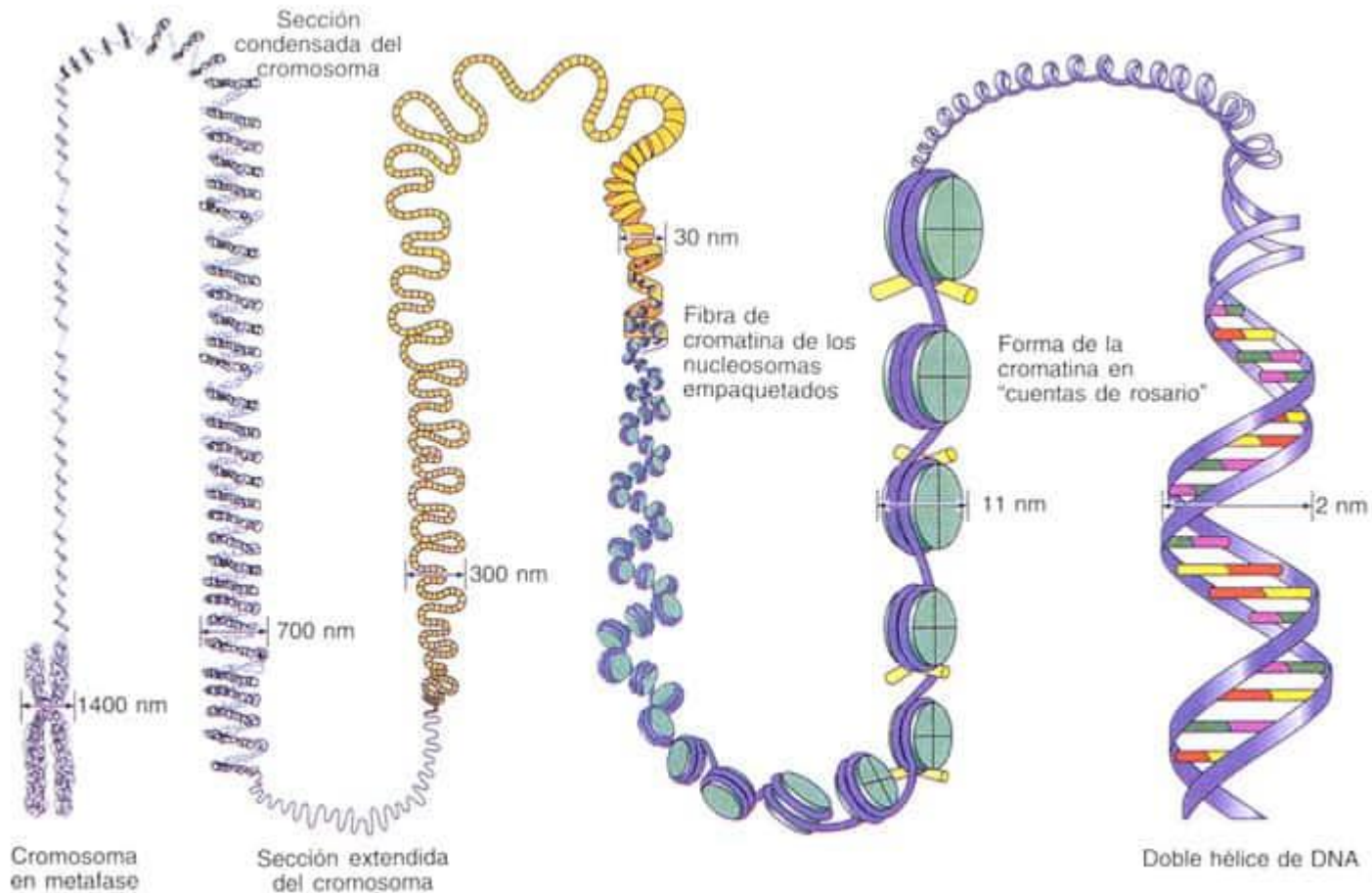
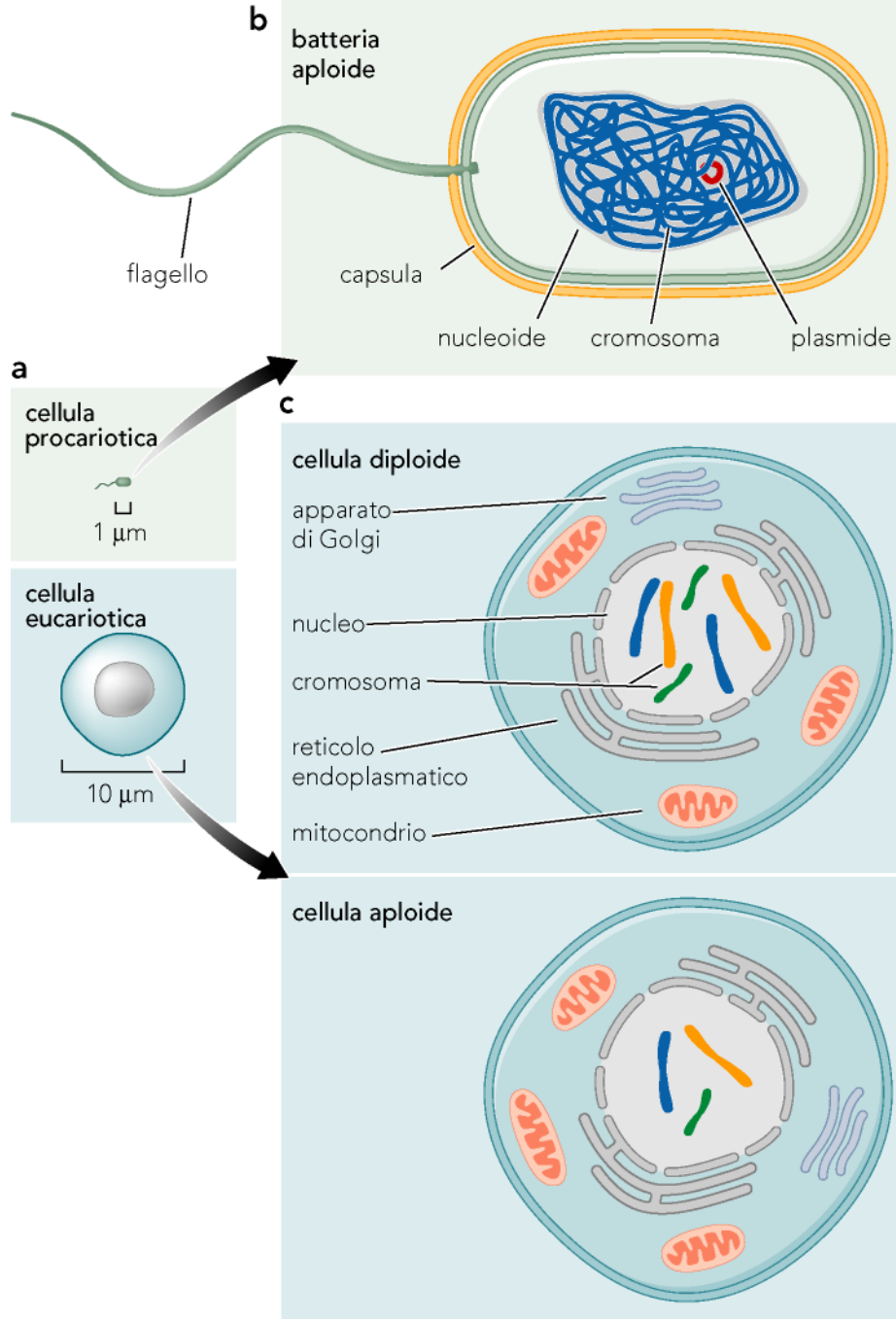


# Struttura della cromatina= struttura quaternaria del DNA





## Confronto fra cellula eucariotica e procariotica

I procarioti hanno una copia unica del/dei cromosoma/i, organizzata in una struttura detta **nucleoide**.

Spesso contengono una o più molecole di DNA piccole e circolari, dette **plasmidi**, che portano geni non essenziali.

La maggior parte delle cellule eucariotiche è diploide (coppie di cromosomi omologhi, ognuno da un genitore, nel nucleo).

Le cellule coinvolte nella riproduzione sessuale (gameti) sono aploidi (una sola copia di ciascun cromosoma), altre sono poliploidi (più copie, fino a migliaia).

**Nell'uomo sono tetraploidi (92 cromosomi) le cellule del fegato**

**I megacariociti hanno in media 128 copie di ciascun cromosoma, producono migliaia di piastrine, prive di cromosomi, componenti essenziali del sangue (fino a 200.000/ml).**

# Compattamento del DNA nei cromosomi

**Il DNA cellulare e virale è associato a proteine in complessi detti cromosomi.**

Il compattamento è essenziale per vari motivi:

- a) contenimento nel ristretto spazio cellulare (o virale)
- b) protezione da possibili danni
- c) maggiore stabilità per una corretta espressione dell'informazione
- d) efficiente trasmissione alle cellule figlie
- e) organizzazione strutturale di ordine superiore, che facilita l'espressione genica e la ricombinazione omologa, che genera la diversità individuale.

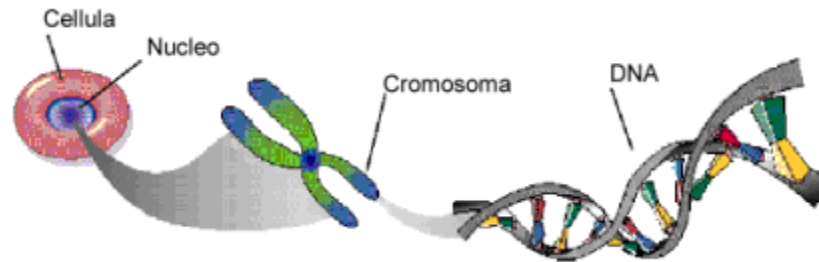
**Cromosoma eucariotico: metà DNA e metà proteine**, la maggior parte sono istoni (**cromatina**). Le proteine non istoniche regolano replicazione, trascrizione, riparo, ricombinazione. Le proteine della cromatina possono compattare DNA  $\approx 10.000$  volte (da cm a  $\mu\text{m}$ ). Compattamento avviene in stadi successivi: 1) associazione DNA-istoni => nucleosomi, 2) associazione fra nucleosomi vicini, e così via.

La competizione spazio-temporale fra compattamento e accesso di proteine a diverse regioni del cromosoma è alla base della regolazione dell'espressione genica, che in ultima analisi dipende da modificazioni enzimatiche  $\pm$  reversibili dei nucleosomi.

Il compattamento del DNA nei procarioti è mediata da proteine istone-simili, che non formano nucleosomi, ma il processo è ancora poco chiaro.

Il DNA, insieme a diverse proteine si organizza in una struttura che è detta **CROMOSOMA**.

I cromosomi sono costituiti da **cromatina**, che consiste di fibre contenenti DNA e proteine. Quando una cellula non è in divisione, la cromatina si trova sotto forma di lunghi filamenti. Durante la divisione le fibre di cromatina si condensano e si rendono visibili come strutture distinte.

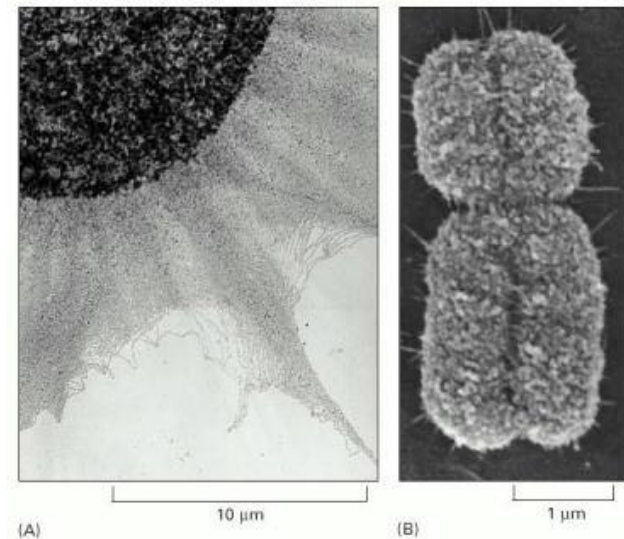


Nelle cellule umane i cromosomi si possono osservare durante la divisione cellulare e distinguere per forma e dimensioni.

# La cromatina è quindi un complesso sovramolecolare di acidi nucleici (DNA e RNA) e proteine

Caratteristiche:

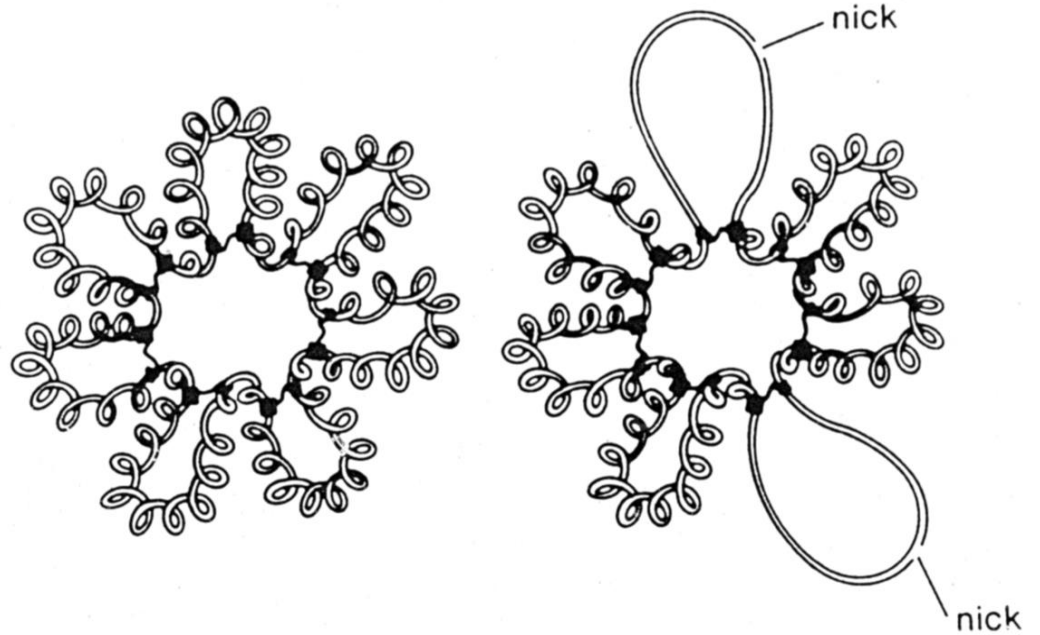
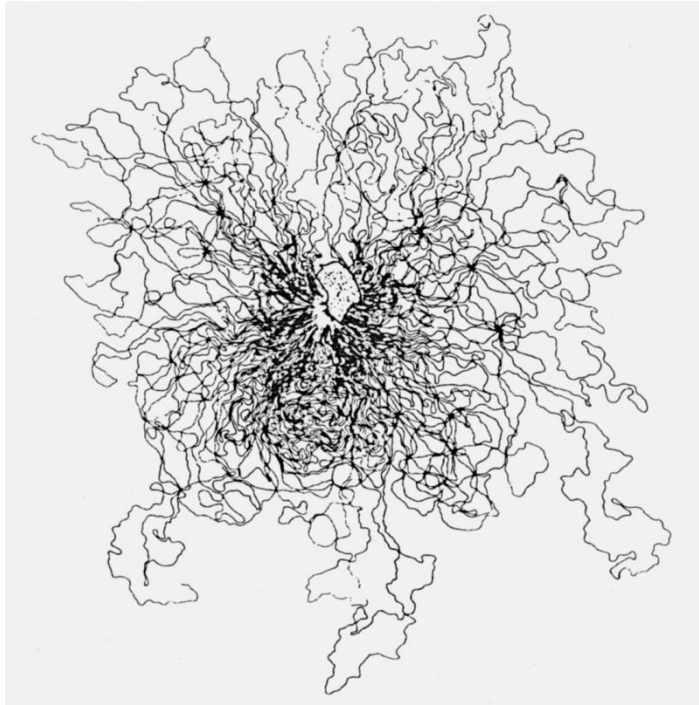
struttura altamente dinamica il cui **grado di organizzazione o compattazione o “condensazione”** varia da cellula a cellula, durante il ciclo vitale della cellula, tra zone diverse dei nuclei interfasic



# Impacchettamento del DNA nei cromosomi

- **E. coli ha un cromosoma circolare di circa  $4 \times 10^6$  b.p. che sarebbe lungo 1,35 mm (1000 volte più dell'intero batterio) se non fosse impacchettato con le proteine.**
- **Una cellula eucariotica (spermatozoo) ha  $3 \times 10^9$  b.p. e questo DNA sarebbe lungo circa 1m e deve stare in 5-10  $\mu\text{m}$**
- **Il DNA è compattato grazie a proteine basiche (istoni e istoni-simili e proteine non istoniche)**

# Modello dell'organizzazione ad anse nel nucleotide batterico



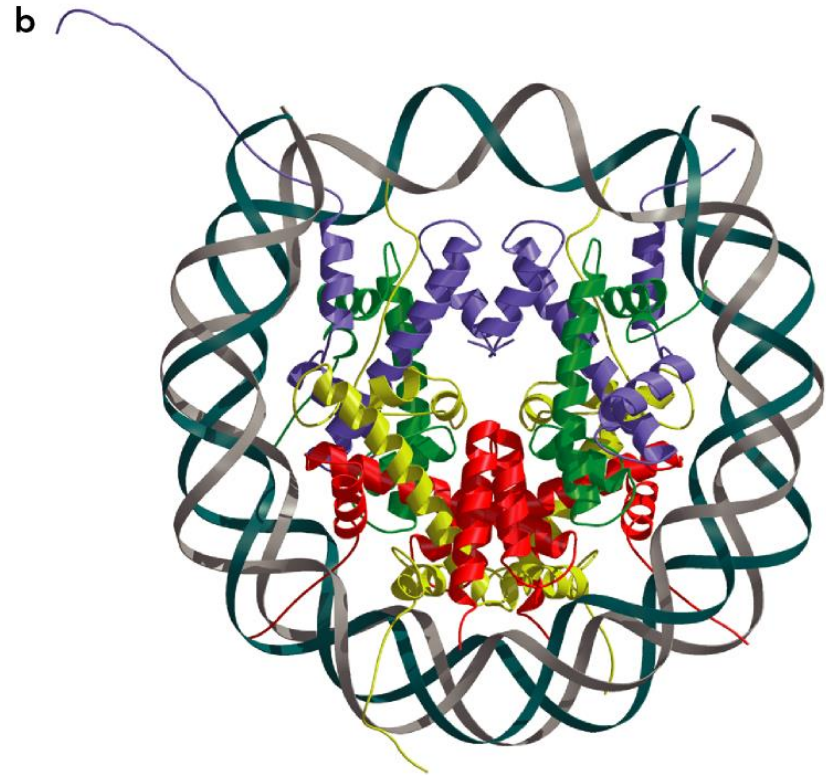
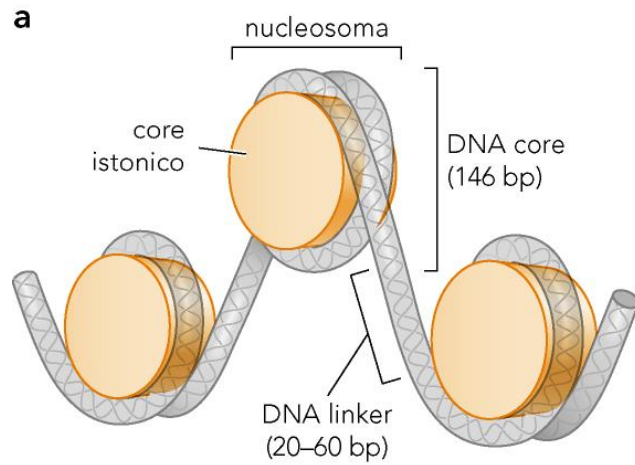
# Impacchettamento del DNA

- Gli **istoni** sono Proteine cariche positivamente (ricche in Arg, Lys, His) e si legano ai gruppi fosfato del DNA formando i nucleosomi
- Il ruolo degli istoni è strutturale e funzionale (influenzano anche l'attività del DNA a cui sono associati)
- Il **nucleosoma**: è una “perla” costituita da 147 b.p avvolte su un nucleo di 8 istoni (2 x 4 tipi).
- I nucleosomi sono uniti da **DNA linker**



# Impacchettamento del DNA

- Il **nucleosoma impacchettato** si ha quando gli istoni **H1** (un quinto tipo) si associano al DNA linker avvicinando i nucleosomi adiacenti
- Nella **cromatina decondensata** i nucleosomi impacchettati formano anse spiralate tenute insieme dalle **Proteine dell'impalcatura** (non istoniche)
- Nella **cromatina condensata** le anse interagiscono fra di loro per costituire i **cromosomi metafasici**



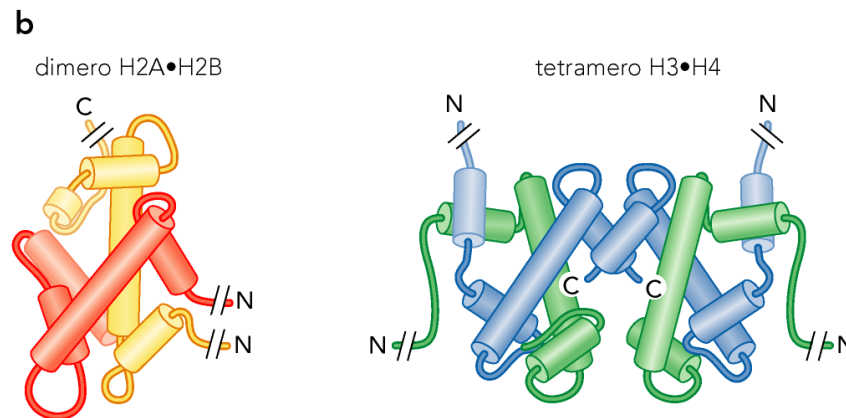
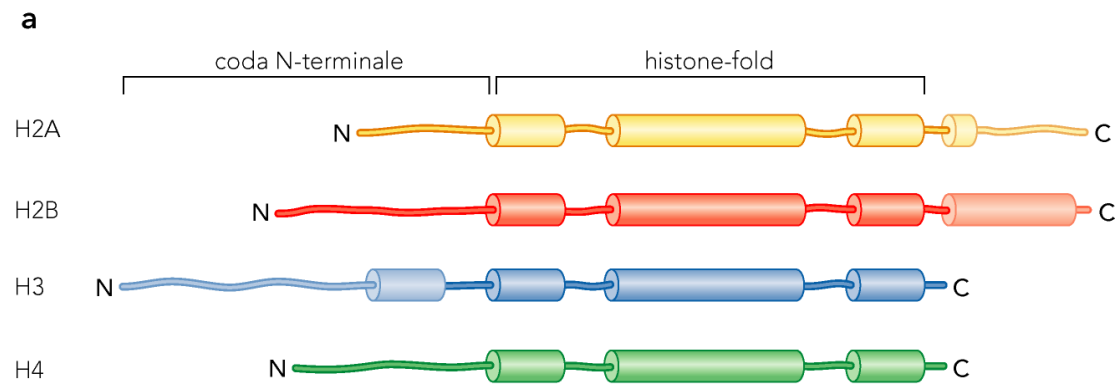
## Impacchettamento del DNA eucariotico nei nucleosomi

Il nucleosoma è composto da un nucleo di 8 proteine istoniche attorno a cui è avvolto il DNA. Il DNA fra due nucleosomi è detto DNA linker. Il DNA viene compattato ~ 6 volte nei nucleosomi (**I stadio del compattamento**).

Il DNA associato ai nucleosomi (DNA core) è avvolto ~ 1.7 volte attorno all'ottamero (147 bp in tutte le cellule eucariotiche).

Il DNA linker invece è variabile (20-60 bp), con una lunghezza tipica per ogni organismo, che si riflette in una diversità di strutture di ordine superiore della cromatina.

**Le zone di DNA non organizzate in nucleosomi sono impegnate nell'espressione genica, replicazione o ricombinazione.**



## Gli istoni

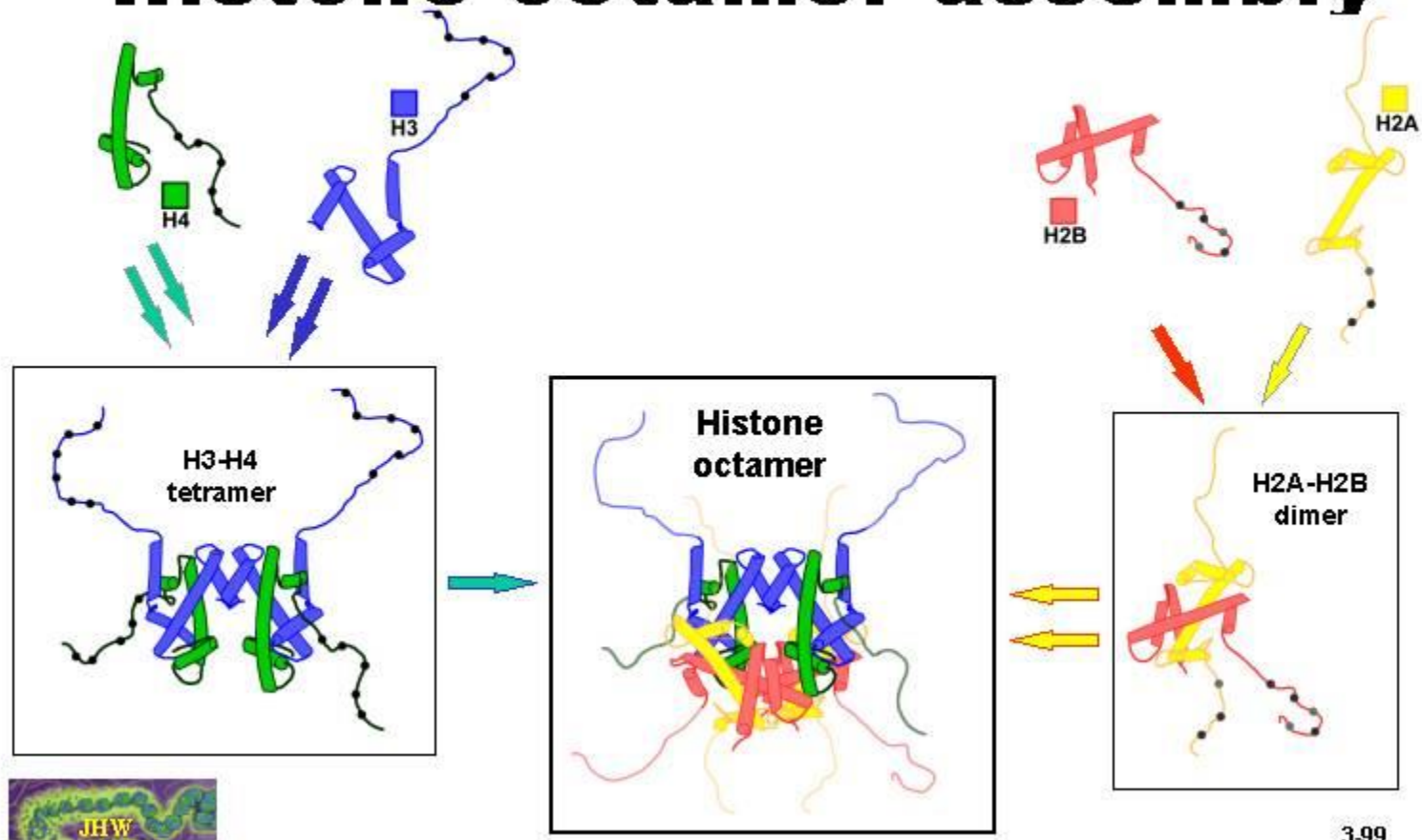
Sono le proteine più abbondanti associate al DNA eucariotico. Sono di 5 tipi: H2A, H2B, H3, H4 (formano il core) e H1 (lega il DNA linker fra 2 nucleosomi). I primi 4 sono presenti in quantità uguali nella cellula, mentre H1 è metà (1 nucleosoma).

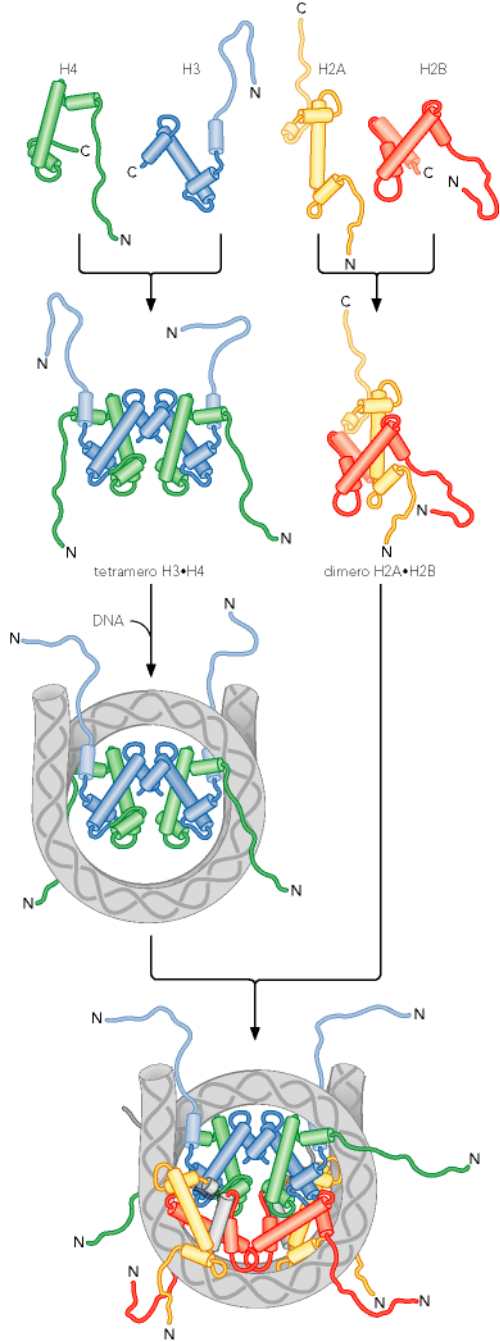
Gli istoni sono proteine basiche, cioè cariche positivamente (> 20% di lisina e arginina), di PM 11-15 kDa (H1 è 20 kDa).

**Il core si assembla solo in presenza di DNA, mentre da soli in soluzione formano complessi intermedi.**

Sono formati da un dominio ben conservato, detto histone-fold, formato da 3  $\alpha$ -eliche, coinvolte nella formazione di dimeri H2A-H2B e H3-H4, questi ultimi poi formano tetrameri.

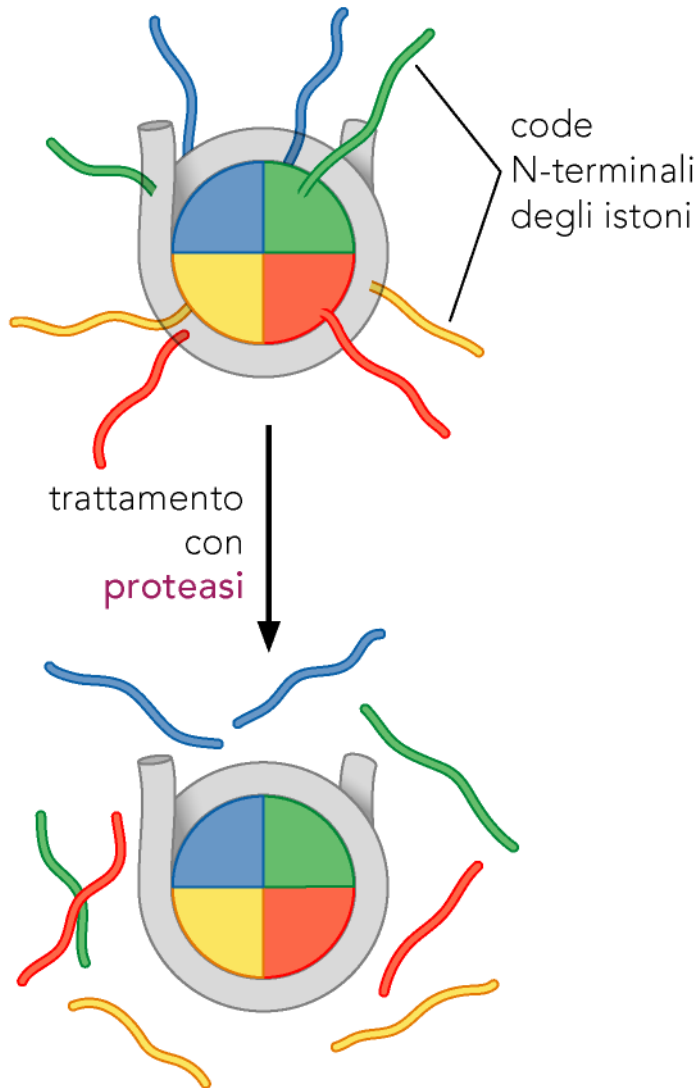
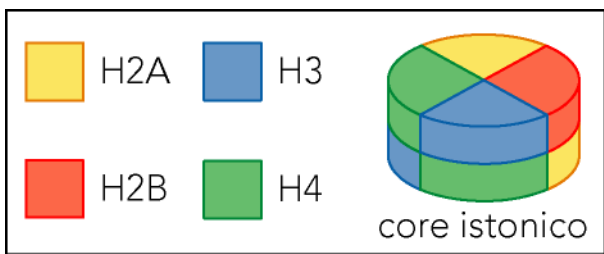
# Histone octamer assembly





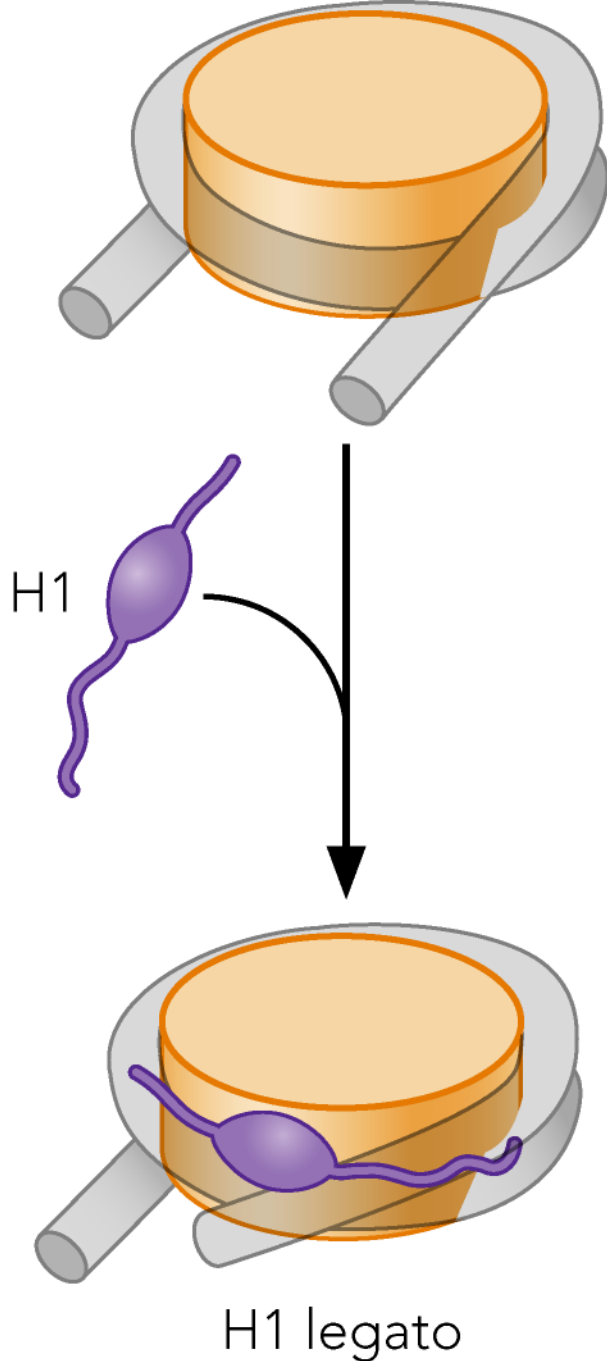
## Assemblaggio di un nucleosoma

Al DNA si lega prima un tetramero (H3-H4)<sub>2</sub> e poi due dimeri H2A-H2B.



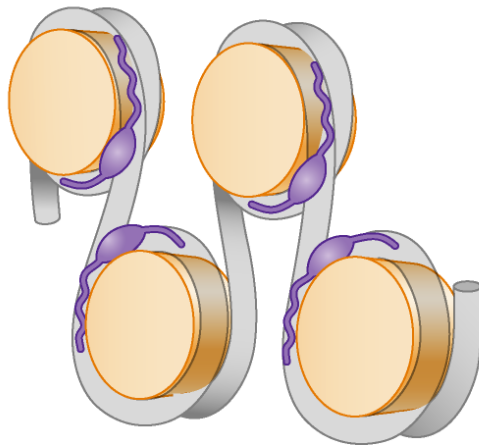
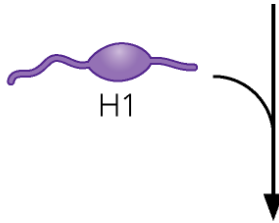
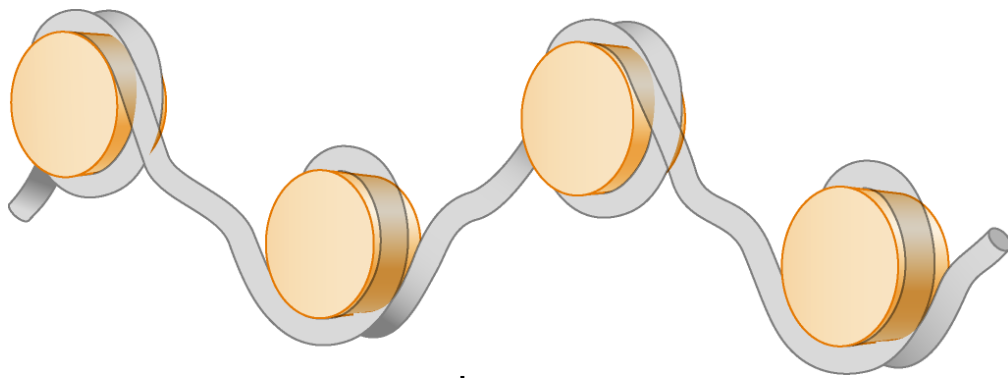
## Accessibilità delle code N-terminali degli istoni core alle proteasi

Per trattamento con tripsina le code vengono digerite, mentre il core resta intatto, quindi non sono necessarie per l'assemblaggio del nucleosoma. Sono però sede di molte modificazioni enzimatiche, che fanno cambiare struttura al nucleosoma (fosforilazioni, acetilazioni e metilazioni di residui di lisina e serina).



## **Interazione dell'istone H1 col DNA nucleosomico**

Il passaggio successivo dell'impacchettamento dei nucleosomi è mediato dall'istone H1, che interagisce sia con una porzione centrale del DNA core che con ~20 bp di uno dei due DNA linker, facendo aumentare la lunghezza di DNA arrotolato.

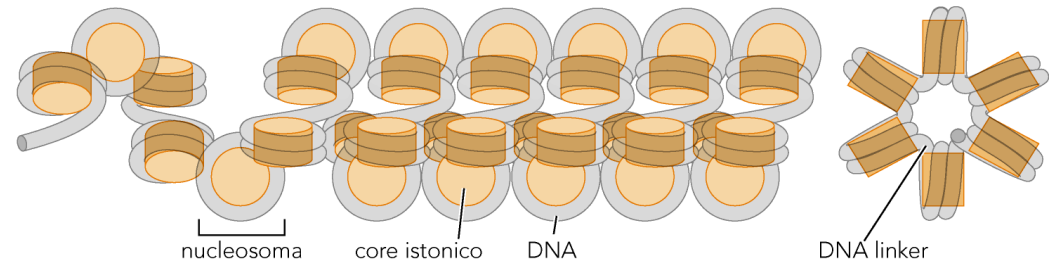


**La presenza di H1 fa aumentare la quantità di DNA avvolto attorno al core istonico**

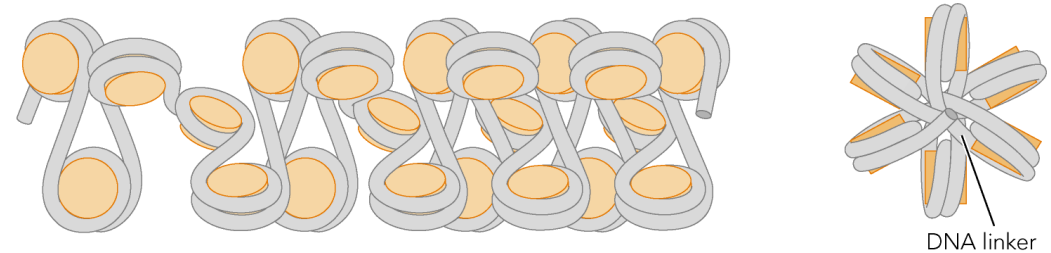
Il ripiegamento del DNA linker, provocato dall'istone H1, di circa  $20^\circ$  rispetto all'asse diade del nucleosoma, favorisce la formazione di una struttura a zig-zag della cromatina, aumentando l'impacchettamento del DNA.



**a** solenoide



**b** zig-zag



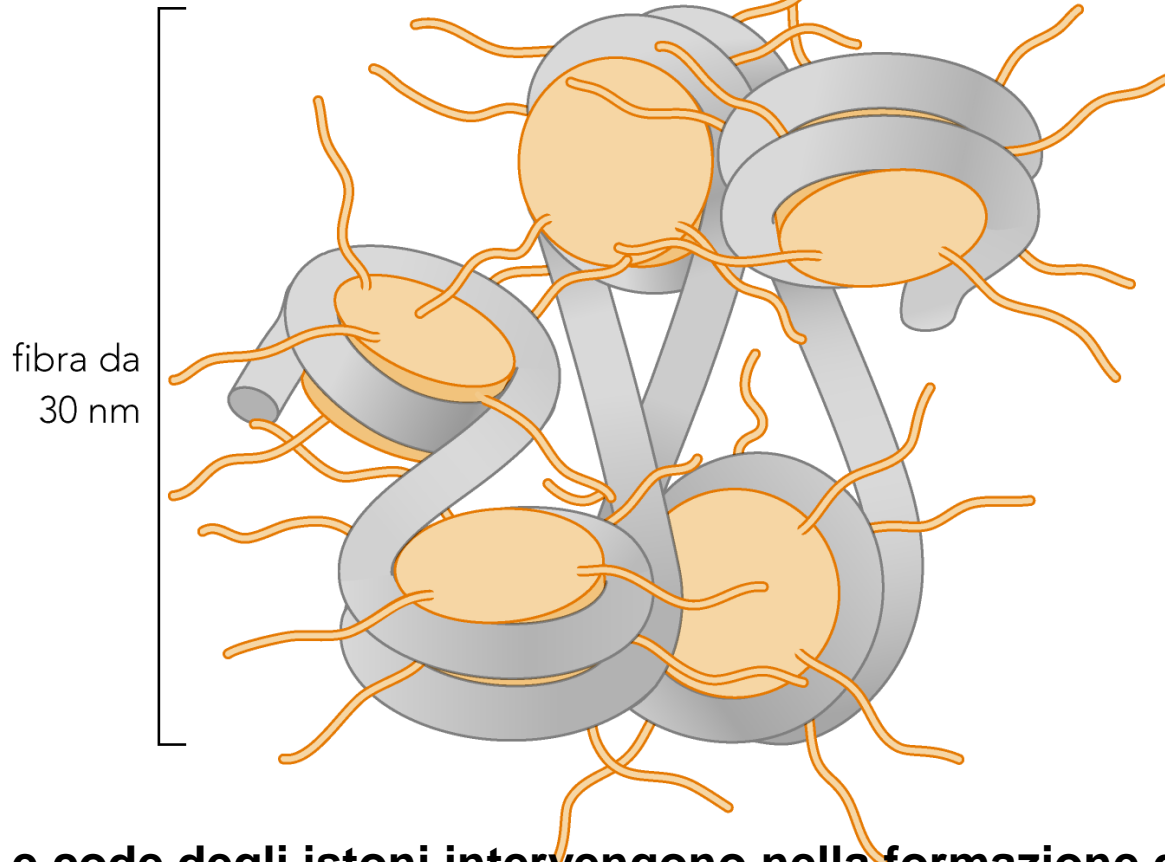
## Modelli di formazione della fibra da 30 nm

In vitro ad alta conc. salina si forma una fibra di diametro 30 nm, che riduce notevolmente l'accessibilità del DNA.

La fibra 30 nm è spiegabile in base a due modelli:

a) modello solenoide: 6 nucleosomi/giro, con un buco centrale di 11 nm (visto ai raggi X e in ME) e le superfici superiore e inferiore di ciascun nucleosoma adiacenti. Il DNA linker è parte della superelica e non attraversa mai l'asse del solenoide.

b) modello a zig-zag: differisce dal precedente per la diversa posizione del DNA linker, che attraversa l'asse longitudinale della fibra. E' favorito dalla presenza di DNA linker più lunghi, variabili da specie a specie.



### **Le code degli istoni intervengono nella formazione della fibra 30 nm**

Istoni del core, privati di coda N-terminale, sono incapaci di formare la fibra 30 nm. Nel cristallo sono state osservate legami a H fra la coda di H4 e parti di H2A-H2B di nucleosomi vicini ben conservate in tutti gli eucarioti, ma non coinvolte col legame al DNA e nella formazione dell'ottamero.

E' probabile che le code, in quanto frequentemente modificate nella cellula, influenzino la formazione della fibra da 30 nm e di altre strutture d'ordine superiore.

## Caratteristiche degli istoni

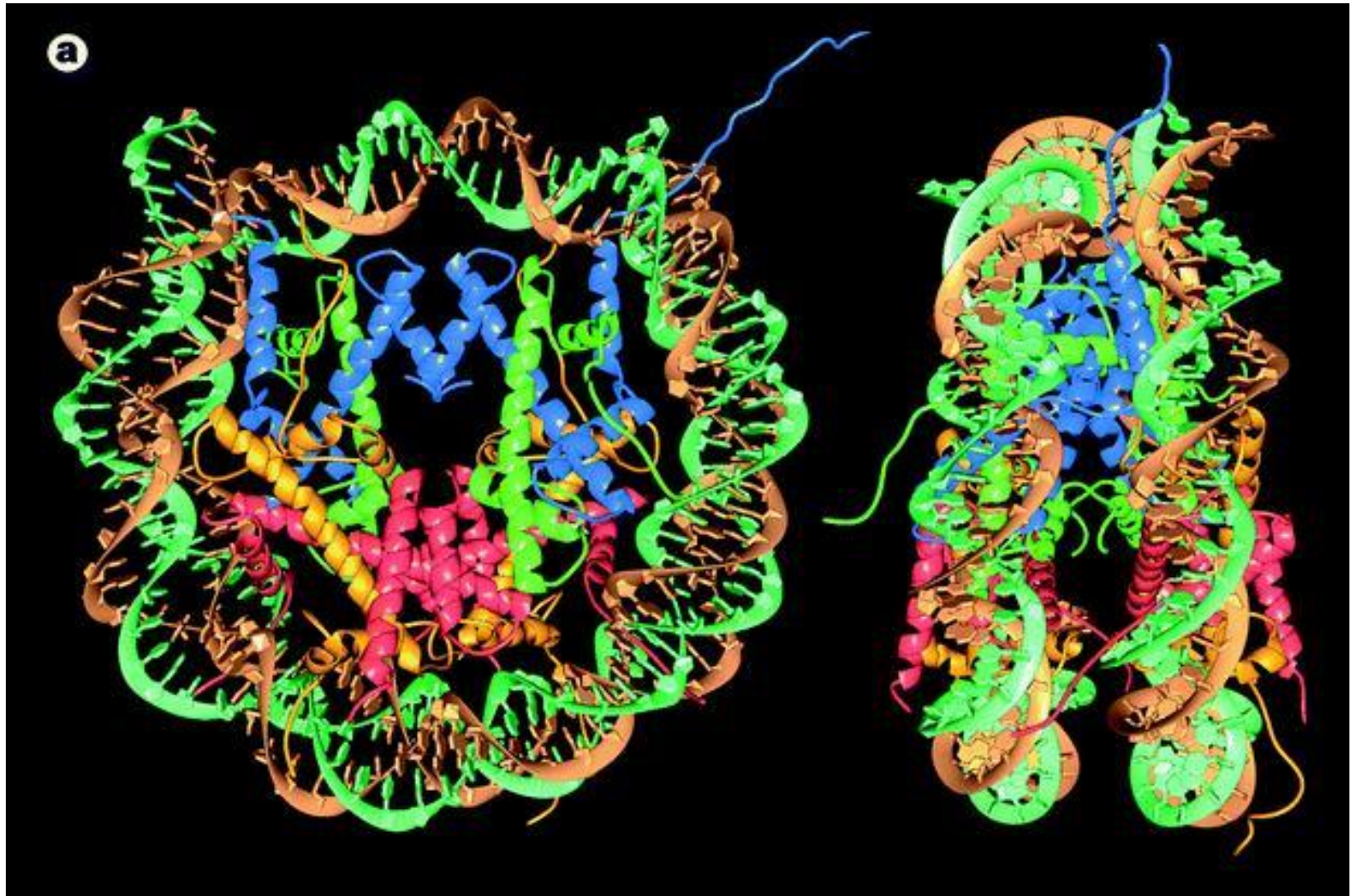
<b>Tipo</b>	<b>Massa mol. N.mol./ kDa nucleosoma</b>	<b>N.mol./</b>	<b>Caratteristiche</b>
<b>H1</b>	<b>21,5</b>	<b>1</b>	<b>Esterno al “core”, più variabile</b>
<b>H2A</b>	<b>14,0</b>	<b>2</b>	<b>Parte del “core”, molto conservato</b>
<b>H2B</b>	<b>13,8</b>	<b>2</b>	<b>Parte del “core”, molto conservato</b>
<b>H3</b>	<b>15,4</b>	<b>2</b>	<b>Parte più interna del “core”, altamente conservato</b>
<b>H4</b>	<b>11,3</b>	<b>2</b>	<b>Parte più interna del “core”, altamente conservato</b>

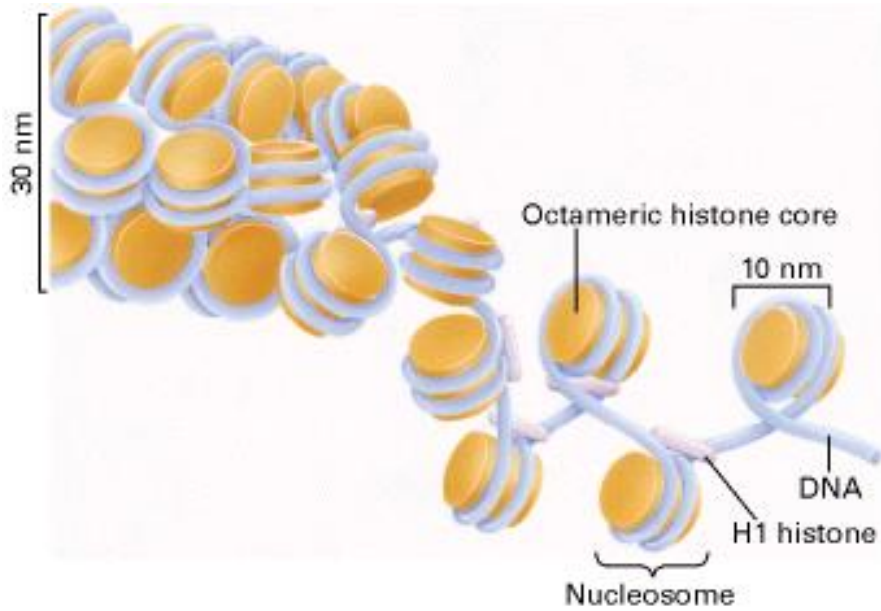
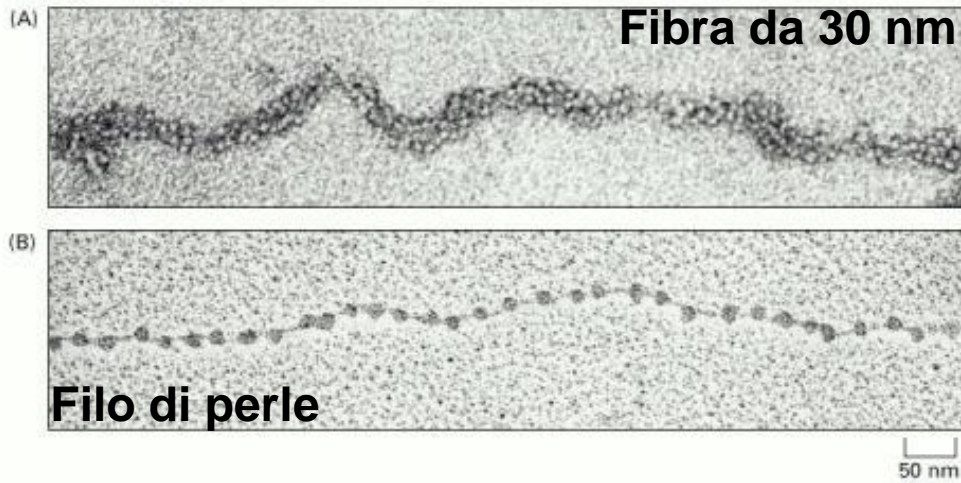
**Massa molecolare degli istoni per nucleosoma 130 kDa circa**

**DNA per nucleosoma: 200 paia di basi circa (pari a 140 kDa circa),  
di cui 146 strettamente associate, il resto “linker”**

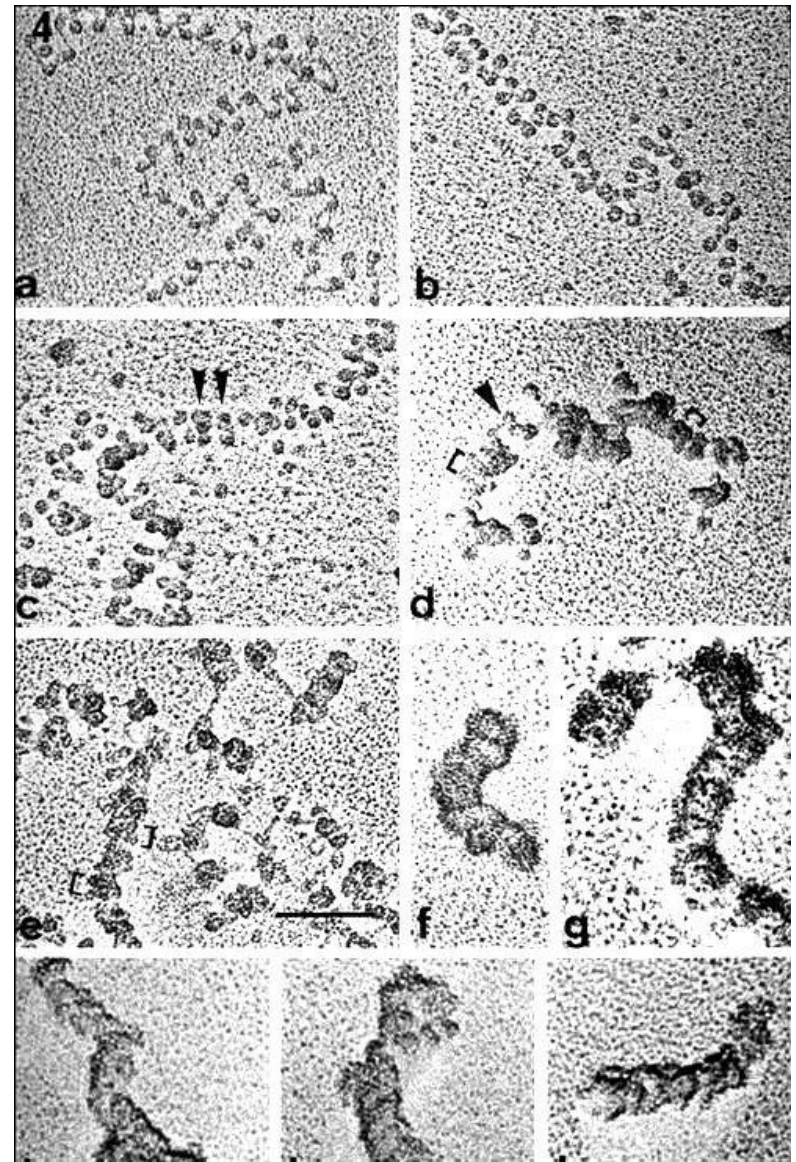
**Massa molecolare totale per nucleosoma: 270 kDa circa**

# IL NUCLEOSOMA

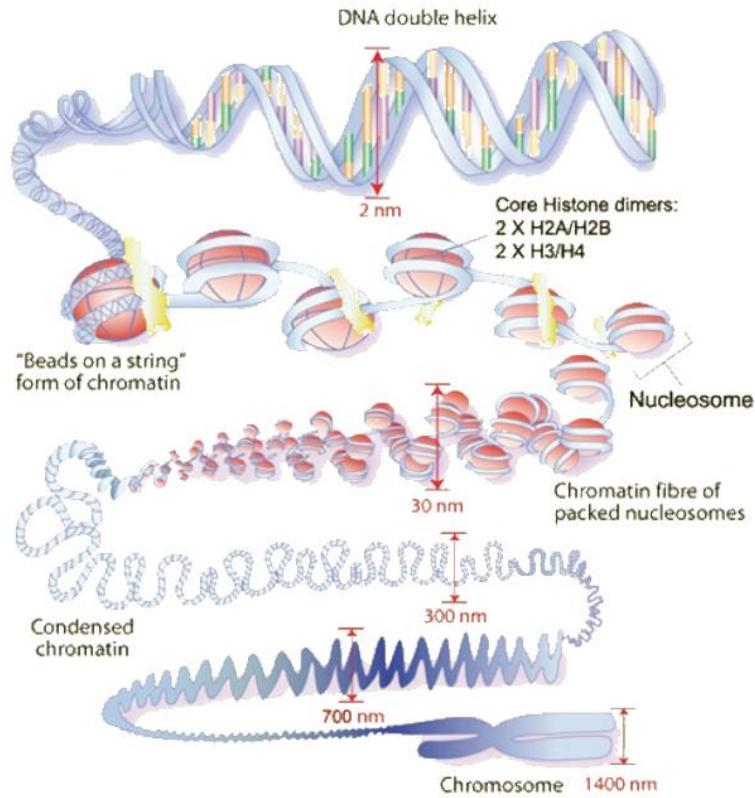




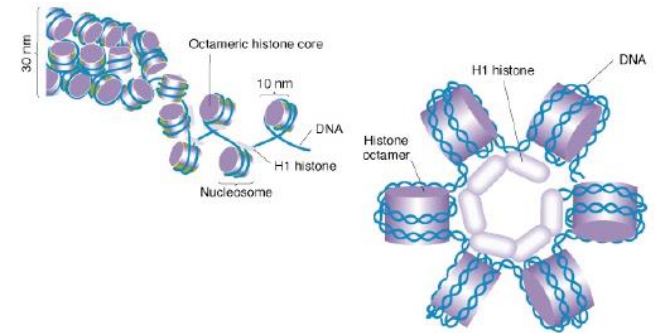
**La cromatina al microscopio elettronico**



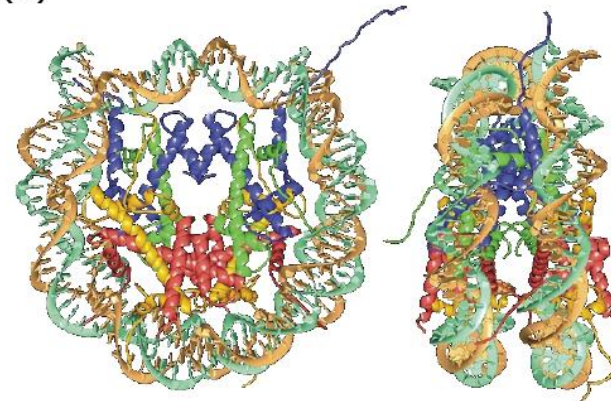
**Vari livelli di compattazione**



(a)

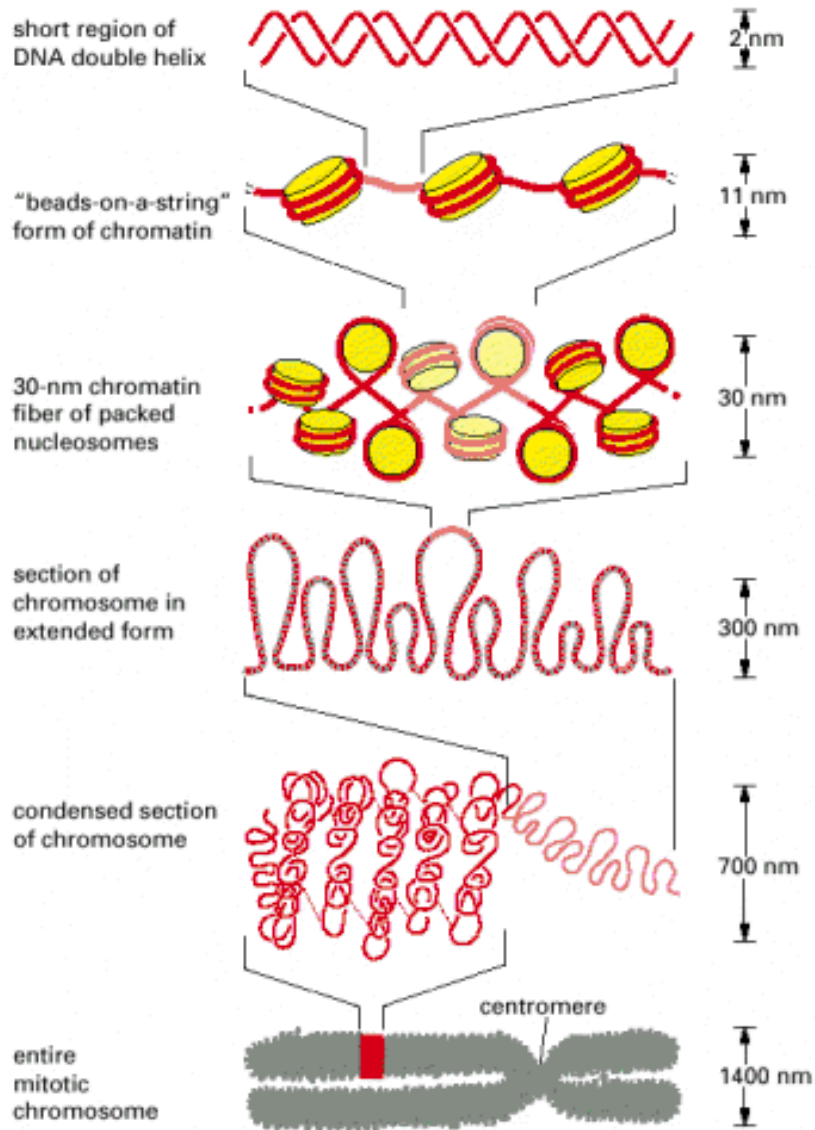


(b)

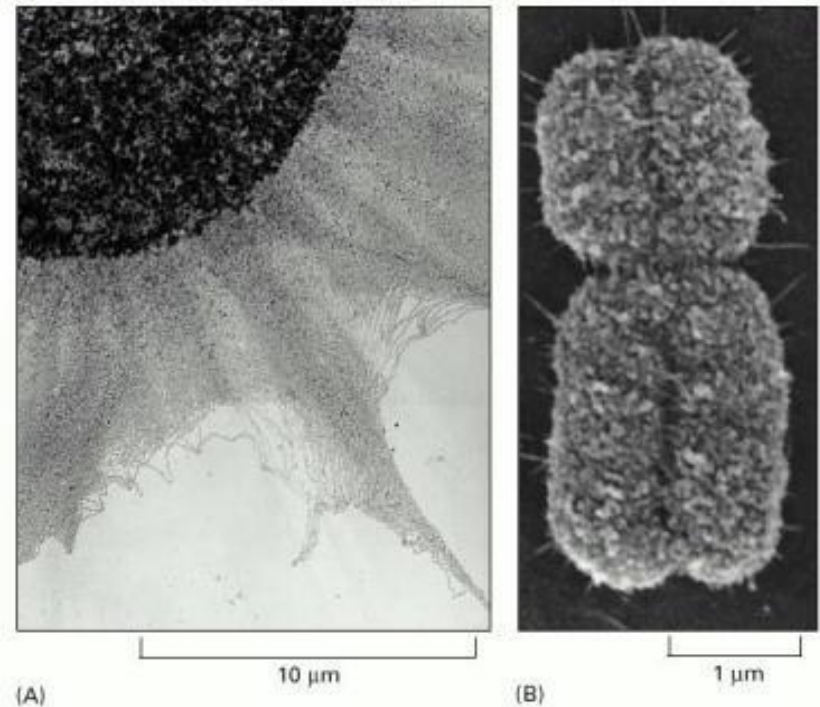


(c)

**Fig 5.1** (a) Organizzazione gerarchica della struttura compatta del DNA. (b) Livello intermedio di compattazione: l'esamero di nucleosomi. (c) il nucleosoma: DNA in verde-ocra, proteine istoniche in blu-verde-giallo-rosso. È visibile la coda degli istoni.



NET RESULT: EACH DNA MOLECULE HAS BEEN PACKAGED INTO A MITOTIC CHROMOSOME THAT IS 10,000-FOLD SHORTER THAN ITS EXTENDED LENGTH



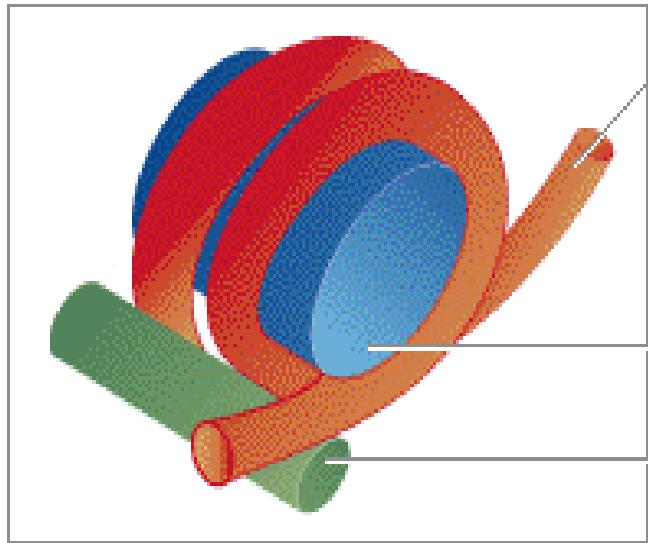
**A comparison of extended interphase chromatin with the chromatin in a mitotic chromosome.**

(A) An electron micrograph showing an enormous tangle of chromatin spilling out of a lysed interphase nucleus.

(B) A scanning electron micrograph of a mitotic chromosome: a condensed duplicated chromosome in which the two new chromosomes are still linked together. The constricted region indicates the position of the centromere.

Note the difference in scales.

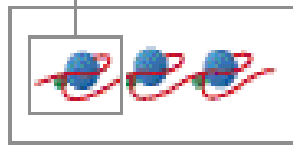
Avvolgimento del DNA su un nucleo di istoni e formazione di un nucleosoma



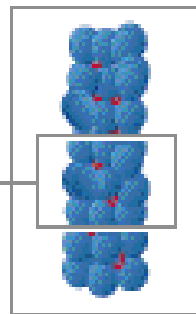
Super-elica di DNA  
(l'asse della doppia elica del DNA si avvolge a sua volta nello spazio in modo elicoidale)

Nucleo di 8 molecole di istoni

Molecola di istone che delimita il nucleosoma

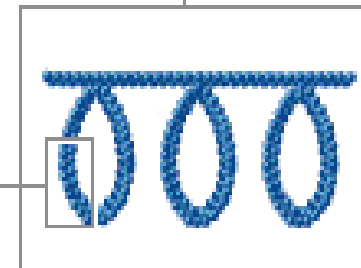
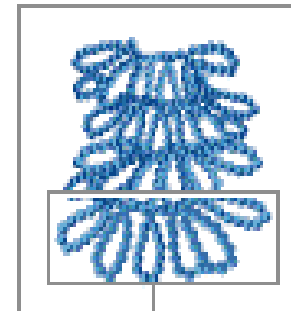


Formazione di un filamento di nucleosomi (diametro 10 nm), che costituisce i filamenti di cromatina visibili nel nucleo quando la cellula non è in fase di divisione (filamento cromatinico)

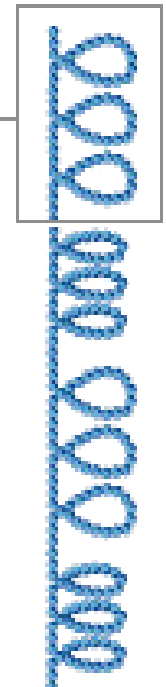


Avvolgimento del filamento e formazione di una fibra (diametro 25 nm)

Avvolgimento del filamento ad anse e formazione del cromosoma (diametro 1  $\mu\text{m}$ )



Formazione di un filamento ad anse (diametro 0,5  $\mu\text{m}$ )

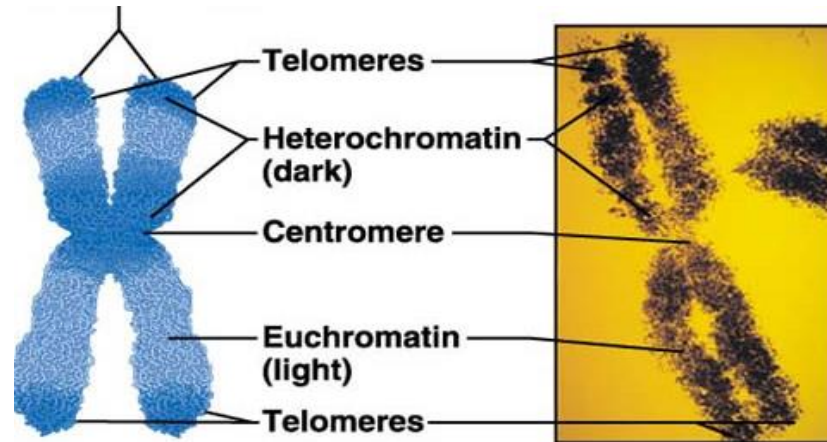


Formazione di bande orizzontali più o meno scure, dovute alla maggiore o minore distanza tra le anse del filamento (bande G)

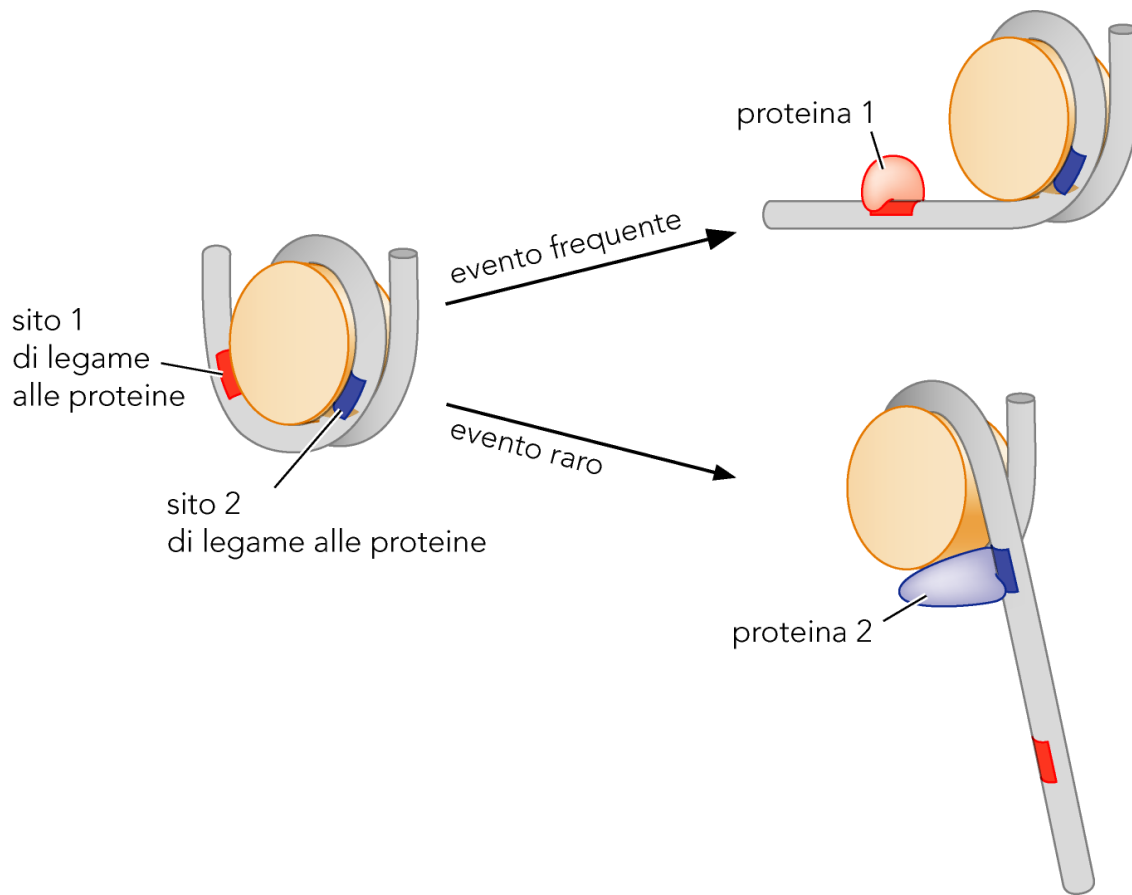


# Cromatina

- La cromatina è formata da DNA, avvolto su gruppi di istoni (proteine basiche), formando un nucleosoma, e da proteine non-istoniche (proteine neutre o acide); essa è poi ripiegata in vario modo
- *eucromatina*: meno condensata e corrisponde a zone in cui vi è un'intensa attività di trascrizione per la sintesi proteica
- *eterocromatina*: più condensata, non sembra presentare attività di trascrizione. Può essere Costitutiva o Facoltativa.

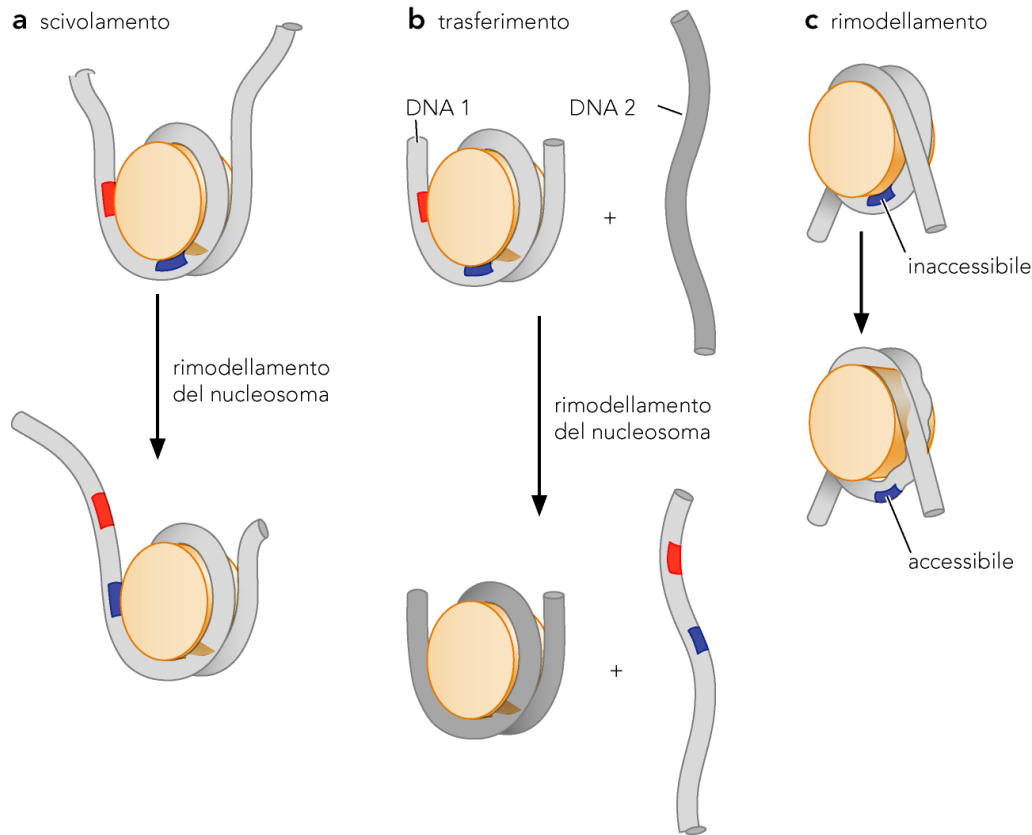


# Regolazione della struttura della cromatina



## Natura dinamica dell'associazione DNA – istoni

L'accessibilità del DNA nei nucleosomi cambia con le diverse esigenze della cellula, data la natura non covalente delle interazioni fra istoni e DNA. Uno srotolamento più o meno rilevante del DNA, senza distacco, può liberare siti di legame specifici per certe proteine. In generale, più i siti sono interni al nucleosoma, meno sono accessibili.

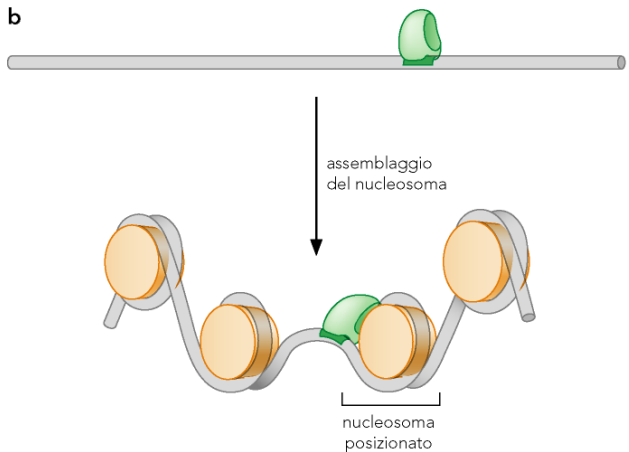
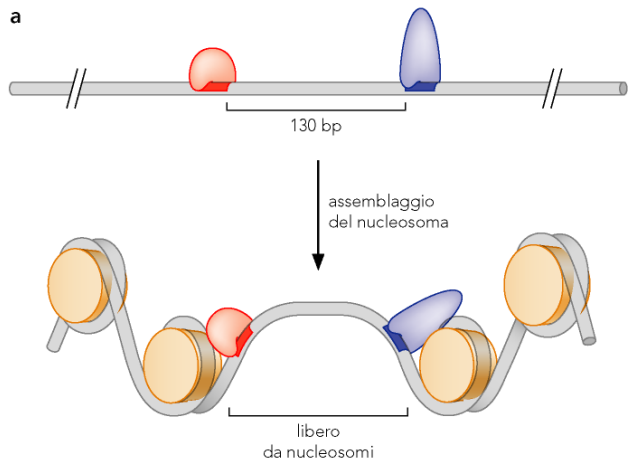


## Complessi di rimodellamento nucleosomico

Molti complessi proteici influenzano il posizionamento dei nucleosomi e le interazioni DNA-istoni, per idrolisi di ATP, tramite:

- **scivolamento** dell'ottamero sul DNA
- **trasferimento** da un tratto di DNA ad un altro
- **rimodellamento** del nucleosoma, tale da permettere un maggior accesso al DNA.

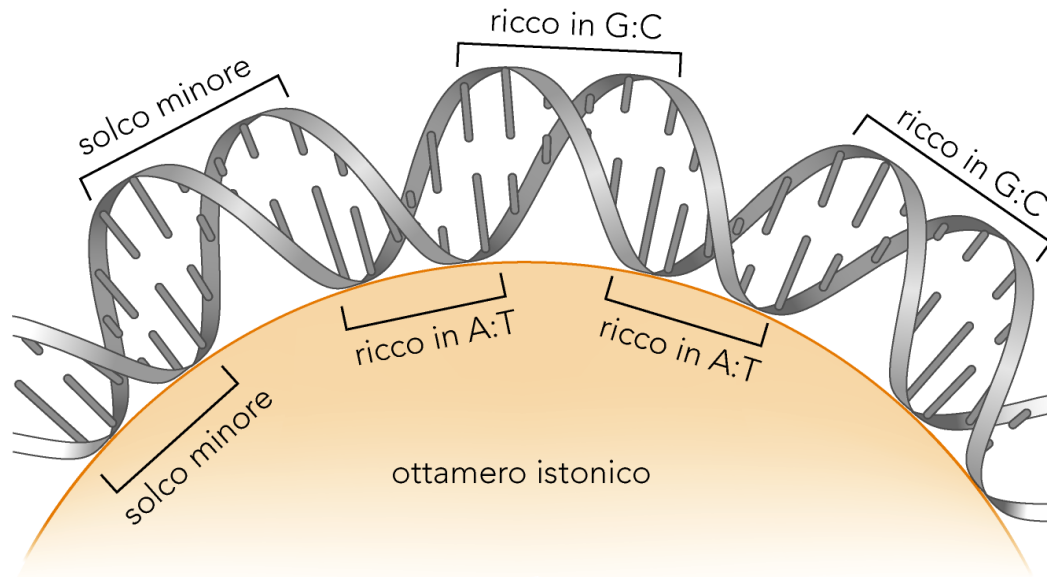
Esistono molti tipi di complessi di rimodellamento nei diversi tessuti.



## IL posizionamento dei nucleosomi può dipendere da proteine che legano il DNA

Se due proteine si legano sul DNA a distanza  $< 150$  bp, non si può formare un nucleosoma intermedio

Se alcune proteine legano fortemente il nucleosoma, lo posizionano preferenzialmente nelle loro vicinanze.

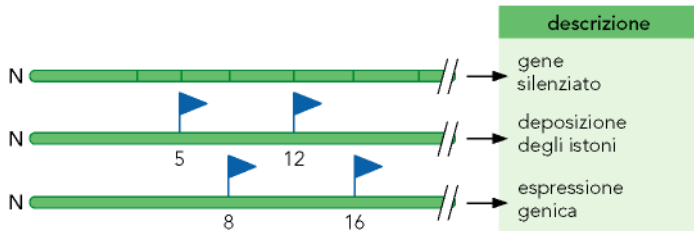
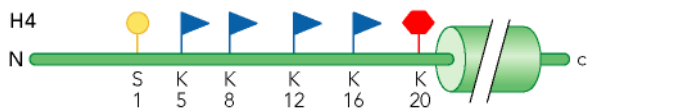
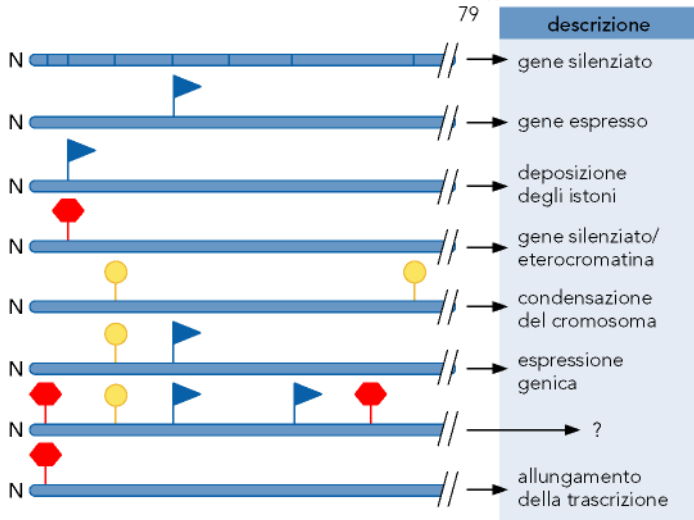
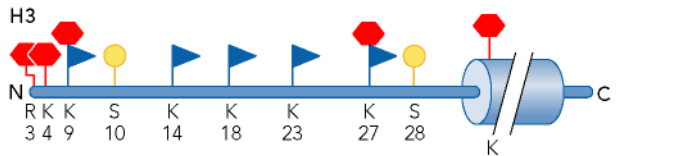
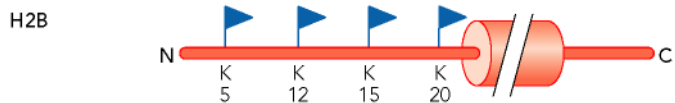


## **I nucleosomi si formano in modo preferenziale sul DNA ricurvo**

Sequenze di DNA ricche in AT, che ripiegano il DNA dalla parte del solco minore, favoriscono il posizionamento del nucleosoma. Viceversa, sequenze ricche in GC, avendo tendenza inversa, posizionano il solco minore esternamente.

**Tratti di 5 AT + 5 CG sono siti di posizionamento preferenziale del nucleosoma, anche se non richiesti per l'assemblaggio.**

Il posizionamento può avere sia un effetto positivo che negativo sull'accessibilità di siti specifici del DNA.



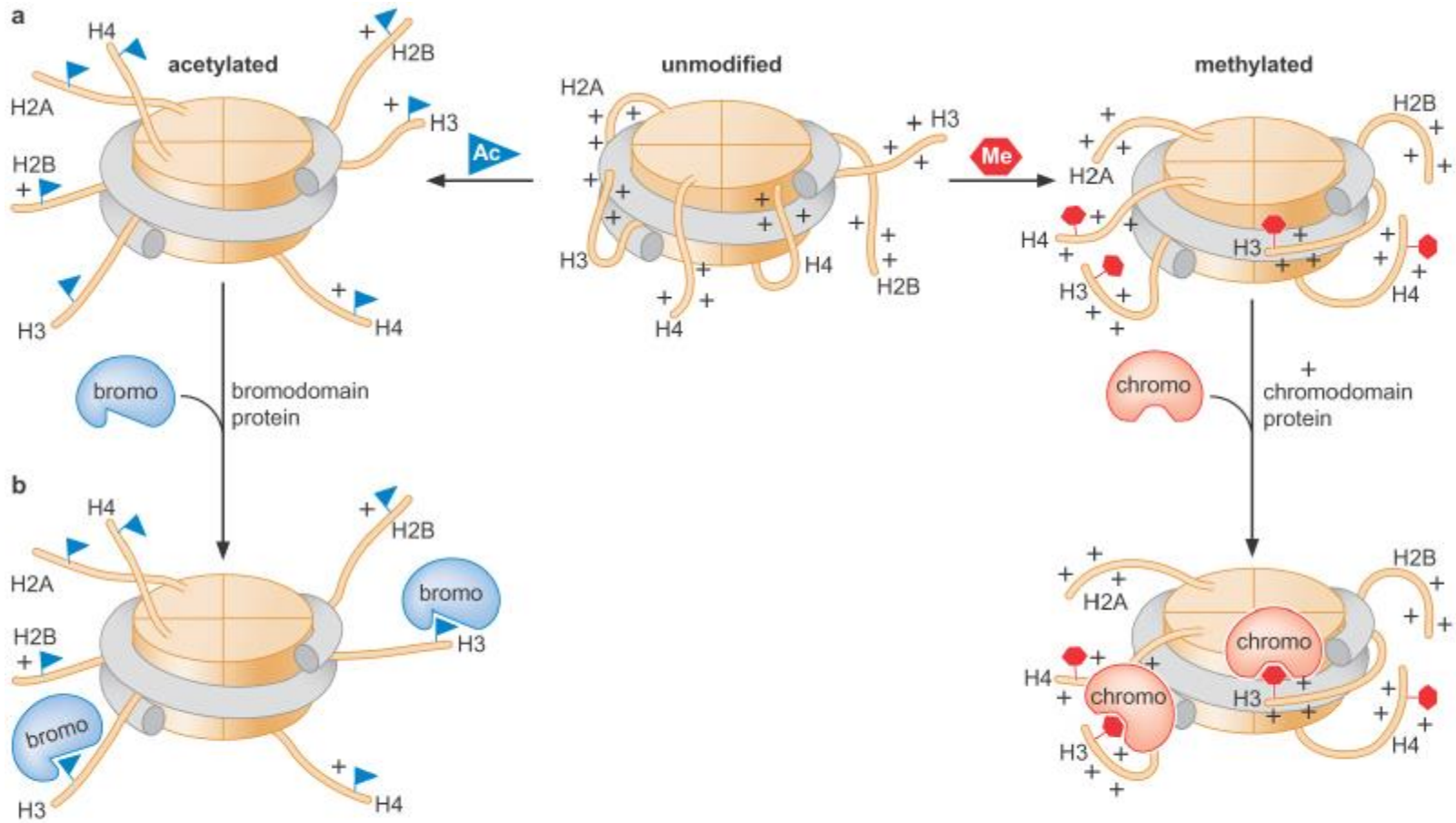
## Modificazioni degli istoni alterano la funzione della cromatina

Istoni isolati dalle cellule risultano fortemente modificati nella zona N-terminale: **acetile o metile su lisina (K)**, **fosfato su serina (S)**.

- Acetilazione associata con attivazione della trascrizione,
- Deacetilazione associata con repressione,
- Metilazione con entrambe (dipende dalla posizione dell'amminoacido modificato).
- Fosforilazione di H3 in cromatina altamente condensata (cromosomi mitotici).

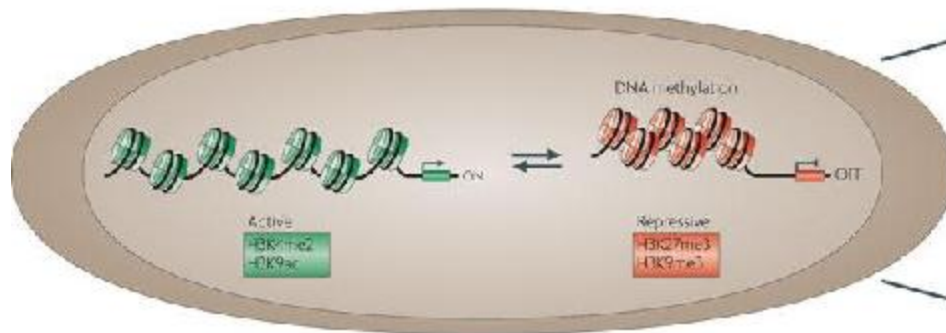
Acetilazione e fosforilazione riducono la carica positiva netta degli istoni, quindi l'affinità per il DNA.

Si pensa che esista un codice di riconoscimento delle modifiche da parte delle proteine non istoniche (**codice istonico**).





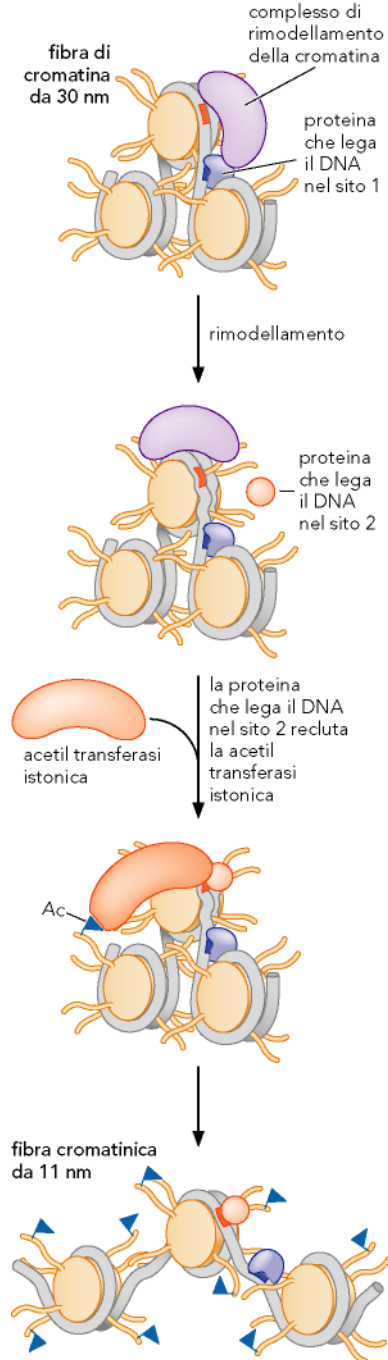
## Histone Modifications Affect Chromatin Structure



H3K4 methylation and H3K9 acetylation are hallmarks of active chromatin

H3K27 methylation and H3K9 methylation are hallmarks of silent chromatin

from Johnstone and Baylin, *Nature Rev. Genet.* 11, 806 (2010)



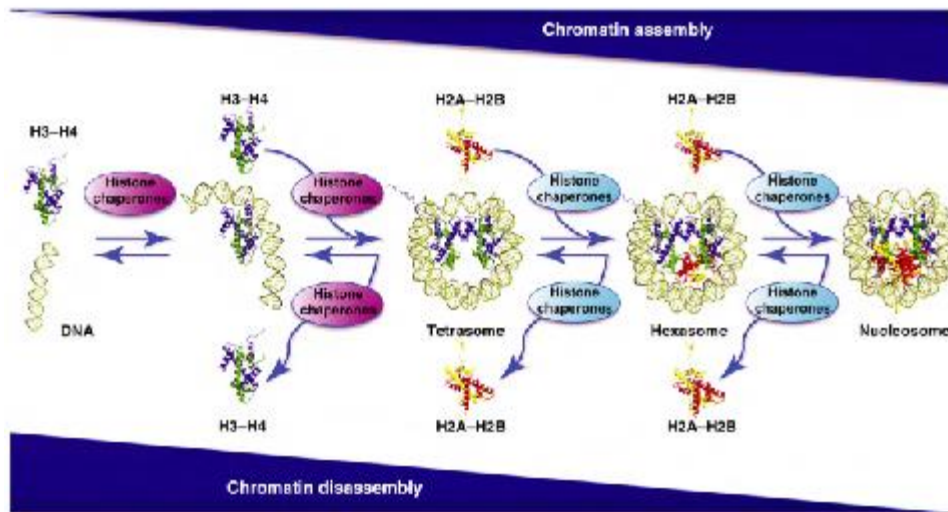
## Complessi di rimodellamento e enzimi che modificano gli istoni agiscono di concerto sulla cromatina

Proteine specifiche reclutano gli enzimi responsabili delle modificazioni istoniche.

Acetilasi, deacetilasi e metilasi istoniche, che fanno parte di complessi multiproteici, agiscono su particolari residui istonici.

Il reclutamento di questi enzimi su particolari regioni del DNA, indotta da queste proteine non istoniche, è responsabile del posizionamento dei nucleosomi sulla cromatina e della modulazione dell'espressione genica in quanto modificano l'accessibilità del DNA.

## Assembly of Nucleosomes



Histone chaperones assemble histones into nucleosomes

Histone chaperones prevent non-specific associations of histones with DNA

Histone chaperones prevent formation of deleterious off-pathway intermediates

from Das *et al.*, *Trends Biochem.Sci.* 35, 476 (2010)