

VIAGGIO AL CENTRO DELLA CELLULA¹

ANNA MARIA ROSSI

Dipartimento di Biologia, Università di Pisa, Unità di Genetica

Per tutti gli organismi viventi la cellula rappresenta l'unità fondamentale, tanto che in molti casi può costituire da sola un organismo autonomo. La membrana della cellula regola principalmente gli scambi con l'esterno e all'interno di essa troviamo il citoplasma, contenente un insieme di organelli che contribuiscono in vario modo allo svolgimento delle funzioni proprie della cellula. Al centro il nucleo: è qui che si trova il materiale ereditario ed è qui che viene custodita l'informazione genetica, trasmessa da una generazione all'altra di organismi unicellulari, come di quelli multicellulari. È questa la meta del viaggio che ci accingiamo a fare e che è stato reso possibile dallo sviluppo di dispositivi tecnologici molto sofisticati, tali da ottenere immagini ingrandite di oggetti 'microscopici' come le cellule, ma anche di strutture più piccole delle dimensioni di pochi nanometri (nm) come le macromolecole cellulari.²

Tranne rare eccezioni, ogni cellula è dotata di materiale ereditario, nella maggior parte dei casi uguale a quello di tutte le cellule dell'organismo, a partire dalla prima cellula che gli ha dato origine.³ Fin dal primo momento e per tutto l'arco della vita di un organismo, il patrimonio genetico ha un'importanza fondamentale. In particolare, nel DNA sono contenute, in forma codificata, le istruzioni per la sintesi dei principali componenti cellulari – RNA e proteine – che provvedono a organizzare e coordinare una grande varietà di processi fondamentali per la vita della cellula e per realizzare le caratteristiche specifiche di ciascun tipo cellulare sia dell'individuo sia della specie cui esso appartiene.⁴

La decodificazione dell'informazione contenuta nel patrimonio genetico inizia ge-

1 Lezione tenuta a Fucecchio (Pr. di Firenze) l'8 novembre 2011, presso l'ISIS A. Checchi, e a Pisa il 21 novembre 2011, presso l'Istituto Santoni Gambacorti, nell'ambito dell'edizione 2011 di *Pianeta Galileo*.

2 I primi strumenti che potremmo definire come antenati dei microscopi di tipo ottico vennero prodotti intorno alla fine del XVI secolo. Le cellule furono descritte da Robert Hooke già nel 1665, ma solo verso il 1830 – dopo il perfezionamento delle lenti, in particolare la correzione dell'aberrazione cromatica – fu possibile descrivere la struttura interna delle cellule al microscopio. Oggi esistono strumenti molto sofisticati, che hanno un potere di risoluzione migliaia di volte superiore.

3 Fu Rudolf Virchow nel 1858 a concludere che ogni cellula nasce da un'altra cellula preesistente: «*Omnis cellula e cellula*».

4 Con l'aumentare del numero, le cellule di un organismo in genere si differenziano per forma, grandezza, rapporti e funzioni specializzate, fino alla costituzione di tessuti e organi.

neralmente con un processo di trascrizione in cui viene prodotta una copia parziale del DNA in una molecola di RNA, la quale può svolgere diverse funzioni, tra le quali quella di andare incontro a un processo di traduzione, cioè di conversione in una sequenza di amminoacidi che andranno a costituire una proteina. In ciascun momento della vita cellulare – a seconda delle necessità e di specifici segnali intra e intercellulari – ciascun tratto di DNA può essere inattivo oppure trascritto in un RNA (ed eventualmente tradotto in una proteina).

Le caratteristiche di un organismo (fenotipo) dipendono dalle caratteristiche delle sue cellule, le quali dipendono dall'insieme delle molecole che le costituiscono e che a loro volta sono il risultato delle complesse interazioni dinamiche del patrimonio genetico (genotipo) con miriadi di fattori endogeni ed esogeni. Questo implica che non c'è un solo modo in cui l'informazione contenuta nel patrimonio genetico si può realizzare... anzi si può dire che ci sono infiniti 'universi paralleli' possibili. Ogni cellula può utilizzare lo stesso patrimonio genetico in modi e tempi diversi, in relazione a molti fattori anche esterni all'organismo, e ciascuna cellula ha una sua identità biochimica propria, diversa da quella delle altre cellule dell'organismo e capace di cambiare da un istante al successivo.

Il patrimonio genetico contenuto nel nucleo cellulare svolge due funzioni distinte:

- trasmissione dell'informazione alle generazioni successive;
- attuazione dell'informazione in esso contenuta in forma codificata.

1. Trasmissione dell'informazione contenuta nel patrimonio genetico alle successive generazioni cellulari

Questa funzione viene assolta ciclicamente dalla cellula ogni volta che si prepara a duplicarsi. Durante il ciclo cellulare, nel nucleo avviene una replicazione molto accurata del materiale genetico che deve poi essere ripartito in modo molto preciso e controllato tra le due cellule figlie generate dalla divisione cellulare nel processo detto "mitosi". Delle diverse fasi che la cellula attraversa durante la divisione mitotica abbiamo numerose immagini ottenute con il microscopio ottico già a partire dal 1882. Queste immagini ci permettono di ricostruire le diverse fasi del processo, le quali, per la loro delicatezza, richiedono una precisa organizzazione spaziale del materiale genetico, che generalmente si presenta suddiviso in un certo numero di cromosomi formati da complessi di proteine e DNA in stretto contatto fisico.⁵

Per esempio, nella cellula umana ci sono 46 cromosomi e l'intera sequenza del DNA è costituita da 3 miliardi di nucleotidi (o coppie di basi azotate), che sono i costituenti primari della molecola. Se si distendesse l'intero patrimonio genetico di una cellula si avrebbe un filo del diametro di 2nm e della lunghezza di 2m. Tutto questo DNA deve essere organizzato all'interno di un nucleo che ha un diametro di 10-20 micron. Per

⁵ Nel 1892 August Weismann avanzò l'ipotesi che l'informazione genetica fosse conservata nei cromosomi.

dare un'idea, sarebbe come voler fare entrare 20 km di filo, sottile come quello di una ragnatela (Φ 20 micron), in un pallone da calcio (Φ 20 cm).

2. Le nostre cellule hanno una tale quantità di DNA che messa tutta insieme coprirebbe la distanza da qui al Sole e ritorno. Come è impacchettato tutto questo DNA in un minuscolo nucleo?

Come, in vista di un viaggio, si prepara il bagaglio e, più lo si sistema in modo preciso e ordinato, maggiore è la probabilità di poter ritrovare quel che ci serve senza dover tirare fuori tutto alla rinfusa, così il patrimonio genetico deve essere ben organizzato e compattato per poter essere ripartito correttamente tra le cellule figlie.

La nota struttura a doppia elica del DNA rappresenta solo il primo livello di un'architettura molecolare con numerosi livelli gerarchici interdipendenti. Il secondo livello è quello del nucleosoma: il DNA fa due avvolgimenti intorno a un ottamero di proteine istoniche che costituiscono il nocciolo del nucleosoma (10 nm) e il complesso viene stabilizzato dall'istone H1. Questa molecola fa da ponte tra due nucleosomi consecutivi e promuove il riavvolgimento della cromatina in un solenoide che va a formare il livello gerarchico successivo: la fibra di 30 nm. Queste fibre si ripiegano a formare delle anse che si ancorano saldamente a un'impalcatura (*scaffold*) proteica raggiungendo un maggior grado di condensazione. Nel cromosoma al massimo grado di spiralizzazione il DNA è compattato oltre 10.000 volte rispetto alla doppia elica iniziale.

Queste strutture molecolari si possono osservare al microscopio elettronico a trasmissione e a scansione, i quali hanno messo in evidenza i diversi gradi di compattazione del cromosoma: il complesso DNA-proteine può essere sottoposto all'azione di enzimi che digeriscono le proteine e le rimuovono progressivamente. Se il processo è portato fino in fondo, il DNA sarà liberato del tutto dalle strutture proteiche che lo ricoprono [6].

3. Attuazione dell'informazione contenuta nel patrimonio genetico in forma codificata

Molto più recente, rispetto alle immagini al microscopio ottico, che permettono di ricostruire le fasi della divisione mitotica, e di quelle al microscopio elettronico, che permettono di vedere i vari stadi di impacchettamento del DNA nei cromosomi, è la delineazione di una mappa del contenuto del nucleo in interfase, cioè nello stato in cui il patrimonio genetico non è al massimo di compattazione per essere ripartito tra le cellule figlie, ma nel pieno della sua attività di attuazione dell'informazione in esso contenuta.

Sono stati utilizzati metodi innovativi, come la microscopia a fluorescenza, in cui si usano tecnologie basate sull'ibridazione *in situ* tra acidi nucleici (DNA-DNA oppure RNA-DNA) e sull'immunofluorescenza con anticorpi monoclonali prodotti per specifici epitopi di proteine e altri componenti nucleari. Una sonda specifica diretta verso un componente di interesse nel campione da analizzare – per esempio il DNA nel nucleo –

viene marcata, cioè, coniugata, con una molecola fluorescente detta fluoroforo. Questa molecola, eccitata con un fascio di luce a una specifica lunghezza d'onda, emette a lunghezze d'onda maggiori (quindi di colore diverso dalla luce assorbita). L'osservazione del campione al microscopio a fluorescenza rileverà la posizione del componente di interesse in base alla posizione della sonda fluorescente che lo ha intercettato [5].

Grazie a queste metodologie è stata ampiamente rivista la funzione della cromatina, dapprima considerata fondamentale solo per l'impacchettamento del materiale genetico per la divisione cellulare. Oggi si considera in realtà che la cromatina svolga anche importanti funzioni di controllo dell'attività dei geni. La tradizionale divisione tra eucromatina (ben colorata) ed eterocromatina (meno uniformemente colorata) tracciata dai citologi del secolo scorso ha lasciato spazio a un concetto di struttura dinamica che si apre per rendere il DNA accessibile quando dev'essere trascritto e si richiude quando questo non è più necessario.

La condensazione della cromatina è quindi un fenomeno reversibile legato all'attivazione o alla repressione dell'attività di trascrizione dei geni. Il rimodellamento della cromatina dev'essere rapido e capace di rispondere a segnali di attivazione: i legami tra il DNA e le proteine istoniche devono essere allentati e la doppia elica deve srotolarsi per dare accesso al macchinario della trascrizione. I grossi complessi di trascrizione sono strutture assemblate e scomposte in modo molto specifico per ciascun tipo cellulare e contengono numerosi fattori proteici e altri componenti necessari al processo (fattori di trascrizione, RNA-polimerasi e ribonucleotidi).

Con le nuove tecnologie si è potuto accertare che ciascun cromosoma occupa nel nucleo interfascico un suo specifico "territorio", in cui la fibra di cromatina 'aperta' forma delle anse, come petali di margherita, intorno a centri stabilizzati da specifici complessi proteici detti "isolatori". Queste strutture sono ancorate alla periferia nucleare del proprio territorio dall'interazione con la lamina nucleare, anch'essa di natura proteica. Non si tratta in alcun modo di configurazioni statiche, non solo nel senso che la fibra di cromatina cambia continuamente stato di condensazione e di attività – cioè può essere aperta o chiusa – ma che può anche essere riposizionata nell'ambito del proprio territorio [1, 3].

I territori di cromosomi limitrofi sono parzialmente sovrapposti e le zone di sovrapposizione sono sede di un'intensa attività di scorrimento e di trascrizione del materiale genetico. Queste zone sono state denominate *transcription factory* (impianti di trascrizione): quando un gene deve essere trascritto, la corrispondente porzione del cromosoma si sposta verso una specifica area di trascrizione e quando deve essere silenziato se ne allontana. Nella stessa area è possibile trascrivere contemporaneamente circa 6-8 geni. In ciascuna *transcription factory* si raggruppano specifici complessi che creano 'ambienti' di trascrizione selettivi per gruppi di geni coordinati in risposta a specifici segnali di attivazione. In immagini ottenute con il microscopio confocale a scansione laser si può vedere come la trascrizione avvenga in diverse migliaia di *transcription factory* disperse nel nucleo.

La disposizione spaziale del genoma nel nucleo è quindi un fattore che ne regola l'attività, a seconda del tipo cellulare, per cui da una cellula all'altra e da uno stato all'altro della stessa cellula cambiano l'insieme di geni attivati o repressi e le posizioni reciproche delle regioni cromosomiche passanti dalle *transcription factory* alla periferia del nucleo e viceversa. Nel tempo cambiano quindi anche le interazioni spaziali tra i cromosomi che occupano territori adiacenti.

Il gruppo di Sandra Goetze e dei suoi collaboratori ha usato una tecnica di ibridazione *in situ* a 3D per marcare con due traccianti fluorescenti le regioni di cromatina del solo cromosoma 1 in otto cellule della stessa coltura *in vitro*. Le regioni di cromatina aperta (attiva) erano marcate in verde e quelle di cromatina addensata (inattiva) in rosso. Essi hanno potuto osservare che i due tipi di cromatina cambiano forma e dimensioni da cellula a cellula, ma rimangono sempre confinate in un unico territorio [2].

Con metodi analoghi è stato possibile mappare anche le regioni in cui avvengono altri processi, come quelli riguardanti la replicazione del DNA o la riparazione del materiale genetico danneggiato – che pure sono compartimentalizzati come la trascrizione – per cui possiamo parlare di *replication factory* o di *repair factory*, rispettivamente di impianti di replicazione o di riparazione. La natura di tali impianti è anche molto dinamica: questi si assemblano intorno a un sito di inizio, persistono alcuni minuti, si scompongono e si riformano immediatamente a un sito adiacente, assicurando che la replicazione o la riparazione proceda in modo ordinato [4, 7, 8].

Anche la maturazione dell'RNA trascritto avviene in specifiche aree critiche dove vengono concentrati i componenti cellulari necessari per questo processo, il quale precede la fase di traduzione dell'RNA messaggero che avviene al di fuori del nucleo.

In conclusione possiamo dire che la cromatina nelle sue forme più o meno condensate:

- assicura l'organizzazione spaziale del DNA nel nucleo e la corretta segregazione dei cromosomi durante la divisione cellulare;
- controlla l'accessibilità del DNA per la replicazione, la riparazione e lo stato di attività o di inattività dei geni.

BIBLIO/SITOGRAFIA

- [1] Chakalova, L., Debrand, E., Mitchell, J. A., Osborne, C. S., Fraser, P., Replication and transcription: Shaping the landscape of the genome, *Nature Reviews Genetics*, 6, 2005, pp. 669-677.
- [2] Goetze, S., Mateos-Langerak, J., Van Driel, R. Three-dimensional genome organization in interphase and its relation to genome function, *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 18, 2007, pp. 707-14.
- [3] Lanctôt, C., Cheutin, T., Cremer, M., Cavalli, G., Cremer, T., Dynamic genome architecture in the nuclear space: Regulation of gene expression in three dimensions, *Nature Reviews Genetics*, 8, 2007, pp. 104-115.
- [4] Misteli, T., Beyond the sequence: Cellular organization of genome function, *Cell*, 128(4), 2007, pp. 787-800.
- [5] Vorsanova, S. G., Yurov, Y. B., Iourov, I. Y., Human interphase chromosomes: A review of available molecular cytogenetic technologies, *Molecular Cytogenetics*, 3, 2010, pp. 1-15.
- [6] http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/ecb/chromatin_packing.php
- [7] <http://www.cellnucleus.com>
- [8] <http://www.chromatin.us/chrom.html>