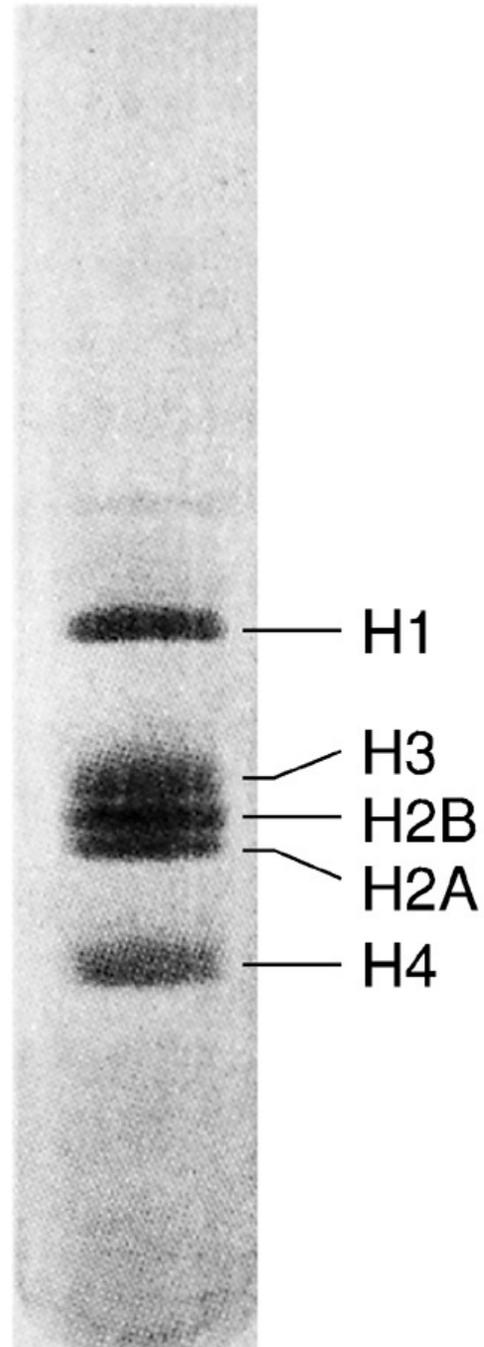
Elettroforesi degli Istoni

Separazione: Taglia

taglia + carica

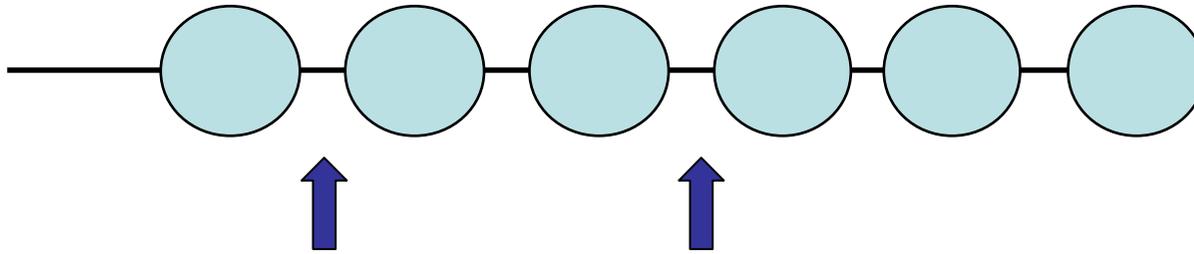
taglia + carica +
idrofobicità



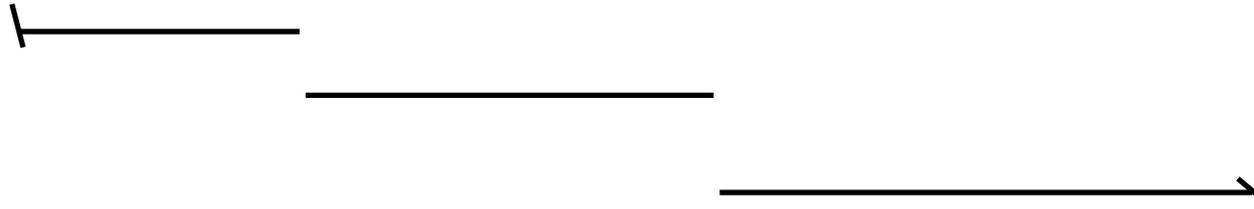


La Nucleasi Micrococcale taglia il DNA su entrambi i filamenti

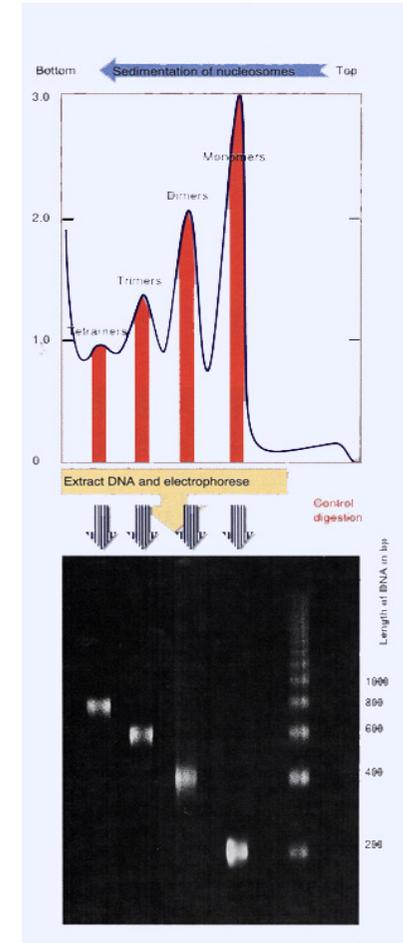
Questo enzima non taglia sul nucleosoma ma solo tra particelle adiacenti. Si possono ottenere digesti parziali

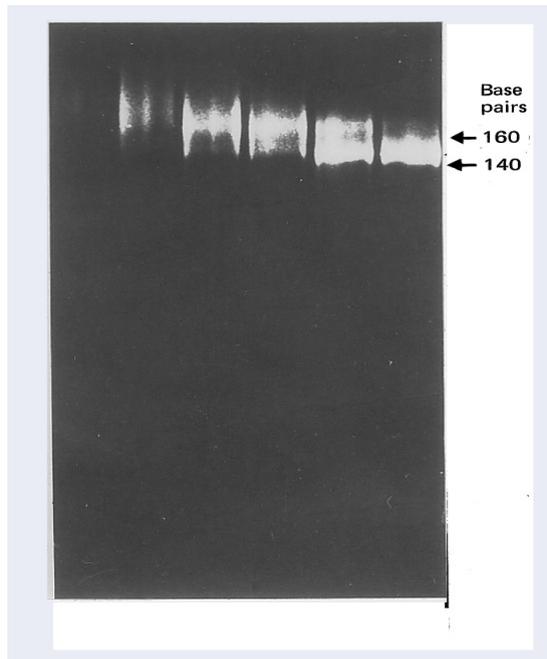


Dopo la digestione gli Istoni vengono rimossi

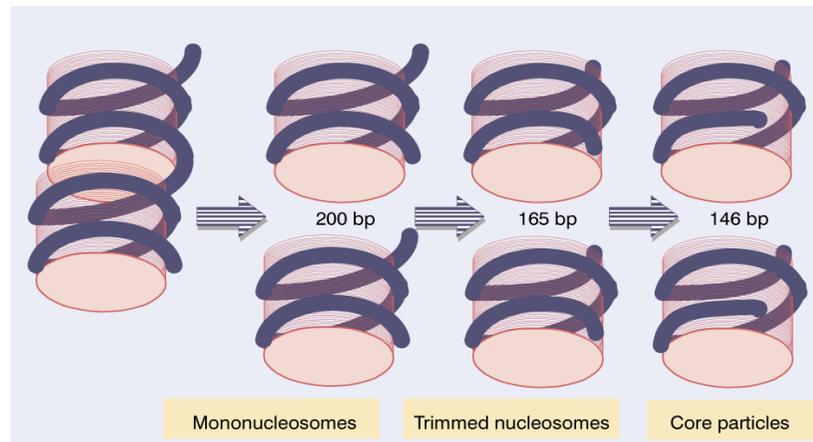


I Prodotti vengono analizzati tramite elettroforesi





Digestione spinta con Nucleasi Micrococcale



180-200bp

154bp (fungo)

260bp (riccio di mare)

146bp

8-114bp

Valore medio

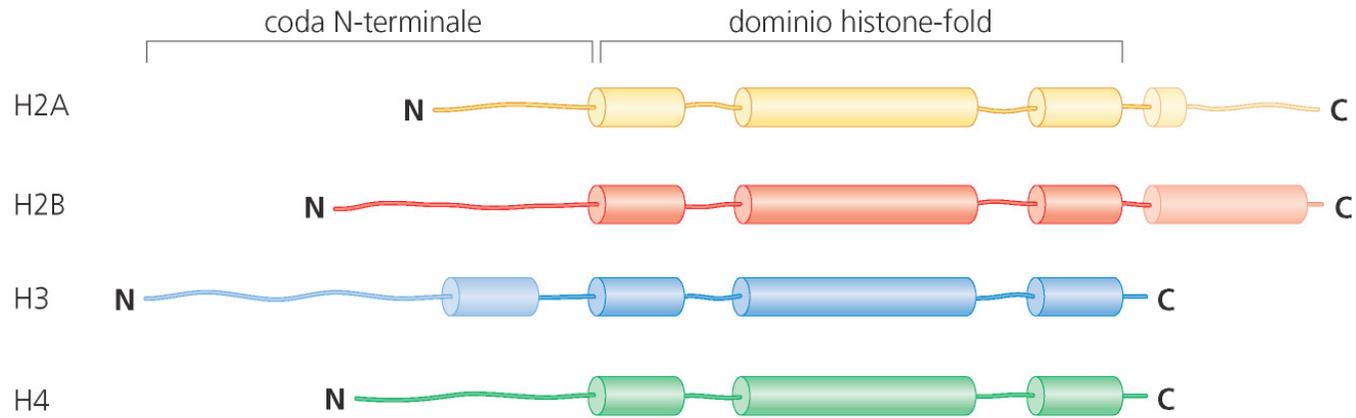
Oscillazioni tra varie

Specie

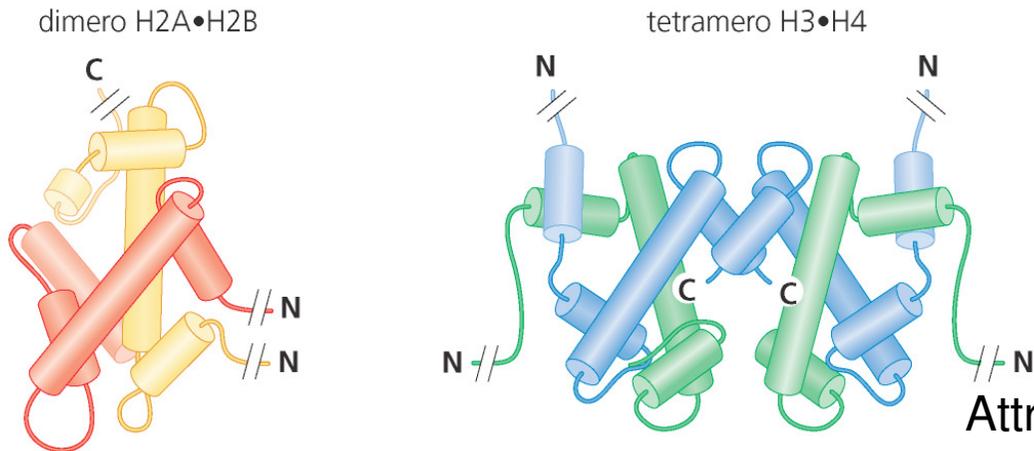
Nucleo Centrale - Invariante

DNA Linker - Variabile

a

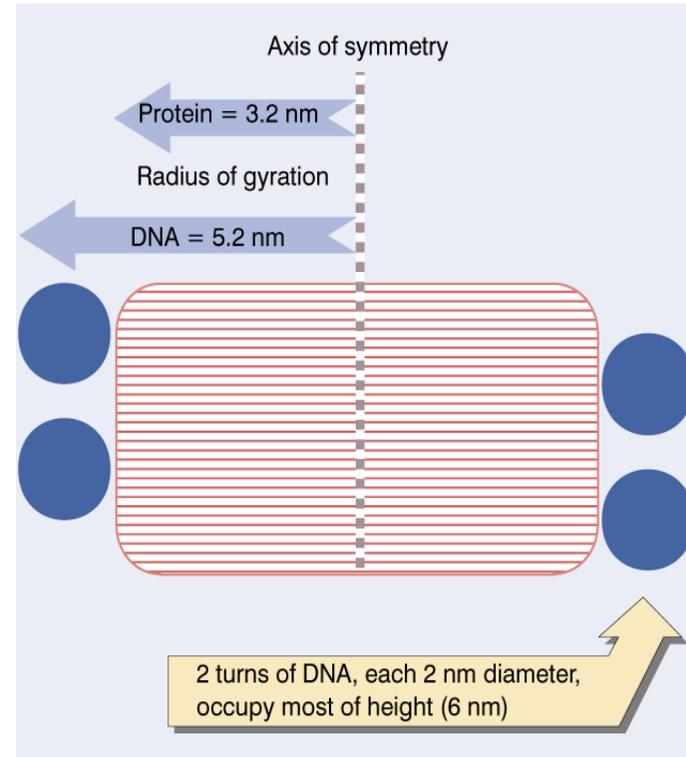
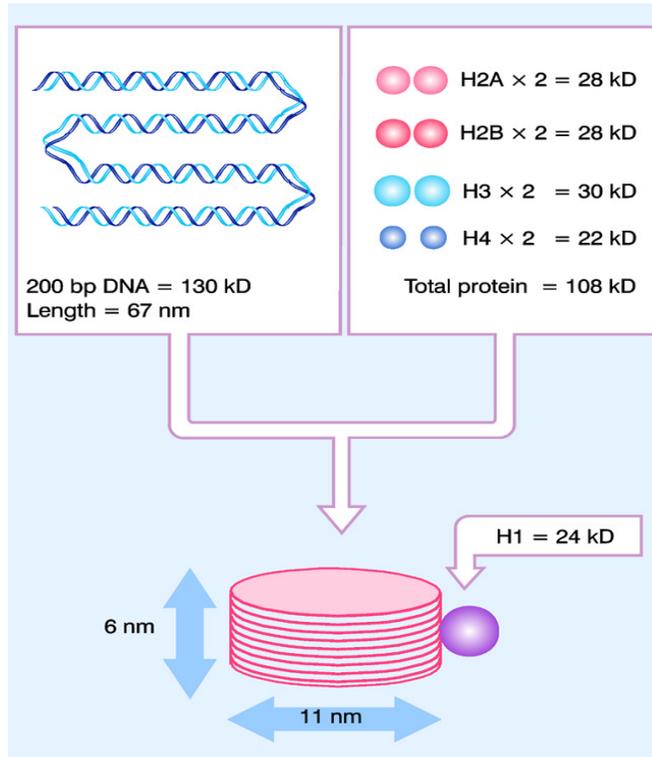


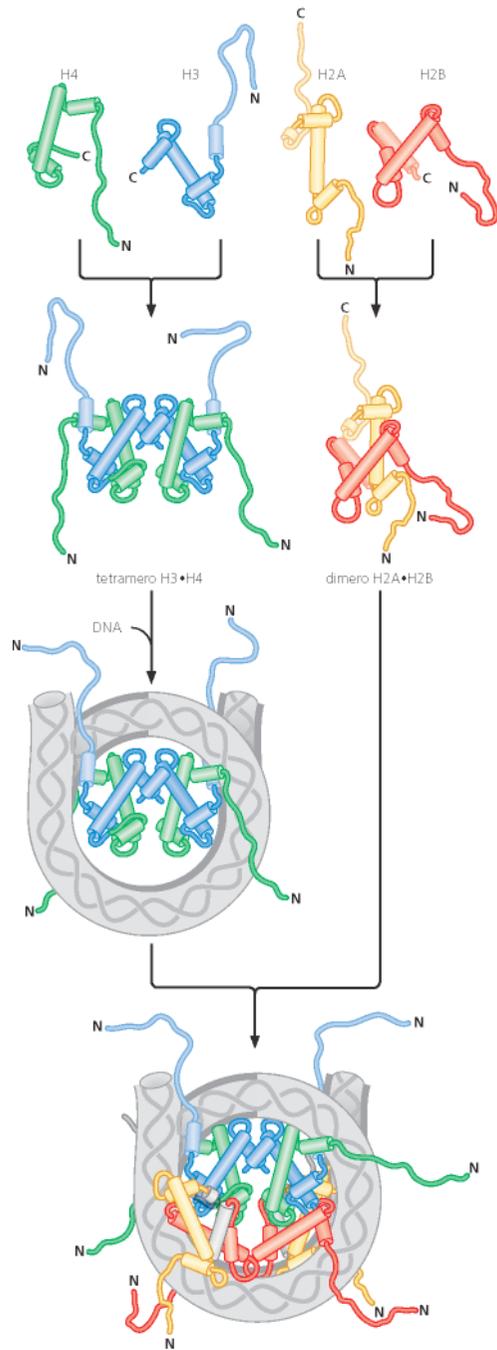
b



Attraverso il dominio histone-fold gli istoni prendono contatti a formare il core globulare. Le code N-terminali protrudono all'esterno dove prenderanno contatto con lo scheletro di fosfato del DNA

Caratteristiche generali del nucleosoma



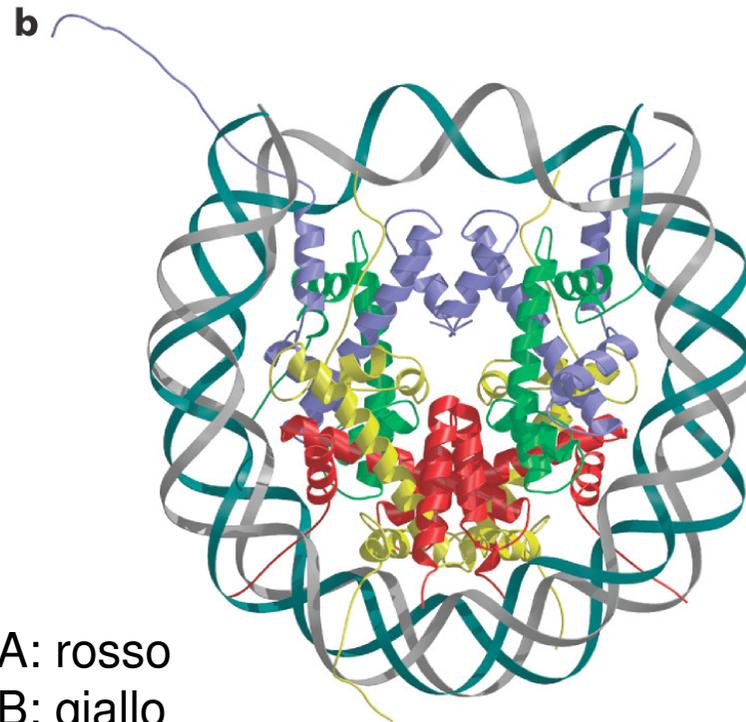
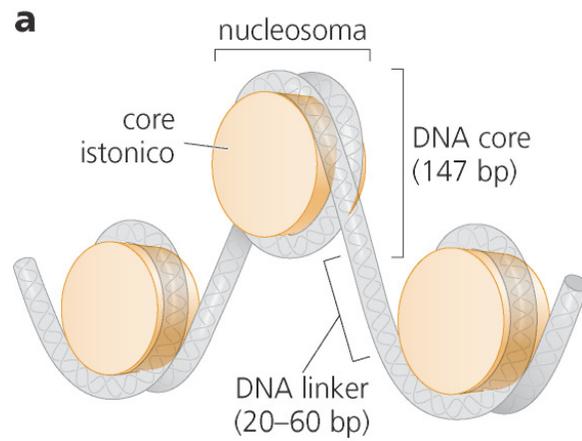


Assemblaggio del nucleosoma:
Tetramero H3/H4 e dimeri H2A/H2B
si formano indipendentemente

Il tetramero H3/H4 si lega al DNA

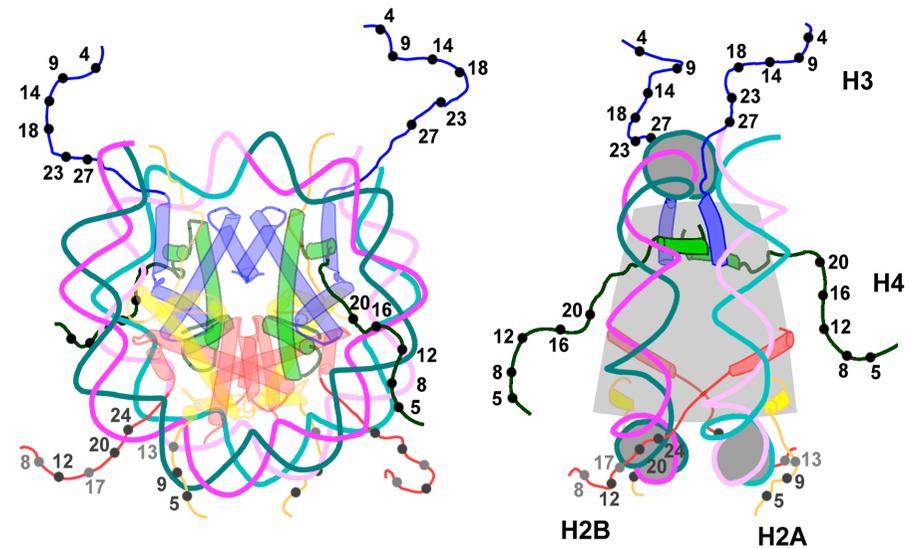
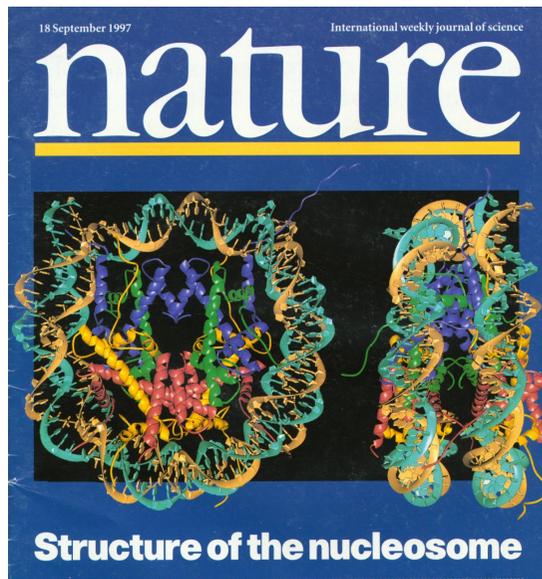
I dimeri H2A/H2B si assemblano per ultimi

Modello derivante dalla cristallografia del nucleosoma

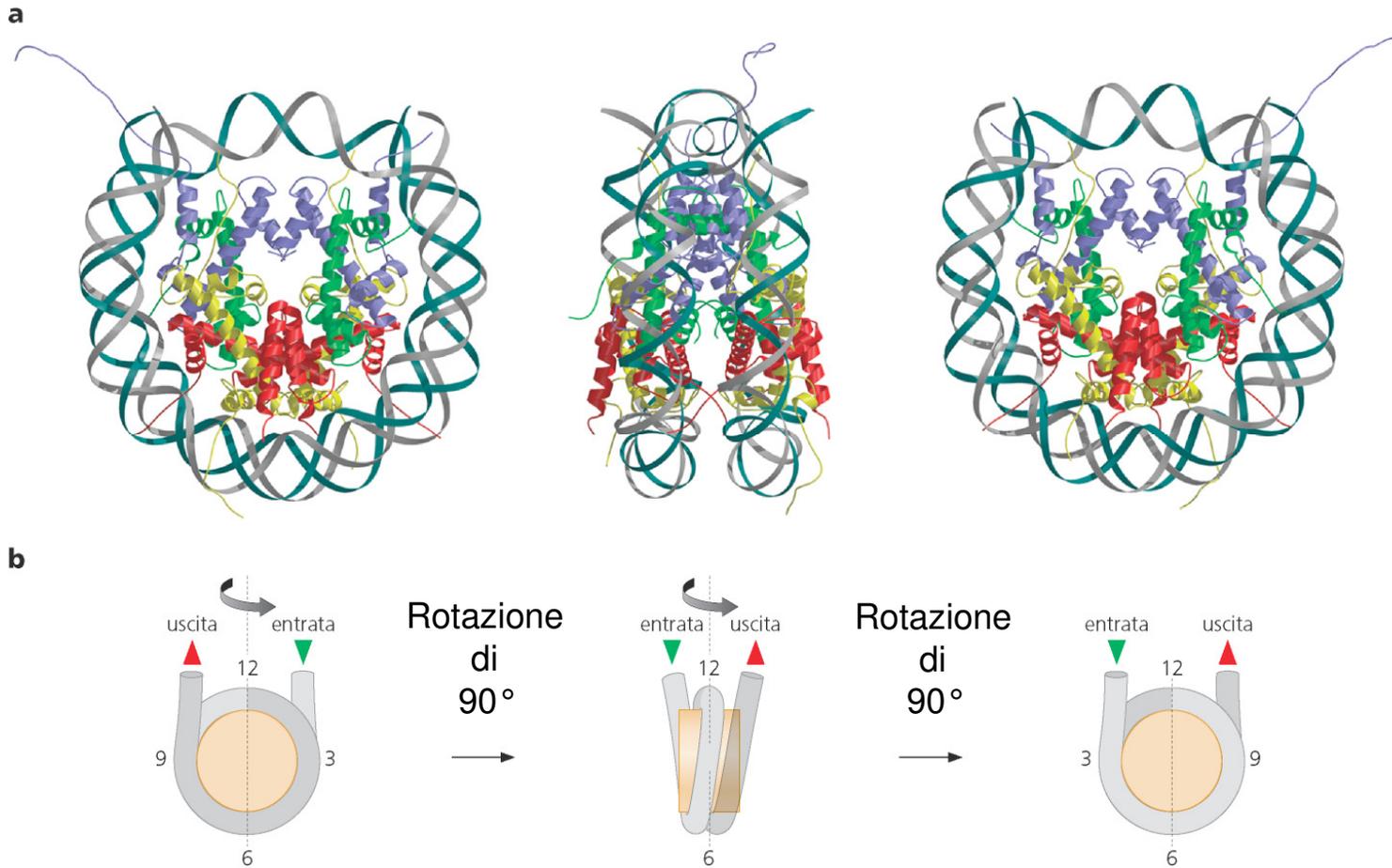


H2A: rosso
H2B: giallo
H3: viola
H4: verde

Struttura cristallografica del nucleosoma alla risoluzione di 8Å

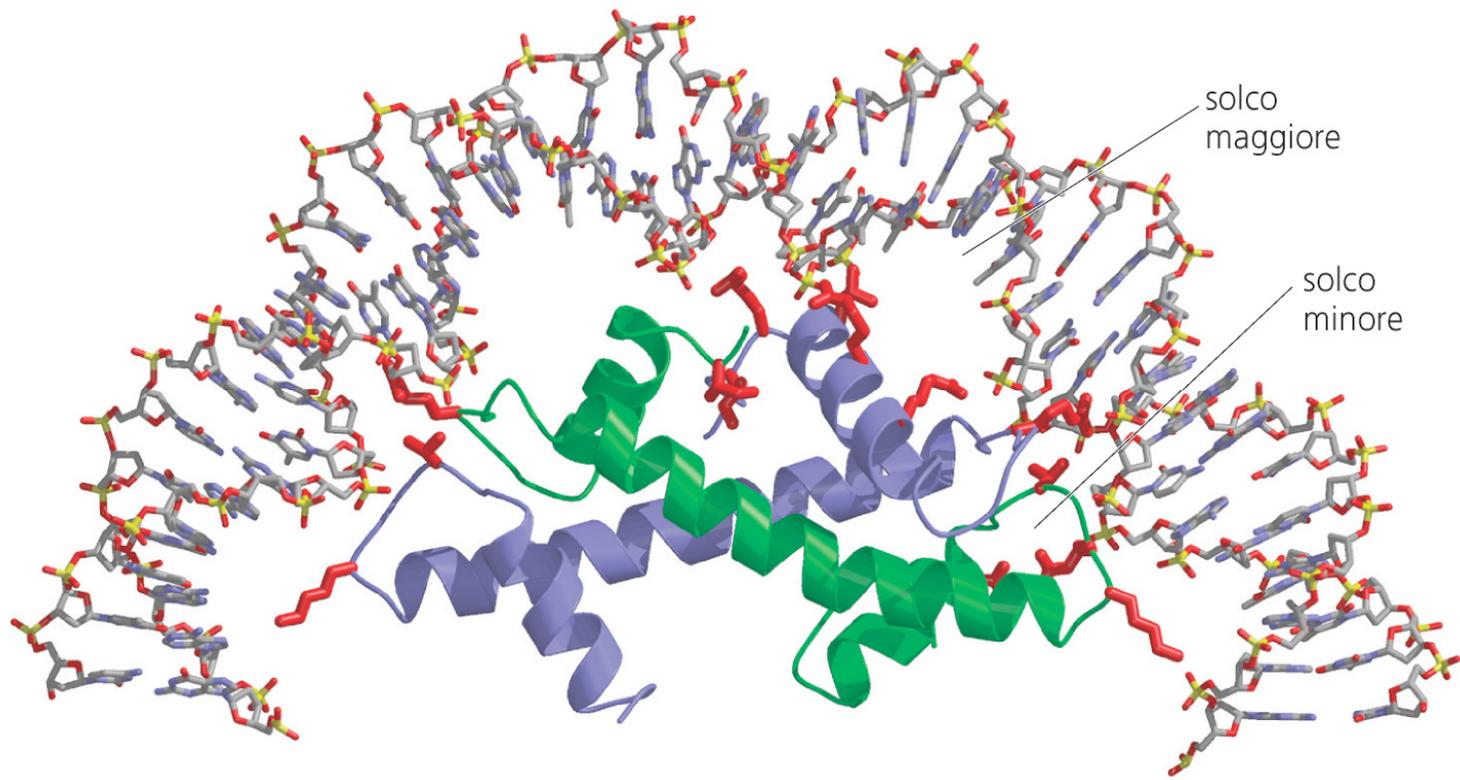


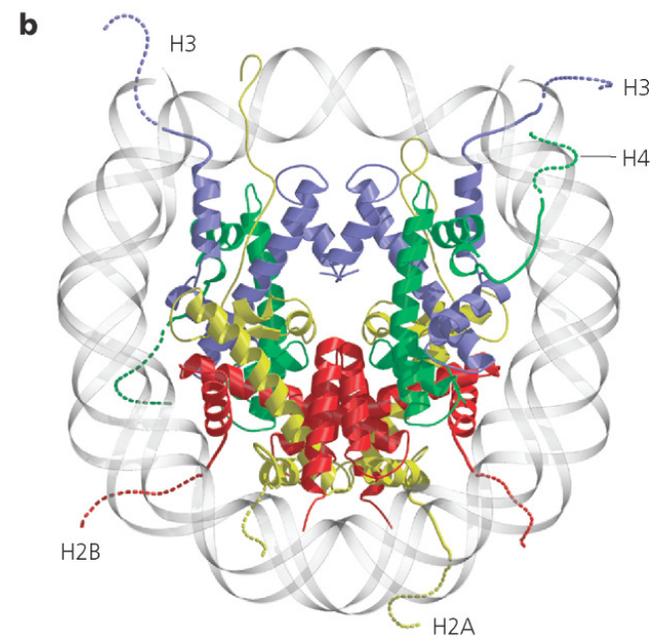
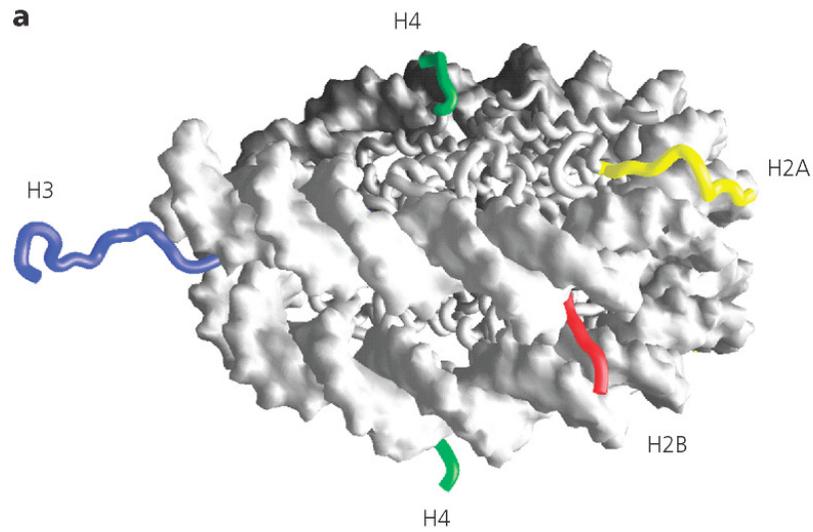
Luger, Mader, Richmond, Sargent & Richmond
Nature 389, 251-260 (1997)



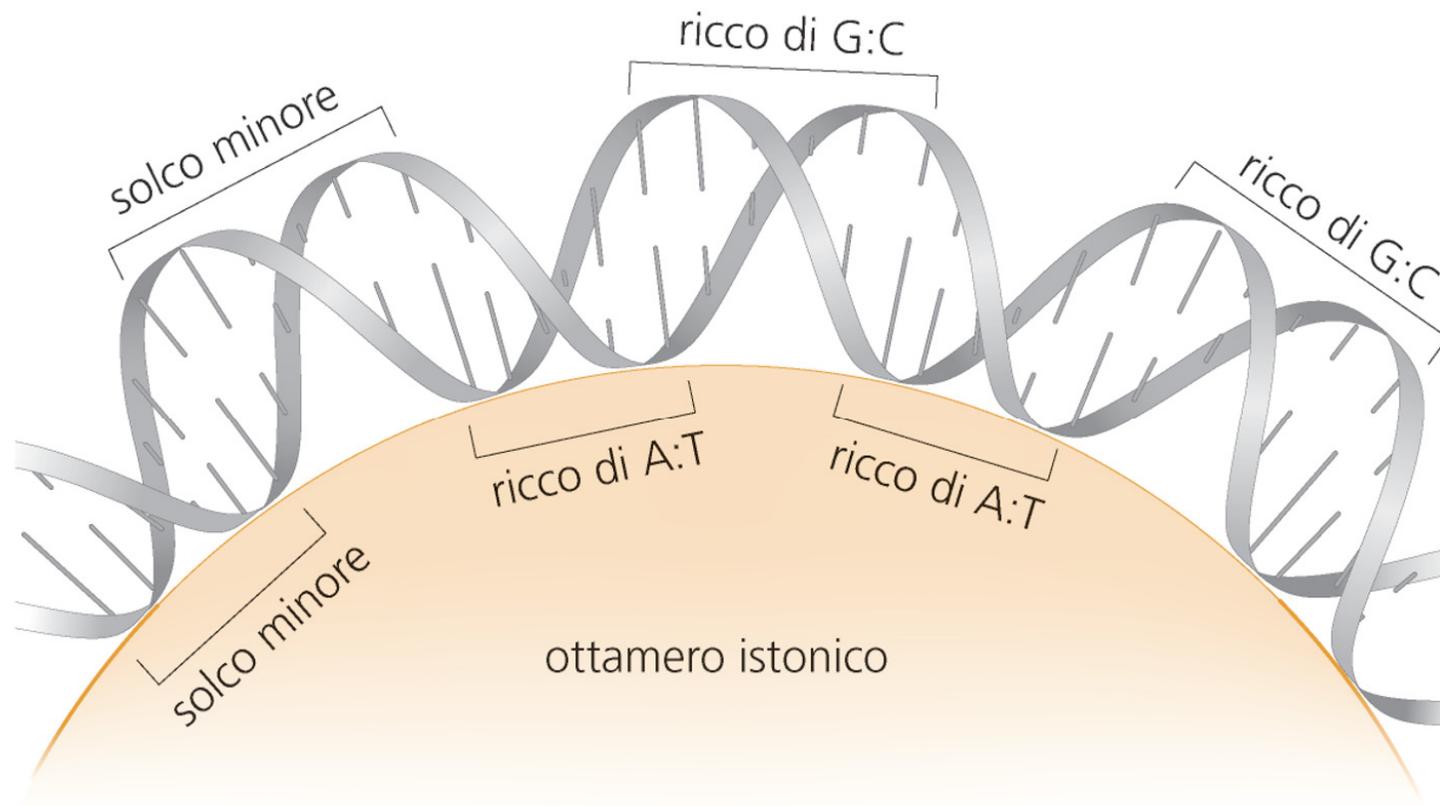
Il nucleosoma presenta una simmetria diadica

- Le regioni histone-fold del tetramero interagiscono con le 60bp centrali
- Le regioni N-terminali interagiscono con i punti di entrata e di uscita del DNA
- Ciascun dimerico H2A/H2B occupa le 30bp adiacenti alle 60 occupate dal tetramero



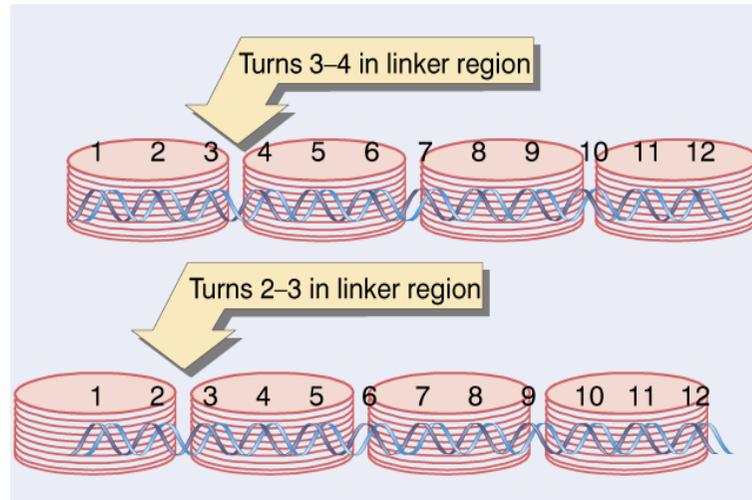


Le code istoniche N-terminali prendono contatto con lo scheletro di fosfato protrudendo in posizioni specifiche



*Il DNA ricco in AT ha tendenza a curvarsi meglio in direzione del solco minore
Invece le sequenza ricche in GC tendono a esporre il solco minore verso l'esterno*

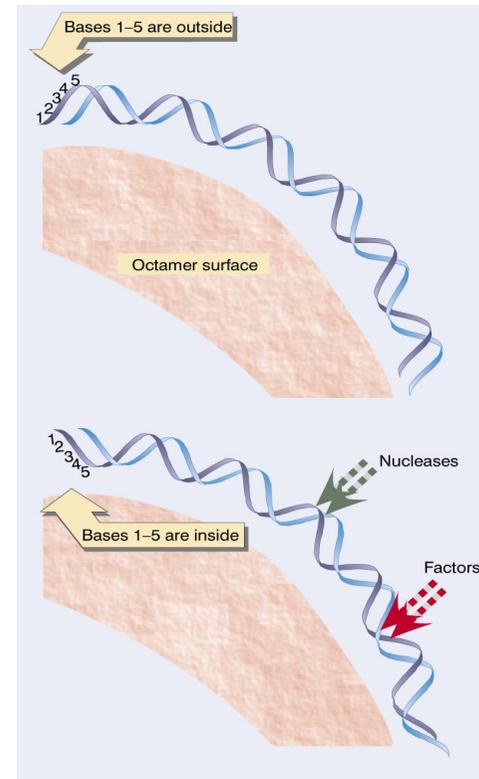
Posizionamento Traduzionale



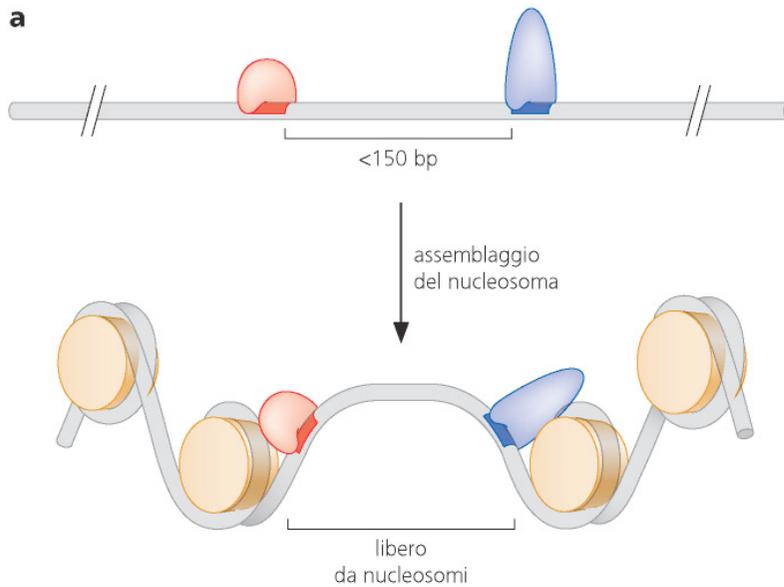
Posizionamento rispetto ad un elemento di sequenza.
La particolare sequenza può essere inclusa o esclusa dal nucleosoma

Il Posizionamento dei nucleosomi presenta risvolti importanti per quanto riguarda la trascrizione genica

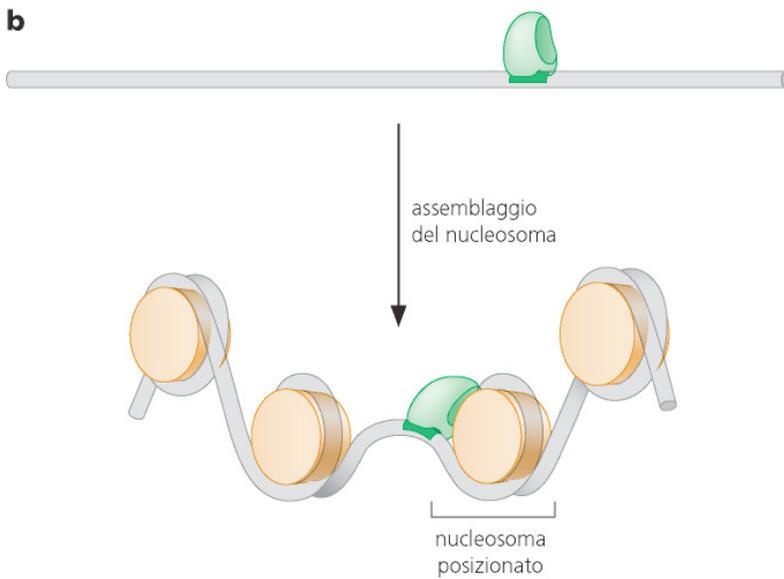
Posizionamento Traslazionale



Posizionamento rispetto alla fase dell'elica.
La sequenza può trovarsi rivolta verso l'interno o verso l'esterno sulla superficie del nucleosoma

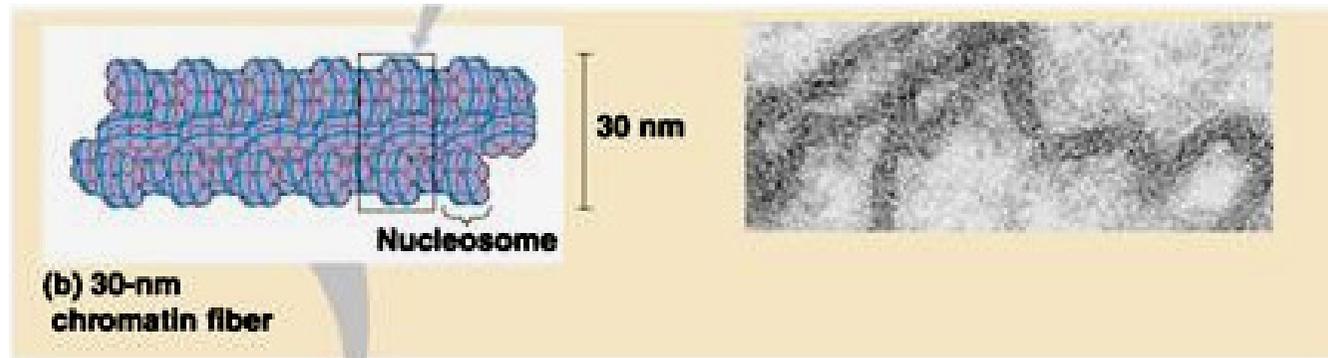


Proteine che posizionano i nucleosomi possono formare regioni nucleosome free.

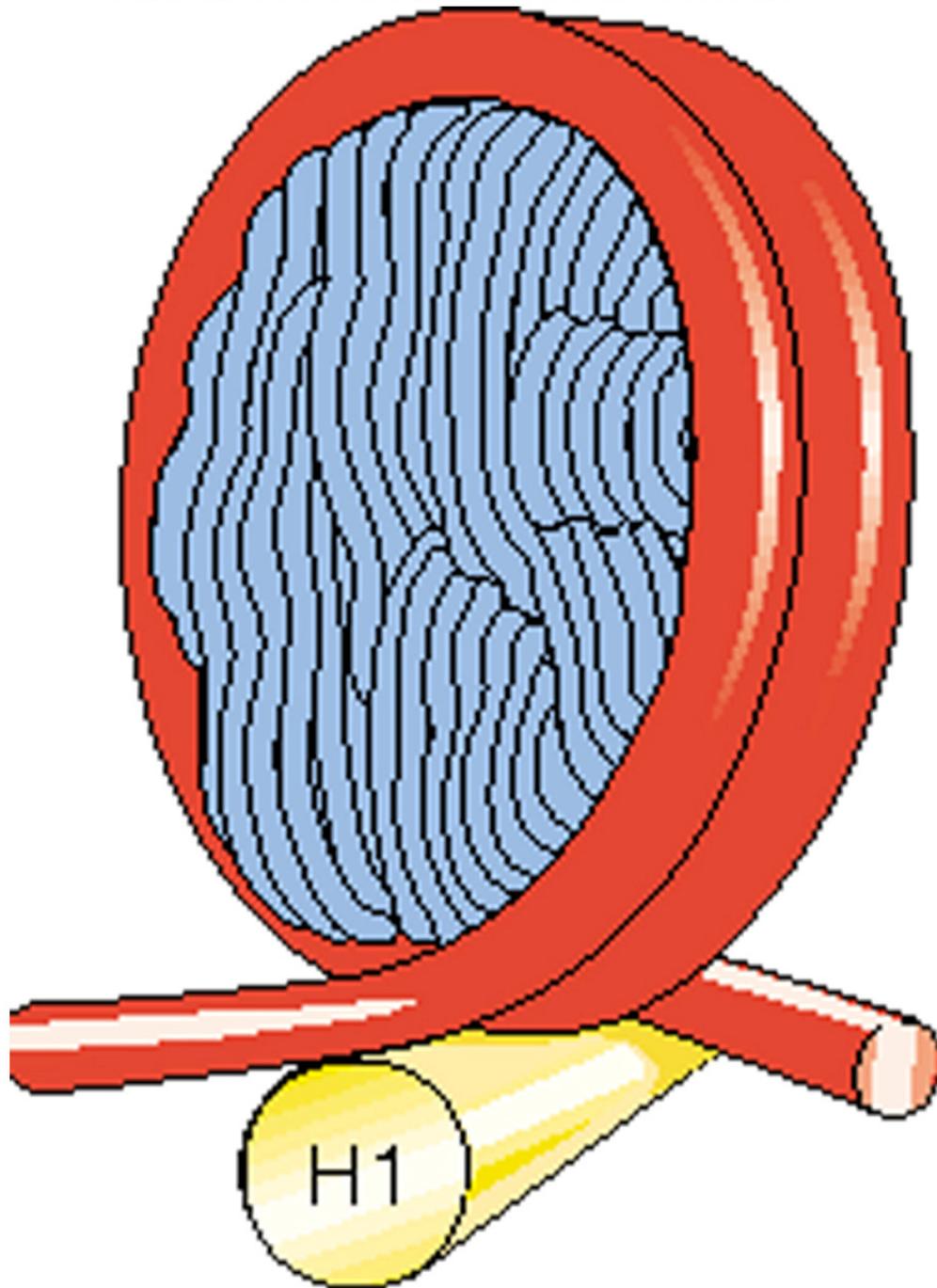


Proteine che legano fortemente il nucleosoma possono posizionarlo preferenzialmente in un sito

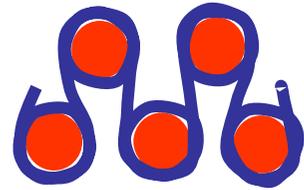
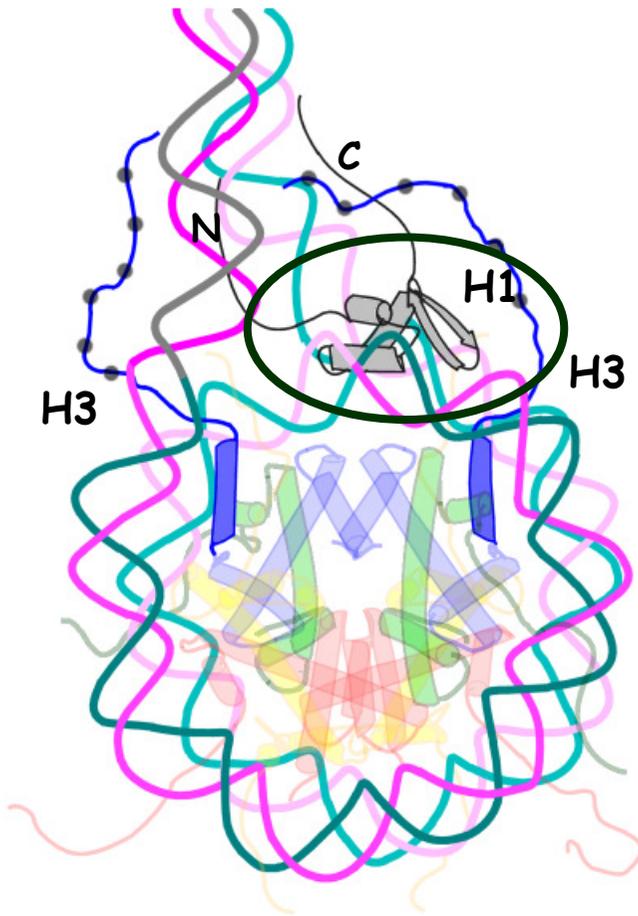
Secondo Livello: Fibra da 30nm



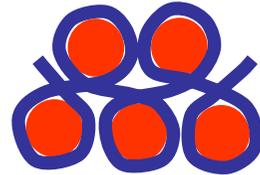
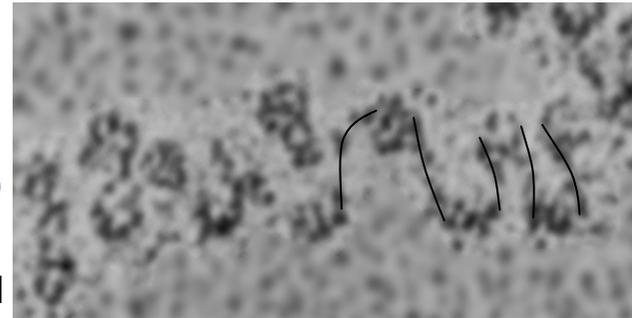
COME SI PASSA DALLA FIBRA DA 10nm ALLA FIBRA DA 30nm?



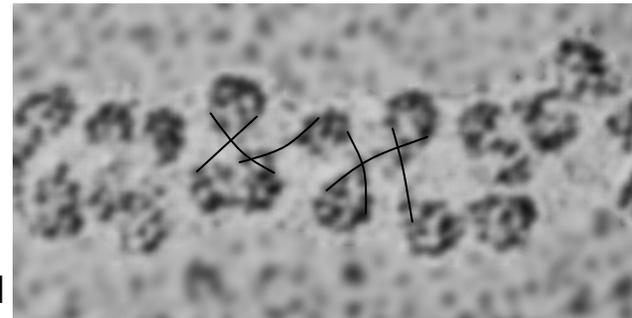
Cromatosoma



1 mM

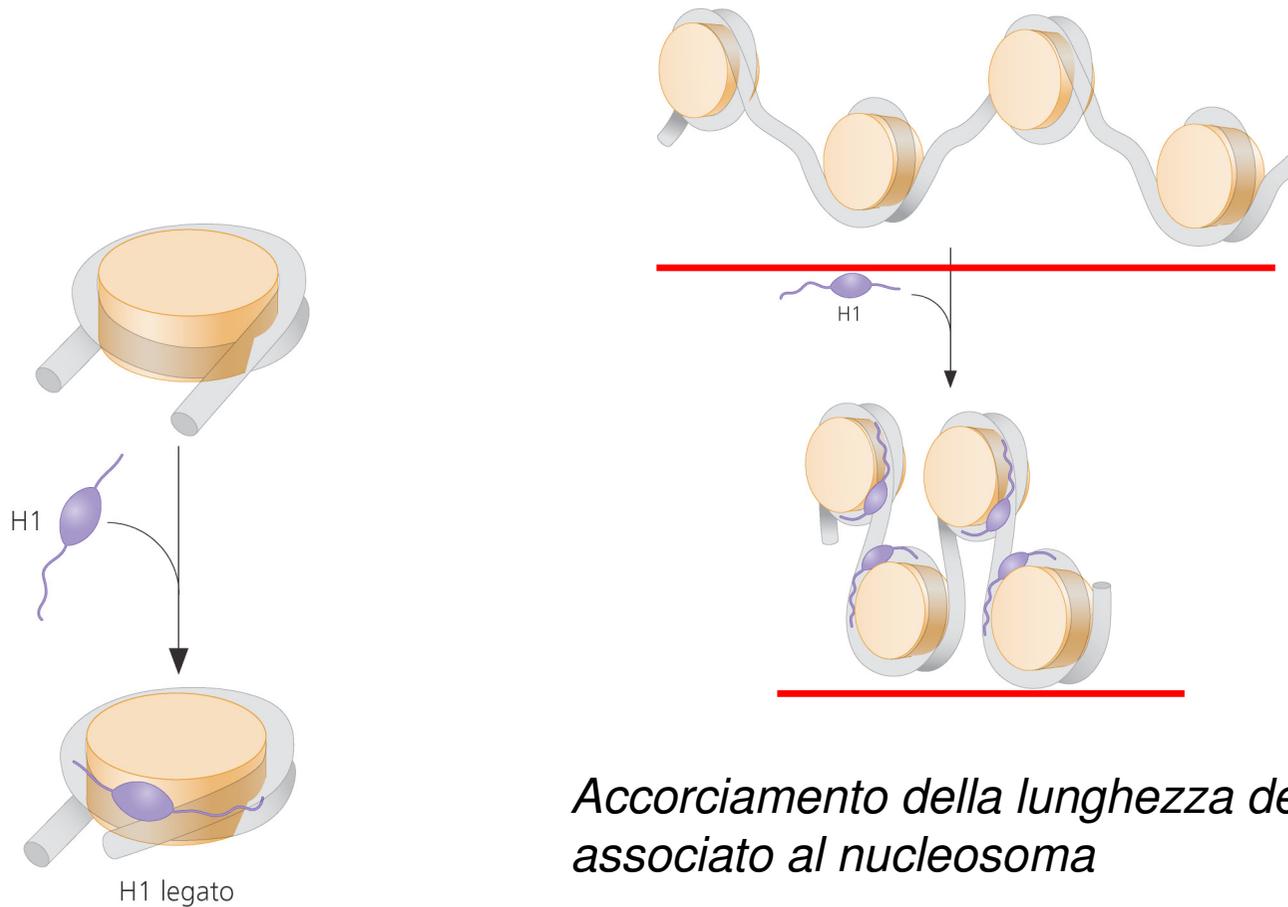


5 mM



Il complesso di un nucleosoma con l'istone H1 è chiamato "cromatosoma" e contiene 168bp di DNA + ottamero istonico + istone linker H1

L'istone linker verosimilmente dirige il posizionamento relativo di nucleosomi successivi e il profilo dei contatti nucleosoma-nucleosoma



Accorciamento della lunghezza del DNA associato al nucleosoma

*L'istone H1 è esterno al nucleosoma e lega il DNA nei punti di entrata e uscita
 La parte globulare lega sia un tratto di DNA linker che una porzione centrale associata al core istonico.
 L'istone H1 contribuisce anche alla formazione delle strutture di ordine superiore:
 la fibra da 30 nm.*

Structure of the '30 nm' chromatin fibre: A key role for the linker histone

Philip JJ Robinson and Daniela Rhodes

Current Opinion in Structural Biology 2006, 16:336-343

X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre

Thomas Schalch¹, Sylwia Duda¹, David F. Sargent¹ & Timothy J. Richmond¹

NATURE|Vol 436|7 July 2005

Emergono due possibili classi di modelli per la fibra da 30nm:

- 1) Elica solenoidale (tecnicamente definita one-start), in cui i nucleosomi sono avvolti in maniera lineare.

Evidenze a favore di questo modello:

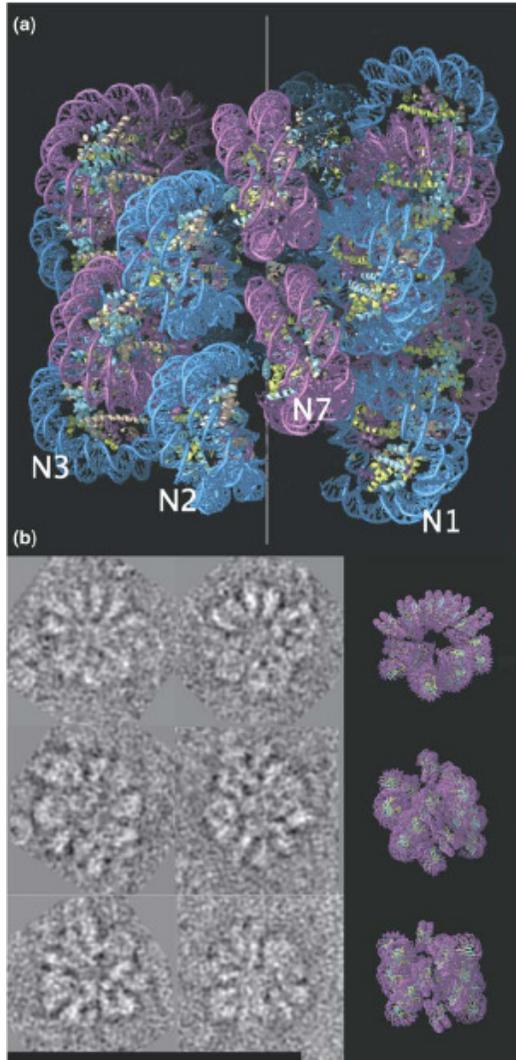
- a) Diametro invariante rispetto alla lunghezza del DNA linker
- b) Aumentato compattamento per fibre con 6 o più nucleosomi
- c) Necessità di un DNA linker superavvolto
(Robinson et al., 2006)

- 2) Nastro a zig-zag (definito two-start), in cui il nastro si piega e si superavvolge.

Evidenze a favore di questo modello:

- a) Variazione del diametro della fibra al variare del linker
- b) Percorso a zig-zag dei nucleosomi
- c) DNA linker non strettamente piegato
(Schalch et al., 2005)

One-start: modello solenoidale della fibra da 30nm

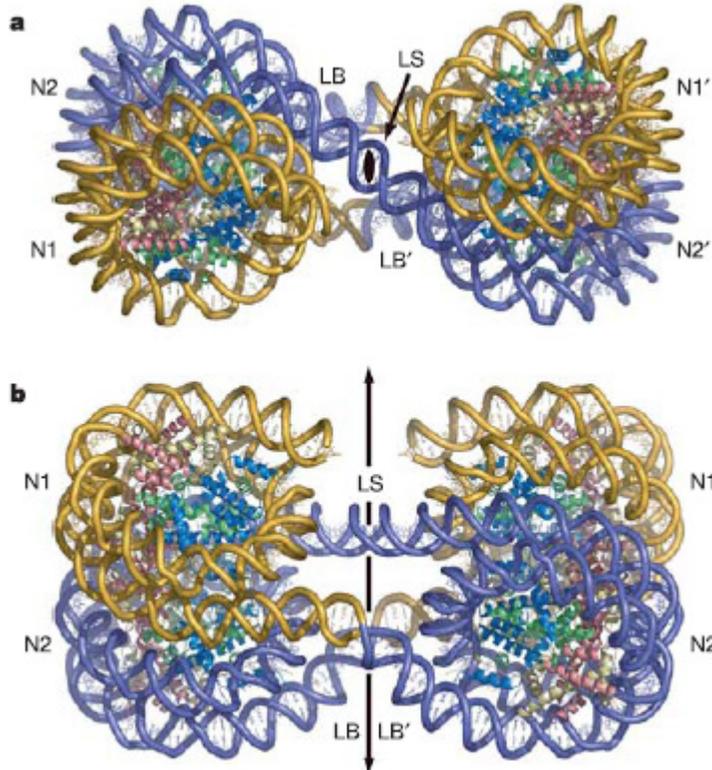


Polinucleosomi ricostituiti con lunghezze
variabili del DNA linker
Condizioni saline fisiologiche
Presenza dell'istone H1
Tecnica della microscopia elettronica

L'approccio non fornisce informazioni precise
sul percorso del DNA linker ma la costanza
delle dimensioni suggerisce che esso sia
ripiegato all'interno della fibra in maniera
continua e regolare.

La compattazione è migliore in presenza
dell'istone linker

Two-start helix: modello a zig-zag della fibra da 30nm



Tetranucleosoma ricostituito analizzato con la diffrazione alla risoluzione di 9Å

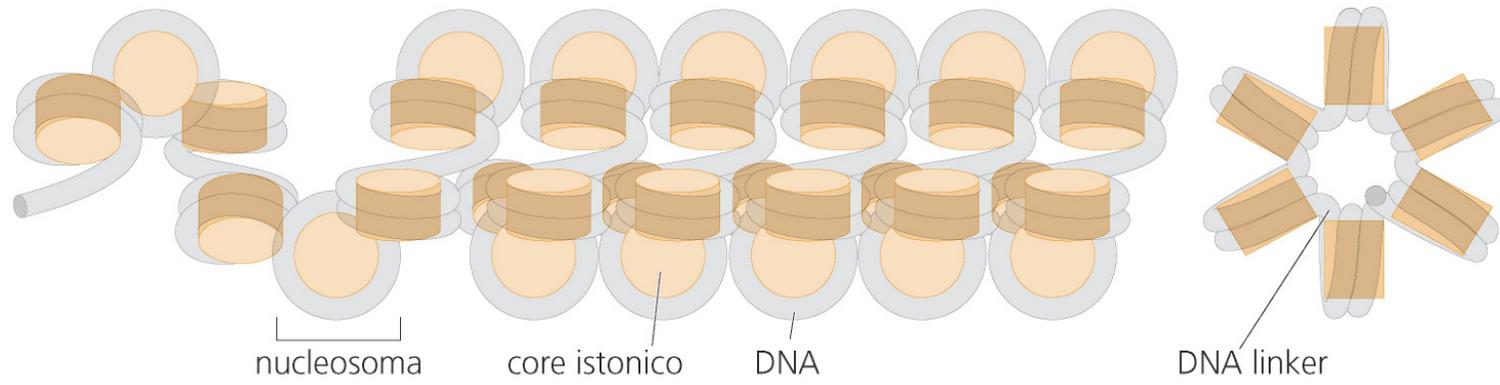
LS: linker dritto
LB: linker piegato

La presenza di due differenti conformazioni del linker suggerisce che il dinucleosoma possa rappresentare meglio l'unità ripetitiva della struttura di ordine superiore

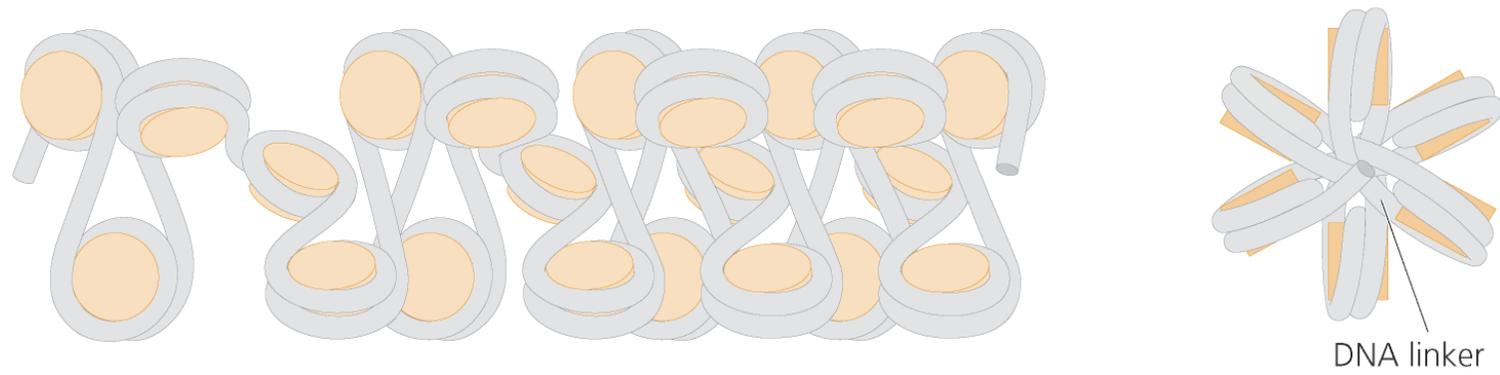
Le analisi su questa struttura favoriscono il modello a zig-zag per il DNA linker.

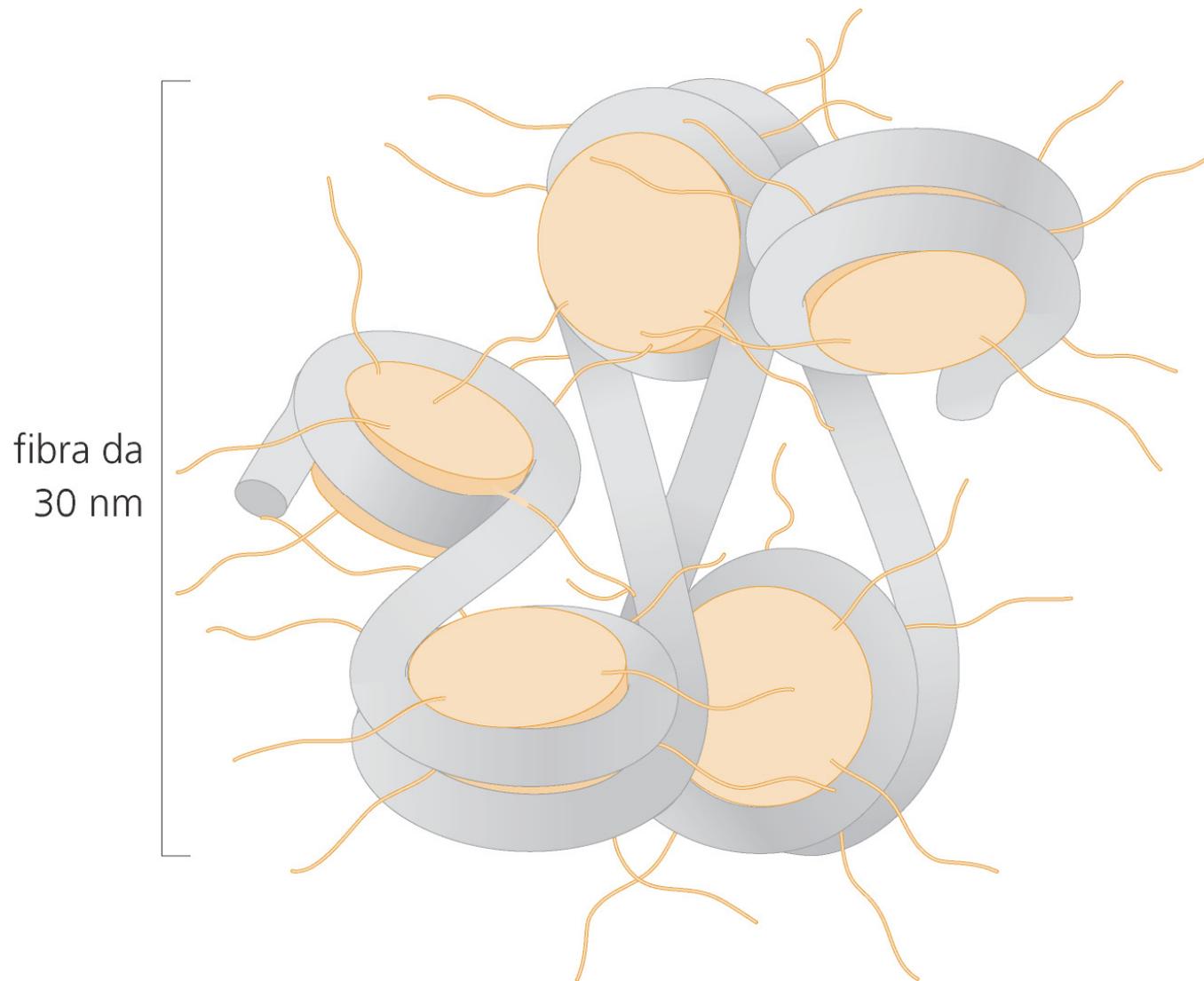
Non definisce chiaramente il ruolo dell'istone linker.

a solenoide



b zigzag





Stabilizzazione della fibra da 30nm attraverso le code istoniche N-terminali

Molecule of the Month by David S. Goodsell

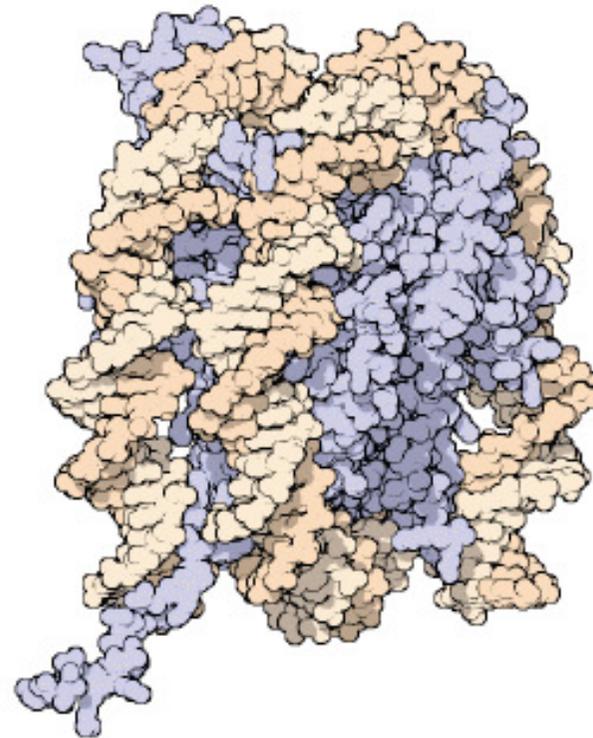
A Paradox

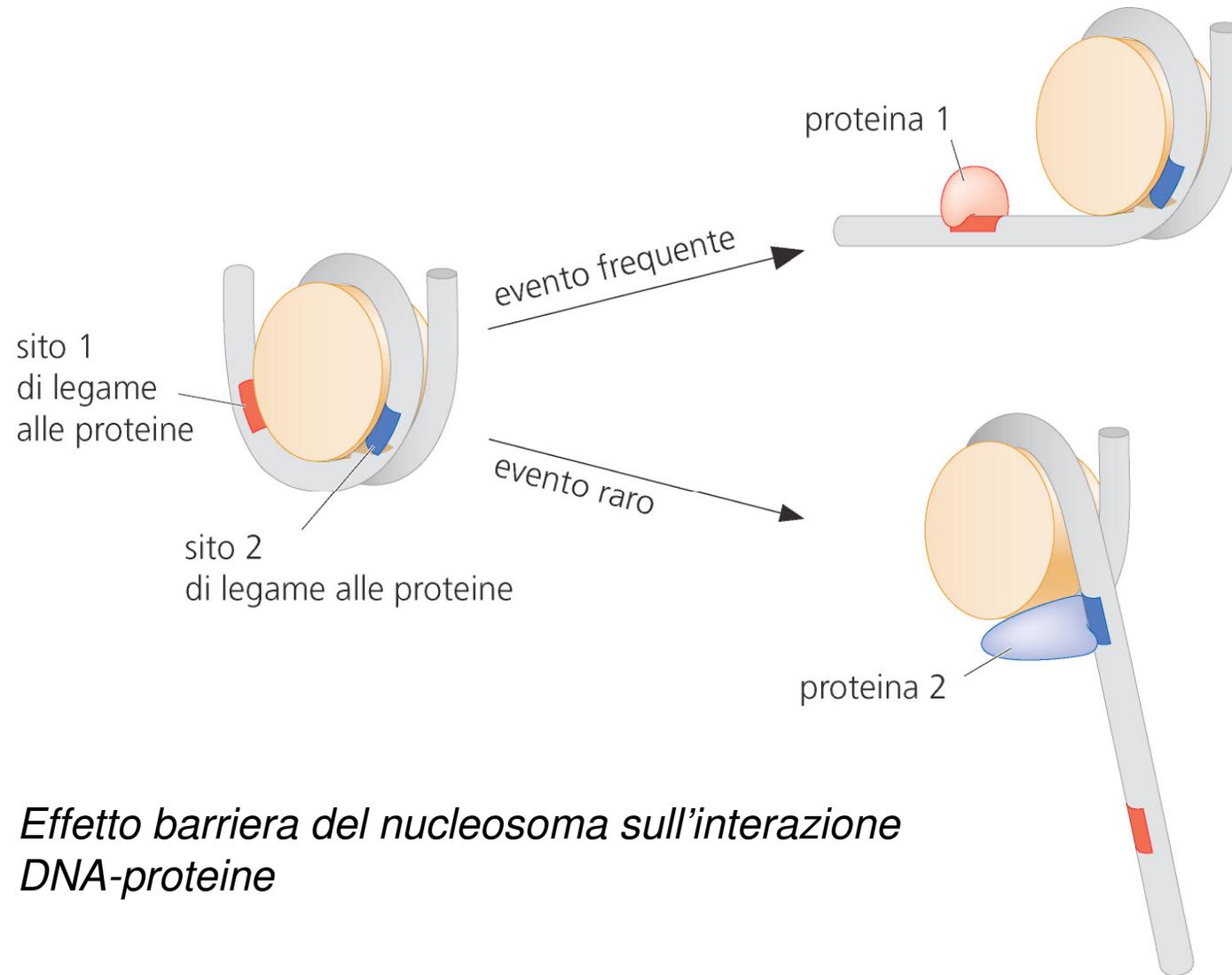
The nucleosome must perform two opposite functions simultaneously.

Nucleosomes must be stable compact structures that protect DNA.

Nucleosomes must allow access to the information in the DNA.

- **DNA Polymerases must gain access to replicate the DNA when the cell divides.**
- **RNA Polymerase must transcribe messenger RNA**

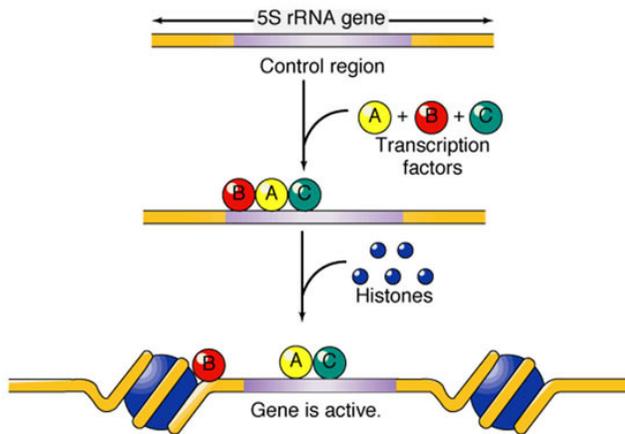




Esiste un meccanismo di competizione tra la formazione del nucleosoma e l'attacco di proteine che legano il DNA

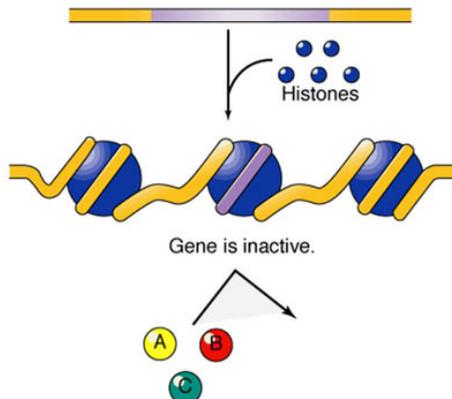
Copyright © The McGraw-Hill Companies, Inc. Permission required for reproduction or display.

(a) Transcription factors win:



*DNA 5S + TFIIIA = Trascrizione
Istoni aggiunti dopo NON formano il nucleosoma*

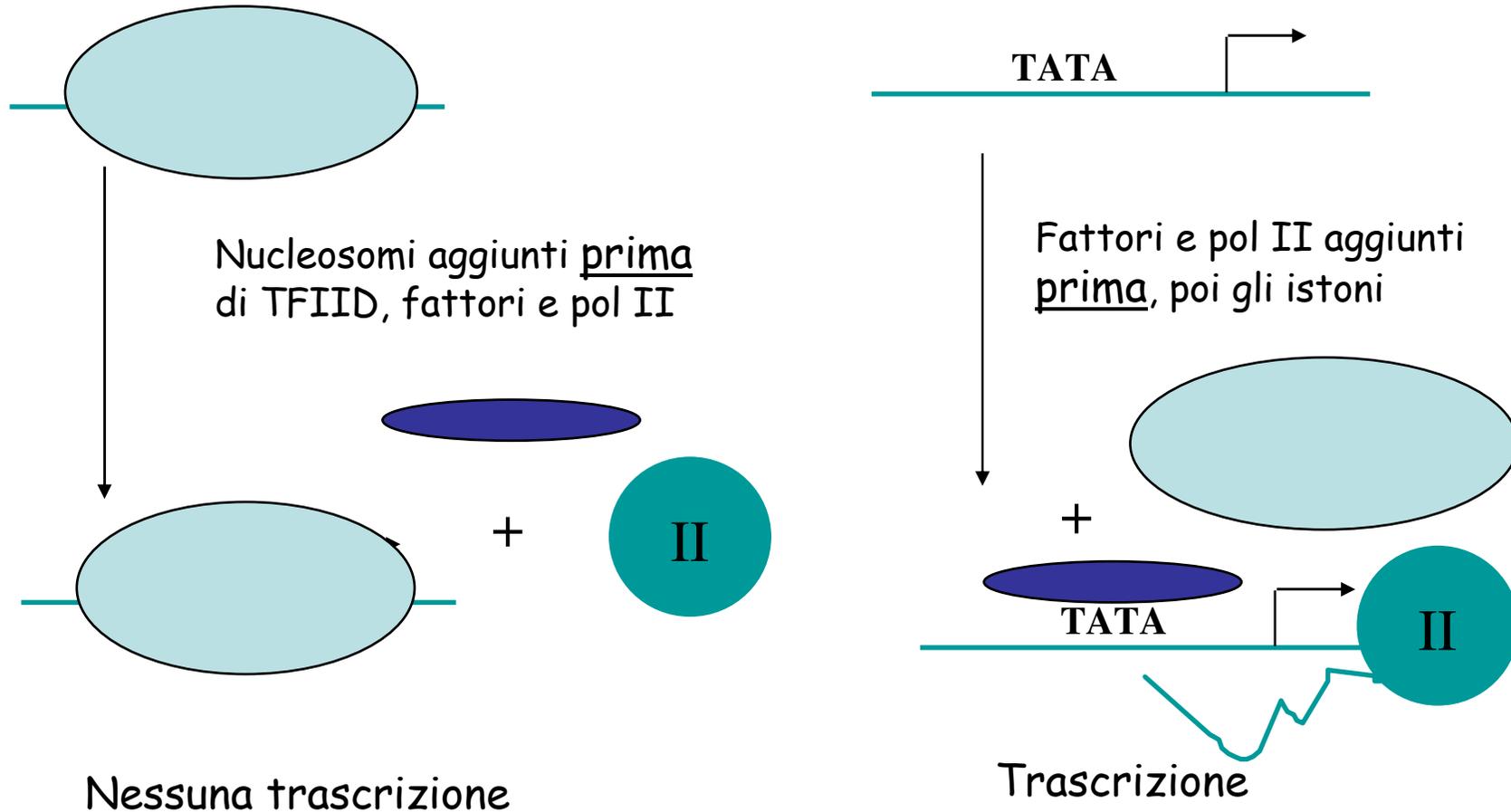
(b) Histones win:



*DNA 5S + istoni = formazione del nucleosoma
TFIIIA aggiunto dopo = Niente trascrizione*

Il Nucleosoma può bloccare l'accesso all'apparato trascrizionale

Esperimenti di Roeder mostrano che il nucleosoma può bloccare TBP, fattori e polimerasi II. DNA usato è quello di Adenovirus.



Questo può avvenire in seguito alla replicazione

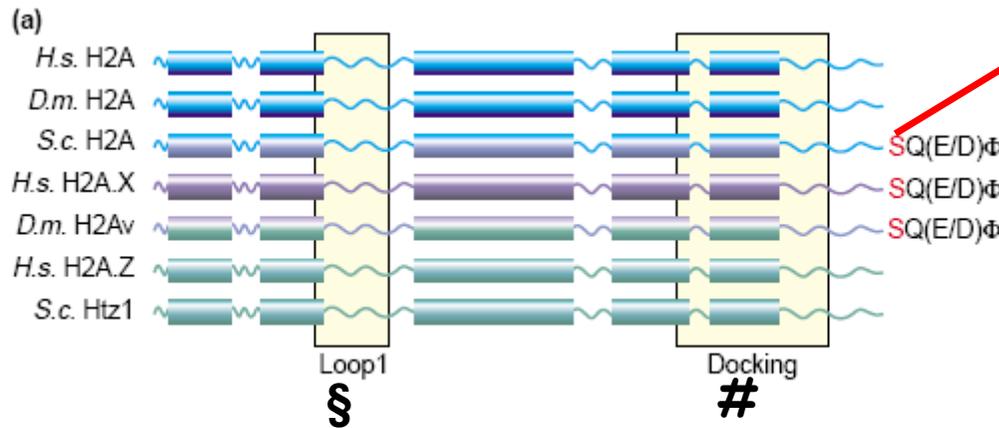
Dinamicità della cromatina

Nonostante la stabilità del nucleosoma e dell'alto grado di compattezza nel nucleo la cromatina è sorprendentemente dinamica.

Esistono vari modi di modificare la cromatina e rispondere alle necessità della cellula di regolare i processi biologici dall'espressione genica, alla riparazione del DNA, alla replicazione e ricombinazione.

- 1) **Uso di varianti istoniche, in particolare varianti di H2A e H3.**
- 2) **Modificazioni epigenetiche degli istoni: acetilazione, metilazione ed altre.**
- 3) **Uso di sistemi di rimodellamento che cambiano la stabilità e/o la posizione del nucleosoma.**

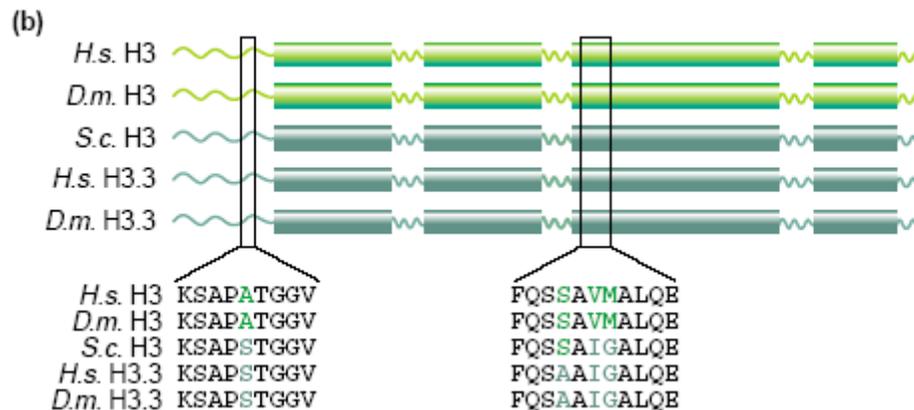
VARIANTI ISTONICHE



S viene fosforilata in seguito a danni al DNA

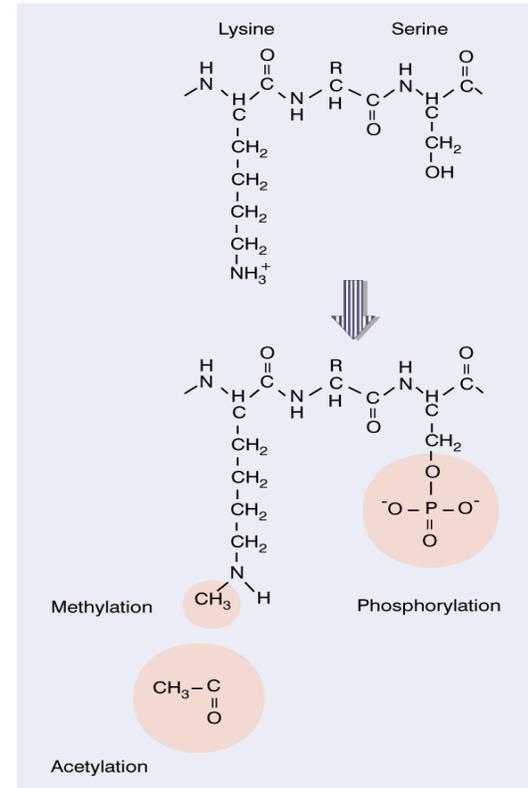
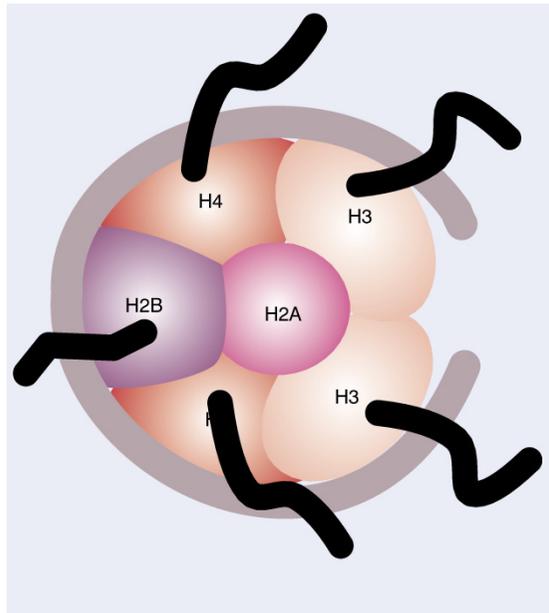
§: differenze in questo loop prevengono l'assemblaggio di un nuc. contenente H2A e H2A.Z

#: questo dominio contatta (H3-H4)₂ e variazioni qui influenzano la stabilità del nucleosoma.

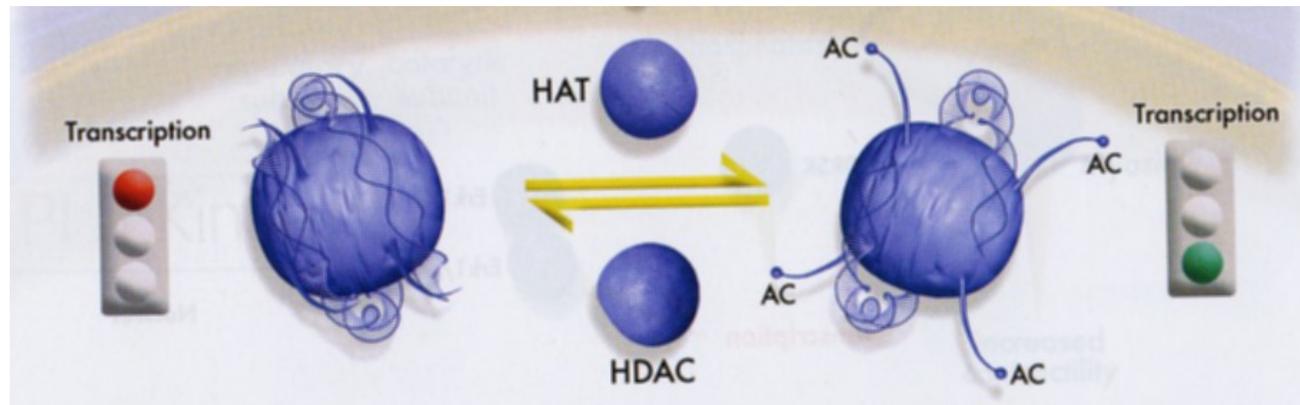
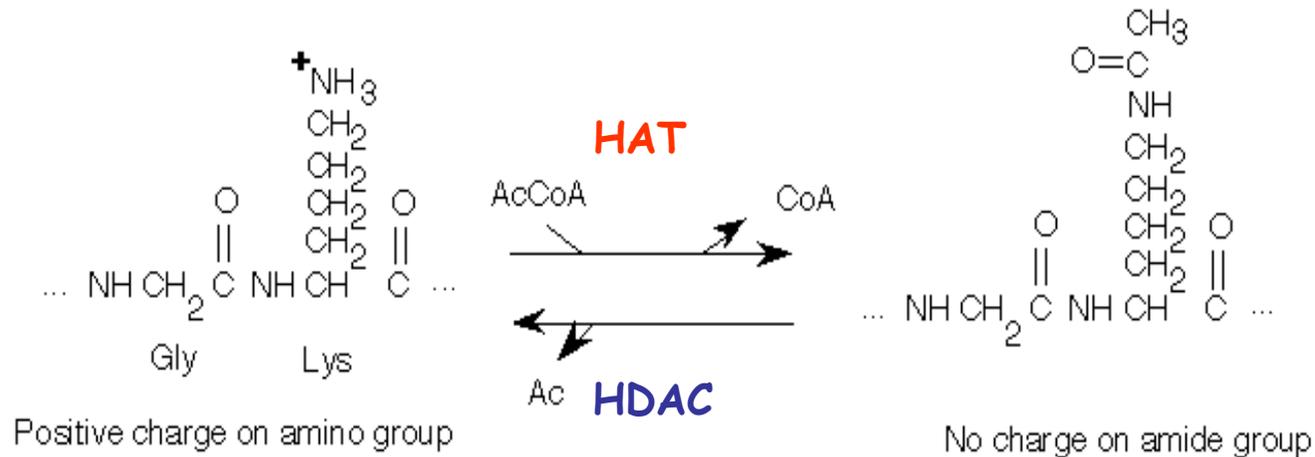


Le varianti istoniche sono coinvolte in vari processi, sia nella espressione genica, sia nella riparazione del DNA, sia nella definizione di strutture eterocromatiche.

Modificazioni delle code Istoniche N-terminali

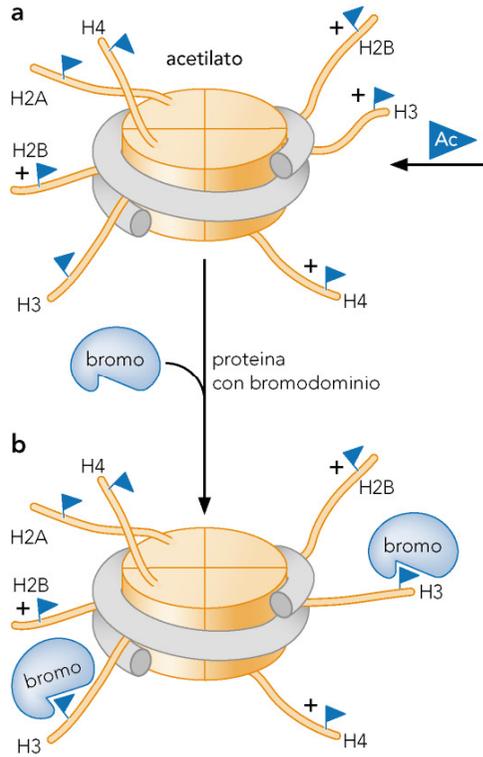


RUOLO DELL'ACETILAZIONE ISTONICA

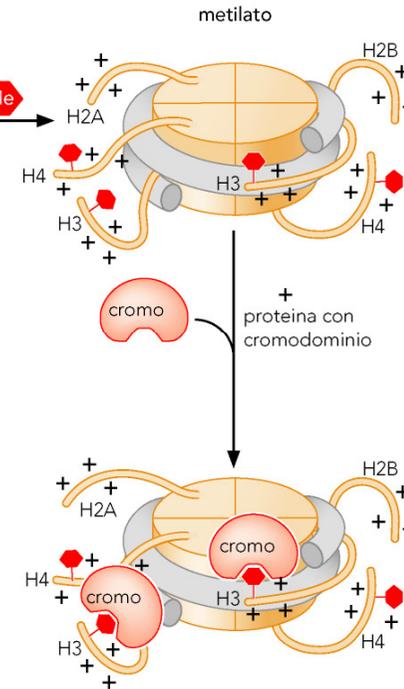


- Decondensa la fibra da 30nm
- Favorisce l'accesso dei fattori di trascrizione sulla cromatina
- Agisce come segnale per il legame di proteine non istoniche

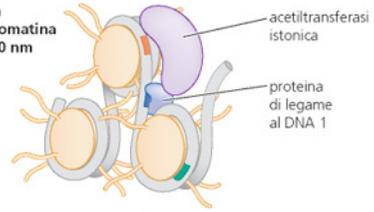
Residui acetilati
interagiscono con
il Bromodominio



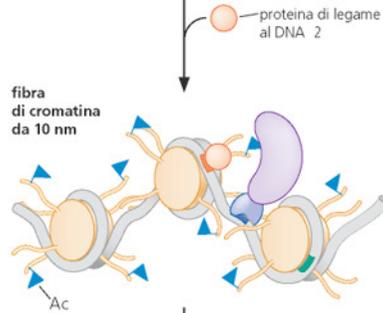
Residui metilati
interagiscono con
il Cromodominio



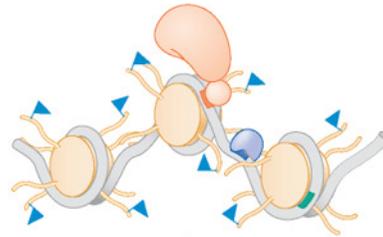
fibra di cromatina da 30 nm



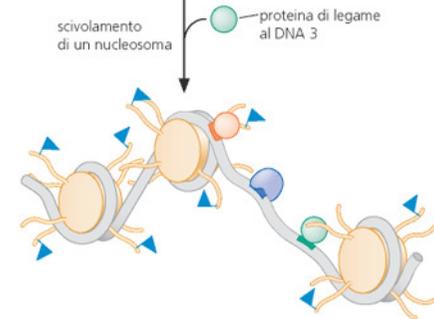
fibra di cromatina da 10 nm



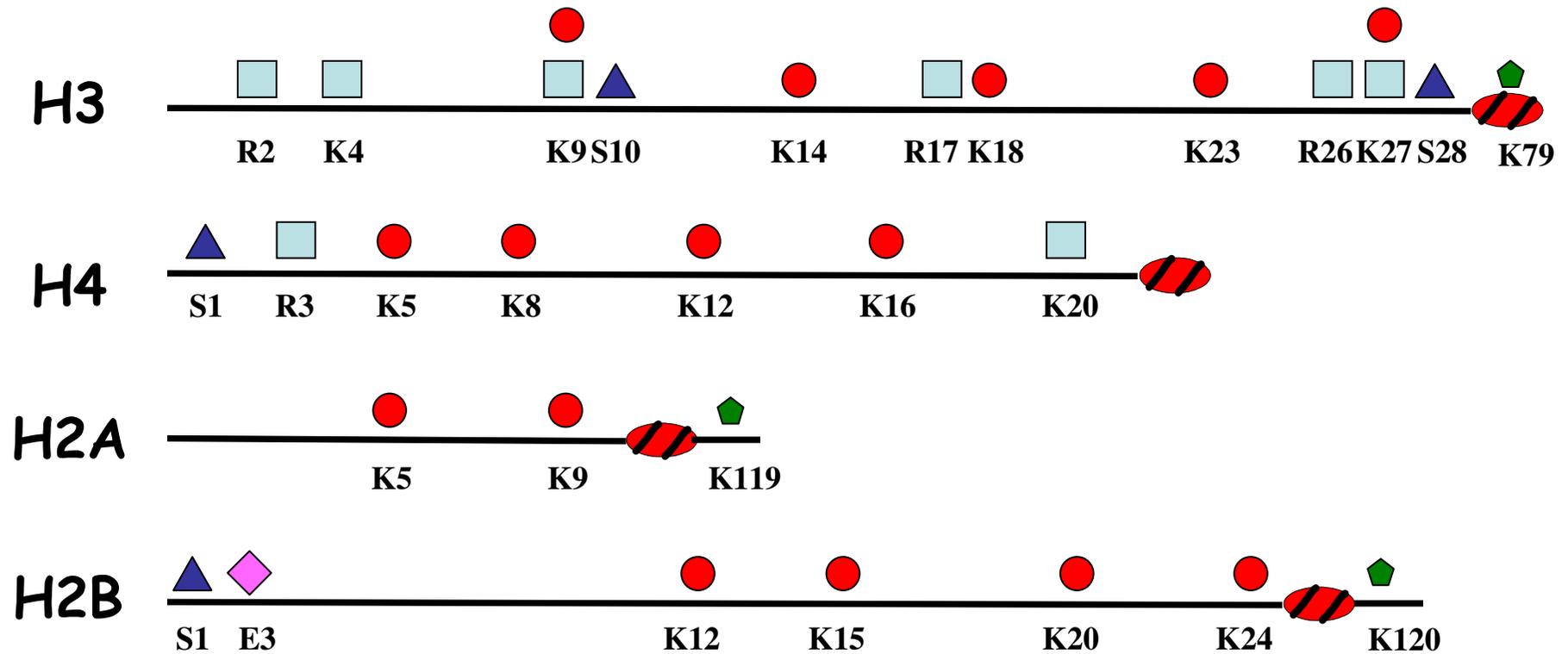
la proteina di legame al DNA 2 recluta il complesso di rimodellamento dei nucleosomi



scivolamento di un nucleosoma



Modificazioni covalenti delle code ammino-terminali



- Metilazione
- Acetilazione
- ▲ Fosforilazione
- ◆ Poly-ADP ribosilazione
- ◆ Ubiquitinazione

IL CODICE ISTONICO

Quasi sempre le modificazioni istoniche sono evidenziabili in combinazione.

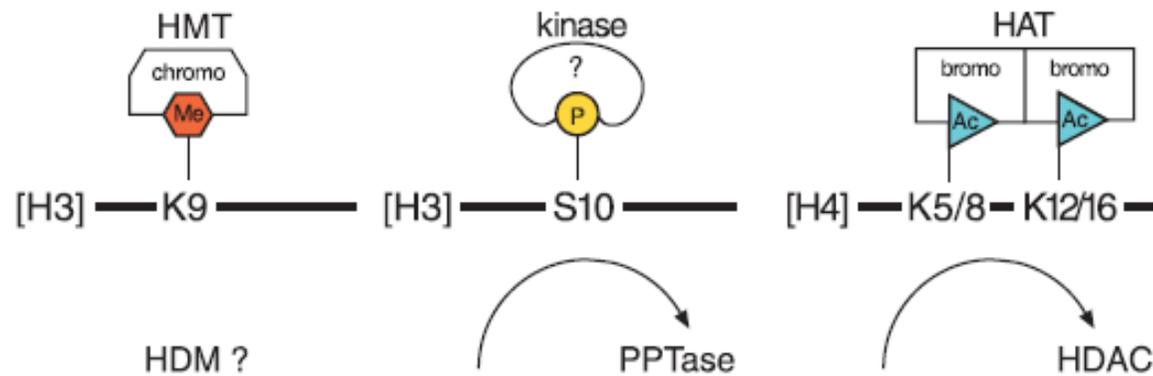
La natura combinatoriale delle modificazioni istoniche rivela l'esistenza di una sorta di **CODICE ISTONICO** ("histone code") che impone le caratteristiche regolative di un gene, estendendo l'informazione potenziale del codice genetico.

Questi **stati epigenetici** devono essere stabiliti, mantenuti ed ereditati attraverso mitosi e meiosi (**MEMORIA CELLULARE**).

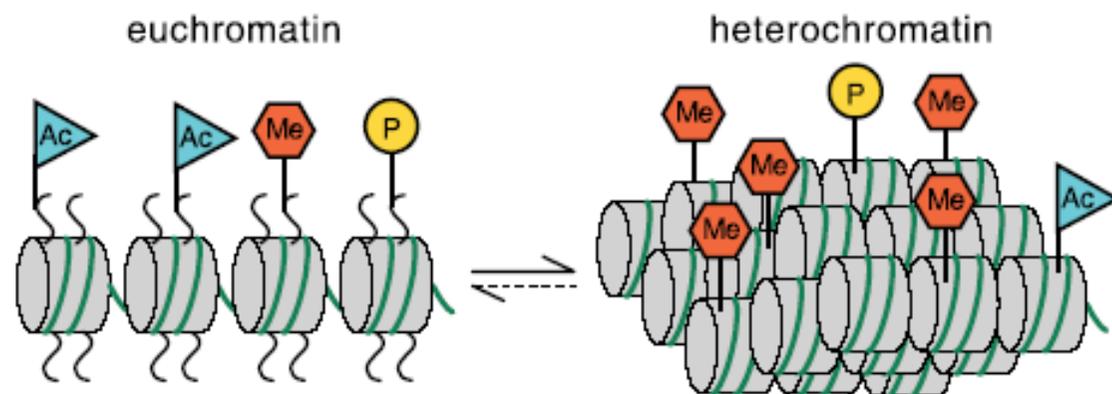
Il fenotipo è però sempre **VARIEGATO**, poiché possono avvenire repentini cambiamenti di stato.

Le regole del codice istonico

- Modificazioni sullo stesso e/o su differenti istoni possono essere interdipendenti e generare varie combinazioni su qualunque nucleosoma
- Distinte modificazioni delle code istoniche inducono interazioni con diverse proteine associate alla cromatina:



- Diversi tipi di struttura di ordine superiore dipendono dalla concentrazione locale e dalla combinazione di nucleosomi modificati differenzialmente



In pratica le modificazioni istoniche servono a definire particolari stati della cromatina.