

PRIMA LEZIONE: CAPITOLO 2

i ricercatori stimano che nel mondo attuale vi sia un numero compreso tra 5 e 100 milioni di differenti specie viventi. La prima grande suddivisione è rappresentata dalla classificazione in tre grandi domini (*bacteria*, *archaea*, ed *eukarya*) e sei regni (*eubacteria*, *archaeobacteria*, *protista*, *funghi*, *plantae* ed *animalia*) che presentano i gruppi tassonomici di livello gerarchico più elevato. La TASSONOMIA, o “classificazione scientifica degli organismi” è un termine che si riferisce alle modalità con le quali i naturalisti e i biologi raggruppano le specie di organismi viventi e fossili. La tassonomia acquista rigore scientifico grazie a Carlo Linneo, naturalista svedese che inventa la nomenclatura binomia, tutt’ora in uso. Essa consiste nell’identificare univocamente un organismo vivente con un doppio nome in lingua latina di cui il primo è relativo al genere ed il secondo alla specie.

INQUADRAMENTO SISTEMATICO DEGLI ESSERI UMANI

- REGNO – Animalia
- PHYLUM – Chordata
- CLASSE – Mammalia
- ORDINE – Primates
- FAMIGLIA – Homminidae
- Genere – Homo
- Specie – Sapiens

L’aspetto importante della tassonomia che si è sviluppato negli ultimi trent’anni è la possibilità di applicarla direttamente all’evoluzione delle molecole a livello strutturale, studiandone parallelamente la struttura e la funzione durante il corso del differenziamento.

LA CELLULA ALLE ORIGINI

Per essere definito un organismo “vivente” il suddetto organismo deve presentare le fondamentali proprietà che sono attinenti alla vita: riprodursi, reagire, metabolizzare, crescere, cambiare perpetuando le mutazioni e morire. In oltre la proprietà unificante di tutti gli organismi viventi fin ora conosciuti è che alla base di ogni sembianza di vita ci sia una struttura primaria: la cellula.

Il termine cellula fu coniato per la prima volta dal naturalista Robert Hooke, il quale osservando al microscopio del sughero notò la disposizione microscopica di piccole unità che si ripetevano a formare poi l’elemento stesso. Queste piccole strutture furono associate a delle piccole celle, come quelle di un alveare, quindi nominate cellule. Nel 1839 Schwann e Schleiden dimostrarono che sia i vegetali che gli animali sono basati sulle interazioni delle cellule tra loro. Infatti le cellule, puntualizzò Rudolph Virchow nel 1855, nascono da duplicazione di altre cellule, e non per formazione spontanea, e gli organismi possono essere oltre che unicellulari anche pluricellulari. Cosa importante, le cellule non sono tutte uguali, bensì si differenziano assumendo funzioni e strutture specifiche mano a mano che si dividono e

si redistribuiscono costituendo tessuti, quindi apparati e in fine organismi. Ricapitolando, quindi, in ogni cellula sono insite le prerogative della vita. Queste cellule si somigliano sotto il profilo chimico, in quanto sono composti dagli stessi tipi di molecole che partecipano nelle stesse reazioni con lo stesso ruolo di macchinario funzionale, ma in realtà esse si differenziano in maniera estremamente diversa: innanzi tutto si differenziano nelle dimensioni, nella forma che può essere sferica, poligonale, appiattita, cuboidale o colonnare), per le sostanze chimiche che usano a discapito di altre, per le numerose funzioni che caratterizzano ogni tipo di cellula.

Nonostante quanto detto, ogni tipo di cellula ha almeno tre aspetti fondamentali in comune: infatti ciascuna ha un citoplasma, un nucleolo, o nucleo, e una membrana plasmatica.

La **membrana plasmatica** circonda la cellula e ne definisce i confini racchiudendone il contenuto e separando l'interno dall'ambiente extracellulare; è costituita da un doppio strato di fosfolipidi di circa 5-10nm di spessore, con proteine in esso intersparse. Oltre a delimitare la cellula, la membrana plasmatica permette lo scambio con l'esterno e ne regola il flusso, è responsabile della capacità di reazione con l'ambiente e svolge un ruolo di comunicazione tra le cellule stesse, soprattutto negli organismi pluricellulari.

L'interno della cellula è costituito da una matrice semifluida, detta **citoplasma**. In esso vi sono tutti i composti chimici, complessi o elementari di una cellula: elementi inorganici vari, acqua, zuccheri, lipidi, amminoacidi, proteine necessari per esplicare tutte le funzioni vitali. Molti di questi elementi sono a loro volta circondati da membrane, e prendono il nome di organuli cellulari, ognuno dei quali specializzato a compiere una funzione all'interno della cellula.

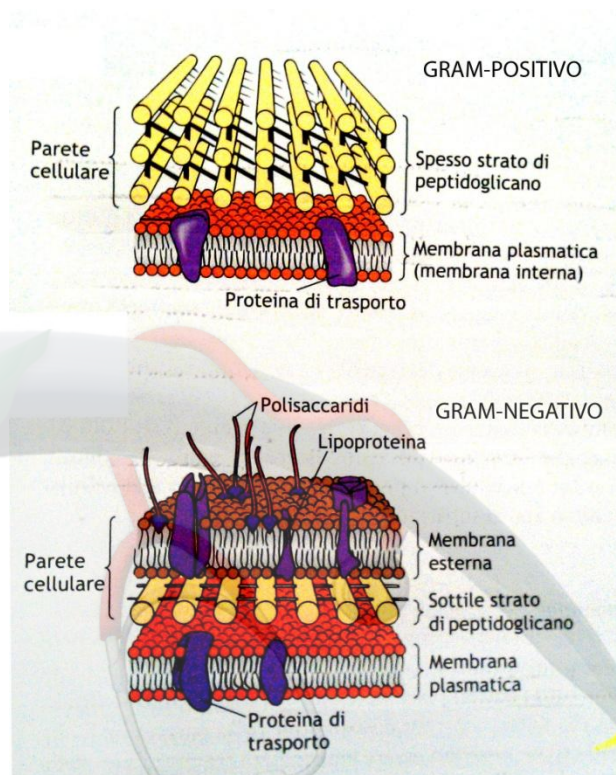
Ogni cellula contiene delle macromolecole che costituiscono il materiale ereditario. Nelle cellule più semplici denominate procarioti, la maggior parte di questo materiale è rappresentato da una singola molecola di DNA, che generalmente risiede in una porzione mediana della cellula detta **nucleolo**, dispersa nel citoplasma; o, nelle cellule più evolute, quelle **eucariotiche**, si trova in un **nucleo**, delimitato da un involucro, la carioteca (una struttura a doppia membrana). All'interno del nucleo, analogamente al citoplasma, si trova il **nucleoplasma**.

LA CELLULA PROCARIOTICA

I procarioti sono i più semplici organismi. Sono tutti esseri unicellulari, anche se a volte possono presentarsi in forme di aggregazione o gruppi costituiti da molte centinaia di individui; di essi fanno parte i batteri propriamente detti, le alghe blue, ed altre forme vitali tutte distinte per avere una ampia capacità di adattamento, rapide capacità riproduttive, processi anaerobi e/o aerobi.

Le cellule procariotiche sono di ridotte dimensioni e possono avere forme diverse; esse presentano il citoplasma circondato da una membrana plasmatica e nella maggior parte dei casi, racchiuso da una parete cellulare rigida. L'interno della cellula si presenta priva di qualsiasi organizzazione, e senza alcun compartimento interno. L'intero citoplasma della cellula rappresenta la sede dove si svolgono le funzioni vitali. Pur essendo presenti elementi complessi quali ribosomi, non sono presenti organuli vescicolari; piuttosto si identifica un nucleolo, cioè una zona del citoplasma dove si colloca il DNA sotto forma di un singolo cromosoma circolare. La regione del nucleolo osservata con il microscopio elettronico a trasmissione si presenta come una struttura filiforme aggrovigliata dai contorni irregolari

discretamente elettrondensa, mentre il citoplasma che la circonda è scarsamente elettrondenso. Non essendo presenti all'interno strutture per la stabilizzazione e di supporto, la forma e la rigidità della cellula è mantenuta solamente dalla parete cellulare. Essa costituisce uno strato rigido composto da peptidoglicani, molecole complesse di una matrice di zuccheri insoliti legati trasversalmente da corte unità polipeptidiche. Tutti i batteri possono essere suddivisi in due grandi sezioni, a seconda delle differenze tra le pareti cellulari. Queste evidenze possono essere sottolineate tramite l'uso della colorazione di Gram. Infatti, i batteri che sottoposti a colorazione con violetto di genziana mantengono la colorazione, sono detti Gram-positivi, e hanno una spessa parete cellulare costituita da un monostrato peptidoglicanico; i batteri che non riescono ad assorbire la colorazione, e non sono osservabili, allora sono detti Gram-negativi: infatti la loro parete cellulare è più piccola, e intermedia tra due doppi strati fosfolipidici. La differenza tra gram-positivi e negativi è molto importante, in quanto alcuni batteri possono rispondere o no ad alcuni farmaci. Alcuni batteri presentano sulla superficie un ulteriore strato di monosaccaridi, che si presenta in forma gelatinosa, con funzione protettiva, detto capsula. La parete cellulare, oltre a svolgere funzione di sostegno che negli eucarioti è svolta da diversi organuli, viene a essere essenziale anche in altre funzioni vitali della cellula, come per esempio durante la riproduzione. Nello specifico, prima della scissione della cellula, quando il DNA si è duplicato, ogni molecola si lega ad una parte della parete cellulare, in un punto denominato **mesosoma**, in modo da assicurare ad ogni cellula figlia una molecola di DNA. Il mesosoma è un invaginazione a forma di spirale della membrana plasmatica. Per la locomozione queste cellule si servono di unità morfo-funzionali dette flagelli, costituite da molecole di *flagellina* che protrudono dalla superficie cellulare e muovendosi a mo di elica imprimono movimento.



I procarioti più antichi sono gli Archaea, batteri in grado di sopravvivere in condizioni proibitive per la maggior parte della vita terrestre. Condizioni che sicuramente dovevano essere di norma miliardi di anni fa. Tra questi ricordiamo sicuramente i metanogeni, batteri che da anidride carbonica e idrogeno molecolare producono metano. Sebbene siano tra i batteri più antichi, gli archaea, presentano caratteristiche strutturali simili ai mitocondri.

Il gruppo principale più numeroso e diversificato dei procarioti è il gruppo dei bacteria. Sebbene archaea e bacteria siano alla base come struttura di organismi semplici, tra loro intercorrono molte differenze.

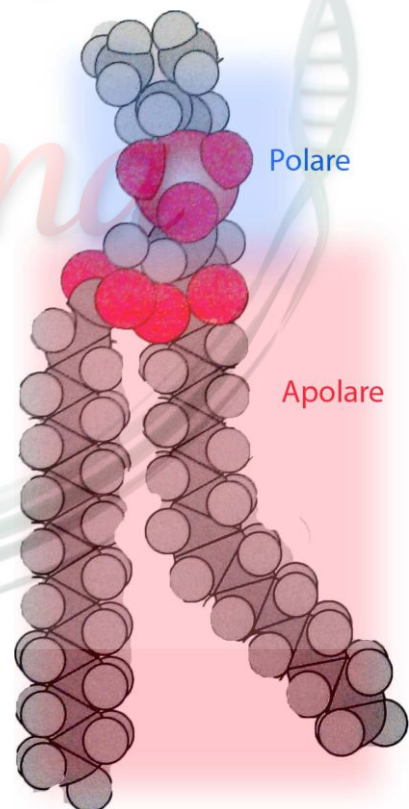
CELLULA EUCARIOTICA

La caratteristica saliente delle cellule eucariotiche è rappresentata dalla compartimentalizzazione dovuta alla presenza di strutture delimitate da membrane che costituiscono veri e propri compartimenti in cui avvengono diversificati processi biochimici simultaneamente ma indipendentemente. Questi compartimenti subcellulari sono chiamati organuli. Essi possono riconoscersi facilmente grazie alla loro morfologia, ed ognuno di essi ha una particolare specializzazione in determinati processi biochimici.

I vantaggi della compartimentalizzazione consistono nel fatto che più azioni possono avvenire simultaneamente all'interno della cellula, che reazioni pericolose che coinvolgono sostanze tossiche per la cellula possono essere svolte in siti sicuri e specifici. Insomma la generazione di un microambiente per ogni singola attività produce vantaggi in termini di sicurezza e simultaneità. Però, vi sono anche degli svantaggi nelle strutture compartimentalizzate. Infatti gli eucarioti hanno dei rischi associati alla compartimentalizzazione, infatti vi sono dei problemi di adattamento evolutivo. In oltre, alcuni organuli sono connessi in serie, e la compromissione di uno di essi può inficiare l'intero pathway di reazioni. Nelle cellule eucariotiche, la presenza di un nucleo consente di definire un nucleoplasma, distinguibile da citoplasma. Quest'ultimo come abbiamo detto è occupato da organuli quali il R.E. l'apparato del Golgi, i mitocondri, i ribosomi, i lisosomi, i perossisomi. Tutti gli organuli sono immersi nel **citoplasma**. La membrana plasmatica funge da protezione e delimita i confini della cellula, non ha, come invece nei procarioti, funzione strutturale, che è adibita al citoscheletro.

LE MEMBRANE BIOLOGICHE

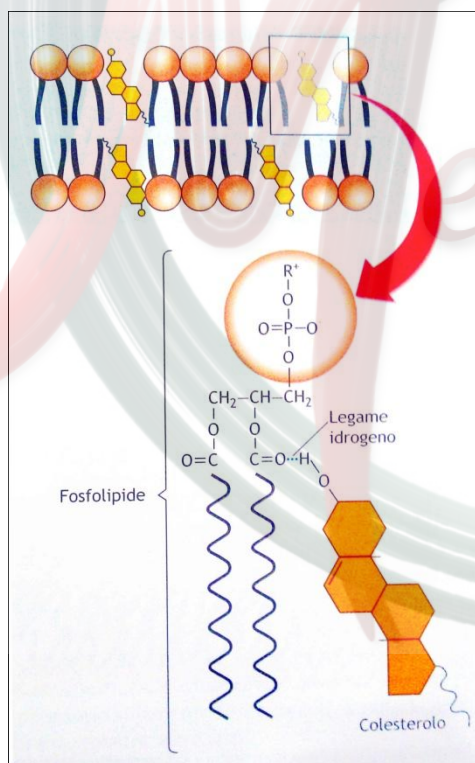
Sono strutture complesse e dinamiche che separano compartimenti e sono in grado di regolare molteplici attività cellulari. Esse sono costituite da un doppio strato fosfolipidico, colesterolo, proteine, glucidi. Uno dei ruoli più rilevanti di questa citostruttura è il mantenimento dell'omeostasi cellulare: infatti ad essa è adibito il controllo e la regolazione del trasporto di sostanze, di trasferire informazioni, e permettere l'interazione fisica con enti esterni, che siano di natura cellulare o proteica. La membrana plasmatica ha una struttura molto particolare, che si avvicina molto a quella descritta dalla teoria della **struttura a mosaico fluido**, nella quale il doppio strato lipidico presenta delle caratteristiche di fluidità, ed abbia in se immerse le proteine di membrana. Questa tesi era stata avvalorata da studi di crio-frattura negli anni '60 del secolo scorso. La crio-frattura permette di separare il doppio strato lipidico della membrana plasmatica in due facce complementari, riuscendo a visualizzare le componenti presenti in ogni faccia. La composizione dei due foglietti presenta notevoli differenze nella distribuzione sia della componente lipidica sia della componente proteica. Questa asimmetria riflette le differenze funzionali dei due monostrati.



La COMPONENTE LIPIDICA della membrana cellulare fa sì che spontaneamente si disponga nella struttura di doppio strato. Questa disposizione è dovuta alla natura anfipatica di queste molecole. I fosfolipidi posseggono una coda idrofoba e una testa idrofila. La porzione idrofoba è formata dalle due catene di acidi carbossilici esterificati con due dei tre gruppi ossidrilici del glicerolo (1,2,3-propantriolo), invece la porzione idrofila è costituita da dall'esterificazione del terzo ossidrilico con un gruppo fosfato: il gruppo OH e il gruppo fosfato insieme costituiscono la porzione polare. Questa struttura particolare consente alle teste di interagire con l'ambiente acquoso, e alle code di fuggirne. Infatti all'interno del doppio strato, dove hanno sede le code, non vi è acqua. La componente fosfolipidica della membrana è costituita principalmente da *fosfogliceridi*, *sfingolipidi* e *colesterolo*. Il versante esterno della membrana è caratterizzato dalla presenza di fosfolipidi detti *glicolipidi* perché hanno la porzione polare della testa attaccata ad un oligosaccaride. Gli oligosaccaridi che quindi sporgono sul versante esterno della membrana, sono molto ben visibili in microscopia elettronica, e formano una fascia elettrondensa conosciuta come glicocalice. Tra i più comuni fosfolipidi troviamo la fosfatidil-colina, e il fosfatidil-inositolo, rispettivamente se il glicerolo si esterifica con colina o inositolo. La curvatura che si determina negli acidi grassi insaturi, quando gli atomi di carbonio ai due versanti del doppio legame assumono conformazione cis, influenza fortemente la fluidità della membrana plasmatica.

Gli sfingolipidi contengono al posto del glicerolo la sfingosina, un amminoalcol a lunga catena. Nella membrana plasmatica troviamo principalmente i glicosfingolipidi, che sono costituiti dall'unione di uno o più residui glucidici con una molecola di sfingolipide.

Gli steroidi sono un altro gruppo di composti lipidici tetraciclici. Il principale composto di natura steroidea della membrana plasmatica è il **colesterolo** che presenta una regione apolare costituita dai quattro anelli idrocarburici più una catena laterale, ed una piccola estremità polare costituita da un gruppo ossidrilico ad un'estremità della molecola. Il colesterolo si dispone a livello del doppio strato fosfolipidico in modo tale che la sua porzione polare sia rivolta verso le superfici esterna ed interna della membrana, mentre la porzione apolare si dispone parallelamente alle code di acidi grassi, per cui si trova completamente immerso nel doppio strato. In particolare il gruppo ossidrilico si posiziona nelle immediate vicinanze delle teste idrofile, formando interazioni deboli, legami a idrogeno con le teste vicine. Per questa sua posizione il colesterolo riduce il movimento del tratto prossimale (le teste) con scarso effetto su tratto distale (le code). Infatti uno dei maggiori effetti della presenza di colesterolo nelle membrane animali è l'evitare l'eccessivo compattamento delle code di acidi grassi dei fosfolipidi a basse temperature ed evitando quindi il congelamento.



FLUIDITÀ DEL DOPPIO STRATO FOSFOLIPIDICO

In un doppio strato, a basse temperature, le catene degli acidi grassi sono limitate nei loro movimenti e strettamente impacchettate. Questa condizione determina una fase di gel, o fase cristallina. Quando la temperatura aumenta molecole adiacenti di fosfolipidi si separano le une dalle altre, il movimento delle code aumenta drasticamente e il doppio strato va incontro ad una transizione fino alla fase fluida (fase liquido-cristallina). La temperatura responsabile di questa transizione di fase dipende dalla lunghezza delle code degli acidi grassi e dal loro grado di insaturazione. Maggiore sarà la lunghezza minore sarà la fluidità e viceversa. Questa relazione è data dal fatto che con l'aumentare della lunghezza delle code di acidi grassi aumenta la possibilità che si instaurino forze di Van der Waals tra le code adiacenti.

I fosfolipidi di membrana possono anche eseguire movimenti più o meno favoriti. Questi movimenti sono tutti spontanei, e sono: la rotazione attorno al proprio asse; la diffusione laterale; e il flip-flop, che consiste nella traslocazione di un fosfolipide da un foglietto all'altro della membrana. Quest'ultimo movimento può essere o no catalizzato da delle proteine chiamate appunto flippasi.

Effetti del colesterolo sulla fluidità

Il colesterolo limita i movimenti delle catene idrocarburidiche dei fosfolipidi determinando la riduzione della fluidità ad alte temperature. Al contempo, nelle situazioni di basse temperature, impedisce lo stretto compattamento delle code di acidi grassi, e quindi fa sì che non crei la fase di gel. In poche parole il colesterolo ha il duplice effetto di aumentare la fluidità della membrana cellulare a basse temperature e di diminuirla a quelle alte.

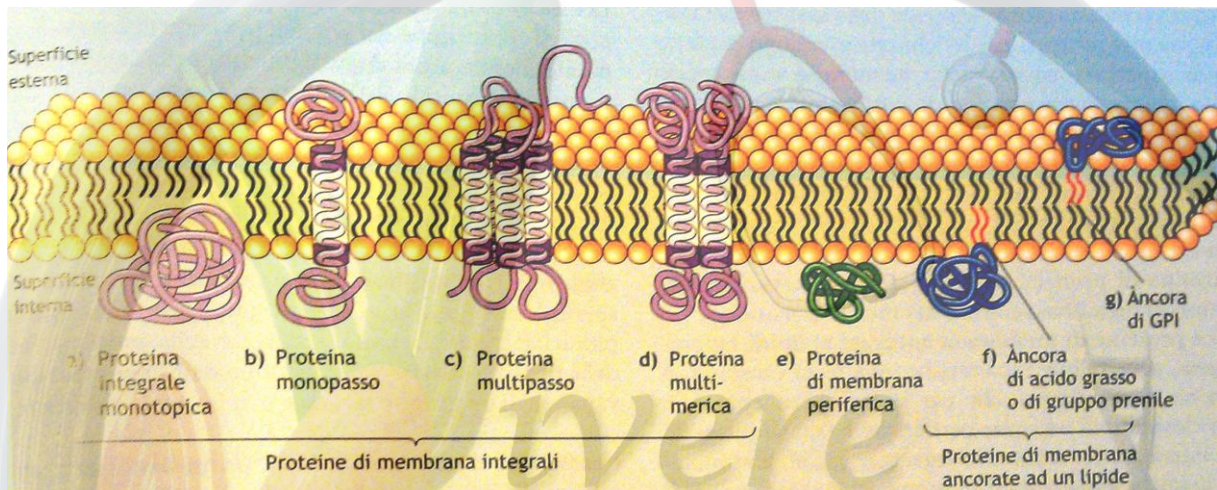
Zolle lipidiche della membrana plasmatica

Recentemente è stato evidenziato che lo strato fosfolipidico non si presenta in maniera omogenea, ma è piuttosto caratterizzato dalla presenza di domini lipidici meno fluidi, comunemente indicati con il nome di zolle lipidiche (raft). La minore fluidità di queste zone è praticamente dovuta alla maggiore presenza di colesterolo. Queste caratteristiche strutturali sono responsabili della formazione di una nuova fase denominata Zuckermann o liquido-ordinata, intermedia tra la fase cristallina e la fase liquida. Infatti, le catene di acidi grassi, seppur strettamente compattate conservano una grande mobilità laterale. È possibile distinguere due tipi di raft: le caveole, e i raft non invaginati. Le caveole appaiono come invaginazioni della membrana plasmatica strutturalmente stabilizzate dalla presenza di proteine di caveolina. I rafts non invaginati sono invece indistinguibili dal resto della zolla lipidica. Studi sperimentali hanno dimostrato che la maggior parte delle proteine con funzione recettoriale o di ligando hanno sede proprio nelle raft. Queste, che sporgono dal versante esterno delle membrane, sembrano essere associate a delle zolle corrispondenti sul versante interno. Il legame funzionale tra le zolle lipidiche esterne ed interne permette quindi l'interazione tra i recettori attivati e le proteine intracellulari.

PROTEINE DI MEMBRANA

La specificità funzionale delle membrane è assicurata dalla componente proteica. I domini proteici che sporgono sul versante extracellulare della membrana sono generalmente coinvolti nelle interazioni cellula-cellula, e/o nei processi di segnalazione; mentre i domini rivolti sul lato intracellulare spesso interagiscono con componenti citoscheletriche coinvolti nella trasduzione del segnale. Le proteine di membrana vengo classificate in:

- Integrali
- Periferiche
- Ancorate ai lipidi



Le *proteine integrali* sono denominate anche proteine intrinseche, perché presentano una o più regioni immerse e strettamente associate al doppio strato fosfolipidico. Quelle localizzate solo su un versante della membrana sono dette proteine integrali monotopiche. Molto più comuni sono invece quelle trans membrana, le quali attraversano il doppio foglietto e sporgono da entrambi i versanti dello stesso. La parte immersa tra le code idrofobiche dei fosfolipidi presenta una conformazione ad α -elica, o a β -foglietto ripiegato, con gruppi laterali idrofobici. Alcune di queste proteine attraversano il doppio strato una sola volta e sono dette monopasso, altre lo attraversano più volte e sono dette multipasso. Alcune proteine trans membrana sono associate tra loro in modo da formare delle strutture simili a pori, e sono pertanto chiamate porine. Esse formano dei canali, attraverso i quali selettivamente fanno filtrare delle sostanze.

Le *proteine periferiche* sono dette anche proteine estrinseche; e non interagiscono con la porzione centrale idrofobica del doppio strato fosfolipidico, ma sono solitamente legate alla membrana attraverso interazioni deboli con le proteine integrali di membrana o con le teste polari dei lipidi.

Le *proteine di membrana ancorate ai lipidi* non sono classificabili né come proteine periferiche né come integrali. Esse interagiscono attraverso i legami covalenti con molecole lipidiche appartenenti al doppio strato, quali acidi grassi o glicosilfosfatidilinositolo (GPI).

I CARBOIDRATI DI MEMBRANA

Le membrane cellulari sono anche caratterizzate dalla presenza di catene oligosaccaridi che esposte sul versante opposto a quello citoplasmatico. Nelle glicoproteine, gli oligosaccaridi si possono legare alla catena polipeptidica secondo due diverse modalità: nel primo caso si costituisce un legame denominato N-glicosidico tra lo zucchero ed un gruppo amminico $-NH_2$; nel secondo caso si costituisce un legame di tipo O-glicosidico instaurato tra lo zucchero ed il gruppo $-OH$ di una treonina o una serina. Glicoproteine e glicolipidi sono talmente abbondanti sulla superficie esterna della membrana cellulare che al microscopio elettronico la cellula risulta essere coperta da una sorta di rivestimento glucidico elettrondenso, detto glicocalice.

IL NUCLEO CELLULARE

Il nucleo rappresenta l'organulo più ampio e facilmente evidenziabile all'interno delle cellule eucariotiche. La sua presenza, come già detto, costituisce la differenza principale tra le cellule procariotiche e quelle eucariotiche. È generalmente di forma rotondeggiante, e nelle cellule animali è frequentemente localizzato nella regione centrale del citoplasma. Il nucleo costituisce la sede dell'informazione genetica visto che in esso risiedono le molecole di DNA che, sempre al suo interno, queste sono duplicate e trascritte; considerato il ruolo e la valenza del DNA il nucleo può essere considerato come il centro di coordinazione dell'intera cellula. Nel nucleo, molecole lunghissime di DNA sono associate a proteine venendo a costituire la sostanza cromatinica, o *cromatina*, che durante la divisione cellulare grazie ad una serie di ripiegamenti si compatta in unità strutturali distinte dette cromosomi. All'interno del nucleo sono presenti molte molecole tra cui proteine, enzimi, RNA, e tante altre componenti coinvolte nel processo di duplicazione del materiale genetico, nella sintesi delle molecole di RNA. Per tanto si assiste ad un continuo passaggio di molecole dal nucleo al citoplasma e viceversa. Esistono infatti dei meccanismi che partecipano a quel via vai di molecole che costituisce quel complesso di interrelazioni che comunemente viene citato come dialogo tra nucleo e citoplasma.

Involucro nucleare

Al microscopio elettronico il nucleo appare come delimitato da una doppia membrana, l'involucro nucleare, o carioteca, che racchiude il nucleoplasma. Le due membrane, nucleare esterna ed interna, non sono strettamente aderenti, ma sono separate da uno spazio perinucleare. La membrana esterna è continua con il sistema di membrane interno al citoplasma, il RER. L'involucro nucleare non è un limite continuo, infatti le due membrane in certi punti si fondono determinando uno spazio libero che assume la forma di un canale che viene indicato come poro nucleare. I pori nucleari non sono dei semplici canali o delle semplici interruzioni dell'involucro nucleare, perché in ciascun canale è presente una struttura altamente organizzata e complessa di natura proteica. Questa struttura così specializzata, che permette le comunicazioni tra il nucleo ed il citoplasma è chiamata complesso del poro nucleare (NCP), mentre per identificare il vero e proprio poro e le proteine anello viene usato il nome *porosoma*. Il complesso del poro nucleare presenta una organizzazione ottagonale, infatti è costituito da otto proteine che protrudono sul versante citoplasmatico e sul versante nucleoplasmatico. Oltre a queste otto sub unità, sono presenti altre strutture, tra cui un trasportatore responsabile del movimento delle macromolecole attraverso il poro. Ci sono poi proteine che si estendono dal bordo verso lo spazio

perinucleare e si ritiene che possano fungere da ancoraggio per tutto il complesso. In oltre, otto fibre si estendo dagli anelli sia verso il citosol che verso il nucleoplasma, che formano all'interno del nucleo una specie di cesto. La classe più abbondante di proteine del poro è costituito dalle *nucleoporine*.

Trasporto attraverso i pori nucleari

Un numero elevato di proteine nucleari sono sintetizzate nel citoplasma e devono entrare nel nucleo per intervenire nei fondamentali processi di duplicazione del DNA e di trascrizione dell'RNA. Al contrario, molecole di RNA di diverso tipo e ribosomi devono percorrere la via inversa. Nel nucleo, più precisamente nel nucleolo, si attua anche la biogenesi dei ribosomi, *organuli* costituiti da RNA ribosomale e proteine che vengono assemblati in due distinte sub unità. Queste attraversano l'involucro nucleare passando nel citoplasma ove, al momento della sintesi proteica, formeranno un'unica struttura funzionale. Il trasporto dal nucleo al citoplasma e viceversa avviene con un ritmo piuttosto elevato. Attraverso il complesso del poro nucleare avvengono due tipi di passaggio: trasporto passivo, che riguarda ioni e piccole molecole; e trasporto attivo, selettivo, dispendioso in termini di ATP.

Lamina nucleare

Il nucleo ed il complesso del poro nucleare mantengono la loro forma anche quando vengono isolati trattati con detergenti non ionici per l'estrazione di lipidi e proteine. Una tale conservazione morfologica e strutturale è dovuta ad una sottile e densa rete di proteine altamente insolubili adesa al versante nucleo plasmatico della membrana interna dell'involucro nucleare. Questa struttura è chiamata lamina nucleare. È difficilmente visualizzabile nelle micrografie elettroniche perché viene mascherata dalla cromatina ad essa adesa. La lamina nucleare è composta da tre tipi di polipeptidi definiti lamine nucleari A, B e C. Le lamine A e C sono molto simili strutturalmente ai filamenti intermedi del citoscheletro; la lamina B differisce dalle altre due ed è strettamente associata alla membrana interna della carioteca. La lamina nucleare svolge funzione di sostegno, e da sito di attacco per i telomeri dei cromosomi durante la meiosi.

Matrice nucleare

Un'estesa matrice fibrogranulare insolubile sembra costituire un nucleo scheletro che partecipa a mantenere la forma del nucleo. Queste rete, denominata matrice nucleare, costituisce un'impalcatura a cui si associano strettamente le fibre di cromatina per la propria organizzazione strutturale, e funge peraltro da ancoraggio per i enti proteici che sono coinvolti nei processi di duplicazione e trascrizione.

Cromatina e cromosomi

Sia nei procarioti che negli eucarioti il DNA contiene l'informazione genetica codificante per la specifica sequenza amminoacidica di tutte le proteine che sono necessarie per la vita della cellula. Negli eucarioti, il DNA genomico è contenuto nel nucleo ed è rappresentato da più molecole di forma bastoncellare. Quando le cellule si apprestano a dividersi queste molecole associatesi a specifiche proteine, risultano visibili al microscopio ottico in quanto si impacchettano in strutture cui è stata attribuita la denominazione di cromosomi, per la loro proprietà di colorarsi intensamente con coloranti basici. Ad eccezione però del periodo in cui la cellula non è in divisione: i suoi cromosomi sono normalmente presenti in forma rilassata e distata, che noi chiamiamo cromatina. La cromatina è l'insieme di DNA proteine ed RNA. Questa organizzazione rilassata fa sì che altre proteine possano

giungere e legarsi a specifiche sequenze nucleotidiche del DNA permettendone sia l'espressione che la regolazione. La cromatina risulta visibile come masse mediamente dense distribuite irregolarmente. Tale materiale cromatinico è comunque distinto due forme corrispondenti ad un diverso stadio di aggregazione. Lo stato lasso, e quindi codificante, è chiamato eucromatina; lo stato compattato, e quindi silente, è chiamato eterocromatina.

Nucleolo

Il nucleolo è una regione a morfologia variabile che si colora molto intensamente e rappresenta la componente strutturale meglio caratterizzata del nucleo eucariotico sebbene non sia sempre presente nella cellula. I nucleoli al microscopio elettronico appaiono non circondati da membrana ma con contorni sufficientemente definiti; essi presentano due regioni distinte: una fibrillare ed una granulare. La regione fibrillare è costituita da una specifica regione del DNA, responsabile della trascrizione dei filamenti di rRNA, ed i relativi fattori di trascrizione. Quindi la componente fibrillare corrisponde a geni ribosomali trascrizionalmente attivi e quindi presenti sotto forma di cromatina poco condensata. La componente granulare è costituita da particelle ribosomali in vari stadi di assemblaggio, il nucleolo infatti è la sede di sintesi dei ribosomi. Le proteine ribosomali sono prodotte nel citoplasma e traversando la membrana nucleare arrivano nel nucleolo, dove si associano agli rRNA neo sintetizzati. Dal nucleolo, le singole unità ribosomali vengono esportate nel citoplasma attraverso i pori nucleari.

Nucleoplasma

Il nucleoplasma non è un mezzo omogeneo in cui sono immersi il nucleolo e la cromatina. Piuttosto il nucleo sembra essere organizzato in sub-domini strutturali, che si pensa rappresentino una vera e propria compartimentalizzazione funzionale. Grazie a tecniche quali la FISH e la microscopia confocale, sappiamo che le fibre di cromatina che costituiscono un particolare cromosoma non sono disperse all'interno del nucleo, ma bensì risiedono in una determinata regione del nucleo che non si sovrappone mai ad altri domini nucleici. La sintesi degli RNA e la loro maturazione avvengono in numerosi siti sparsi in tutto il nucleoplasma. Questi siti corrispondono a quelle strutture chiamate fibrille pericromatiniche. Esse infatti contengono diversi enzimi necessari per la maturazione dell'RNA. Il nucleo è un compartimento organizzato in cui i geni attivamente trascritti sono interdistribuiti: l'uso del microscopio a fluorescenza e di anticorpi anti-fattori di splicing ha evidenziato che tali fattori non sono distribuiti omogeneamente, ma vengono associati a strutture discrete nominate speckle (macchioline) distinguibili come piccoli agglomerati brillanti su un fondo nucleoplasmatico colorato in maniera uniforme. Le speckle corrisponderebbero a dei cluster di granuli di intercromatina che sono distribuiti tra i vari domini intercromosomici. In questi domini intercromosomici si possono identificare da uno a dieci corpi di Cajal, strutture compattate che possono essere visualizzate al MET come piccole sfere di strutture filamentose aggrovigliate; non è ancora ben chiaro quale possa essere il loro ruolo funzionale. I corpi di Cajal si disperdono quando la trascrizione e lo splicing sono bloccati. Sono stati caratterizzati altri tipi di corpuscoli nucleari che si presume abbiano ruoli nel processo di maturazione degli RNA.

RETICOLO ENDOPLASMATICO

Nel citoplasma delle cellule eucariotiche si sviluppa un sistema di membrane con evidente organizzazione in cisterne, sacculi, e canalicoli. Si vide che tale sistema era presente nel citoplasma di cellule coinvolte nella secrezione e che al microscopio ottico era visibile in quanto si colorava intensamente con coloranti basici. A tale sistema fu dato il nome di ergastoplasma. Per il suo aspetto generalmente reticolare è stato denominato reticolo endoplasmatico (RE). I singoli elementi del RE includono tubuli o sacculi più o meno appiattiti, le cisterne, anastomizzati tra loro che si estendono dall'involucro nucleare alla superficie cellulare. Ovviamente ognuno di questi elemento membranosi delimita al proprio interno uno spazio che costituisce il lume delle singole strutture. Le cisterne del re rappresentano il complesso più esteso e sono distinguibili in RER e REL. In oltre si può riscontrare anche il reticolo endoplasmatico transizionale. Questi diverso compartimento sono distinguibili, ma in alcuni punti possono unirsi a formare un canale interno continuo. La presenza di tali sistemi comporta una suddivisione del citoplasma in due compartimenti distinti: quello interno alle cisterne e quello esterno del citosol. Il re, comunque, non rappresenta un compartimento isolato dal resto della cellula: esiste infatti una contiguità funzionale con le tre strutture membranose, un sistema di collegamento continuo rappresentato da vescicole che si formano, mirano e si fondono in altre regioni. Tra il re ed il resto della cellula si verifica un continuo scambio di attraverso le membrane delle cisterne, mentre per mezzo della rete di canalicoli si realizza il trasporto di sostanze e la loro distribuzione in tutti il citoplasma. A volte si osserva anche una continuità diretta tra le membrane del RER e la membrana nucleare esterna. Si è allora dimostrato che la presenza di numerose e differenti classi di proteine permette al re di attuare diverse funzioni tramite le sue tre sub strutture , fondamentalmente: sintesi, modificazione e distribuzione di proteine e lipidi.

Reticolo endoplasmatico rugoso (RER)

È costituito da una serie di canalicoli e cisterne ricoperti sulla superficie citoplasmatica da ribosomi. I numerosissimi ribosomi conferiscono a questo reticolato l'aspetto ruvido o rugoso. La presenza di ribosomi caratterizza quindi la principale funzione di queste strutture che sono specializzate per la sintesi di proteine ed, in particolare, di quelle che sono destinate ad essere esportate in regioni correlate al RE, quali il complesso di Golgi, i lisosomi e le vescicole di accumulo e di secrezione. Dopo la sintesi, nella maggior parte delle cellule eucariotiche le proteine rilasciate nel lume delle cisterne subiscono rimaneggiamenti e vanno incontro a ripiegamenti specifici e comunque alla strutturazione definitiva. In particolare le proteine sintetizzate nei ribosomi associati al RER possono subire alcune modificazioni, tra cui la N-glicosilazione (aggiunta di un oligosaccaride al gruppo N-terminale nei residui di asparagina); la O-glicosilazione (aggiunta di un oligosaccaride agli ossidrili di serina o treonina), che avviene principalmente nel Golgi; o l'idrossilazione, che porta alla modificazione degli amminoacidi prolina o lisina. Altre reazioni che si svolgono nel lume delle cisterne modificano le catene polipeptidiche neo sintetizzate in modo che possano assumere la propria conformazione definitiva rendendole in tal modo funzionali e pronte per il rilascio.

Reticolo endoplasmatico liscio (REL)

È costituito da membrane e si presenta generalmente sotto forma di tubuli privi di ribosomi; nelle sue membrane sono inclusi diversi enzimi che intervengono nella sintesi di steroidi a partire dal colesterolo, di fosfolipidi, di glicolipidi e carboidrati. Nel REL, vengono sintetizzati i triacilgliceroli che poi si accumulano in ampie strutture di natura lipidica, a forma di goccia. Ma il REL è soprattutto coinvolto nella sintesi dei fosfolipidi che faranno parte di tutte le membrane cellulari, comprese quelle dello stesso reticolo. Nei tessuti di alcuni particolari organi, le cellule mostrano una rilevante presenza del REL, perché coinvolto anche nel metabolismo di sostanze estranee: esso infatti è anche deputato alla detossificazione da farmaci quali anfetamine, morfina, barbiturici, tossine e pesticidi. Come conseguenza di tali reazioni si ha un incremento della solubilità in acqua del composto originale, consentendo che lo stesso venga trasportato al rene ed escreto con le urine; in caso contrario la loro idrofobicità li farebbe accumulare nei grassi corporei. In molte cellule il REL sequestra il Ca^{++} dal citosol, lo libera nello stesso per poi riassorbirlo; ciò consente alla cellula di rispondere rapidamente ai vari segnali extracellulari. L'estensione di questo sistema membranoso dipende dalle funzioni delle cellule; si osservano ampie variazioni relative alla quantità ed estensione dell'uno o dell'altro tipo di RE, ma anche alle loro componenti tubulari e cisterne. Infatti sono ricche in RER le cellule dedicate alla secrezione regolata di proteine come le cellule esocrine del pancreas; similmente per quanto riguarda il REL, sito principale della biosintesi di lipidi è abbondante nelle cellule endocrine che sintetizzano ormoni steroidei, e quindi nel testicolo e nella corticale del surrene. Nelle cellule muscolari proprio per la necessità di accumulare e rilasciare Ca^{++} , al fine di controllare la contrazione, si sono sviluppati ed espansi gli elementi del REL, che qui formano il reticolo sarcoplasmatico, in cui vengono concentrate proteine che legano il calcio (calsequestrine); questo verrà rilasciato dalle stesse proteine per consentire la contrazione solo in seguito a segnali extracellulari provenienti ad esempio dalle cellule nervose. Ancora il REL è coinvolto nel metabolismo dei carboidrati, e soprattutto nelle cellule del fegato, organi in cui si accumula glicogeno e da cui viene rilasciato il glucosio (molecola che fornisce energia che può essere rapidamente utilizzata) quando l'organismo ne ha necessità. Infatti il glicogeno viene degradato in glucosio-6-fosfato, che non può essere rilasciato nel circolo sanguigno perché le membrane sono impermeabili ai glucidi fosforilati. Proteine, lipidi, oligosaccaridi che sono sintetizzati sul versante citoplasmatico del RE, si trasferiscono attraverso il doppio strato delle membrane per essere sversati nel lume, ovvero per essere inseriti parzialmente nelle stesse membrane. Tutto ciò avviene in maniera molto rapida o addirittura mentre le proteine vengono sintetizzate, perché il sistema molecolare prevede dei meccanismi di riconoscimento proprio per quelle proteine che andranno a far parte del RE e la cui sintesi inizia nel citoplasma.

Reticolo endoplasmatico transazionale

In questa sezione di reticolo endoplasmatico si producono delle vescicole che gemmano e trasportano il loro carico all'apparato di Golgi.

RIBOSOMI

I ribosomi sono presenti sia nelle cellule procariotiche che in quelle eucariotiche; si tratta di strutture prive di membrana costituite da complessi fortemente interconnessi di proteine ed RNA, questi ultimi, denominati, per la loro specificità RNA ribosomali, o rRNA. I ribosomi sono organuli visibili al microscopio elettronico. In effetti la loro dimensione viene comunemente espressa in base al loro coefficiente di sedimentazione, cioè in unità di Swedberg (S), unità che misura la densità di un organulo

cellulare o una macromolecola verificando il punto in cui sedimenta mediante ultracentrifugazione in gradiente di densità. La dimensione dei ribosomi procariotici ed eucariotici viene espressa rispettivamente con 70S e 80S. ciascun ribosoma è composto da due sub unità, una maggiore ed una minore, che differiscono per dimensione e composizione. Le due sub unità si associano a formare il ribosoma funzionale dopo che ad esso si lega un RNA messaggero che specifica la relativa sequenza di amminoacidi della proteina da sintetizzare. I ribosomi non sono semplicemente il sito in cui avviene la sintesi delle catene polipeptidiche, ma essi partecipano attivamente a questa tappa fondamentale della vita cellulare. I ribosomi che sono presenti in gran numero sia nelle cellule procariotiche, che ne possono contenere migliaia, sia in quelle eucariotiche, che addirittura possono arrivare a contenerne centinaia di migliaia, sono anche presenti nei mitocondri e nei cloroplasti, dove sono responsabili della sintesi delle poche ma specifiche proteine di questi organuli. I ribosomi nelle cellule eucariotiche possono essere liberi nel citoplasma o adesi alle membrane del RER, e alla membrana esterna dell'involucro nucleare. Nei ribosomi liberi avviene la sintesi di quelle proteine che rimangono nel citoplasma, e ne costituiscono parte integrante; i ribosomi aderenti agli elementi membranari invece sono responsabili delle proteine che faranno parte delle membrane o che entreranno nelle cisterne del RER per essere racchiuse in vescicole e poi essere raccolte nel citoplasma, o che andranno ad essere secrete dalla cellula.

MITOCONDRI

I mitocondri sono organuli dalla tipica forma bastoncellare o a fagiolo, la cui dimensione è simile a quella di un batterio, e si trovano, tranne poche eccezioni, in tutte le cellule eucariotiche, sia animali che vegetali, nei funghi, e nei protisti. Essi, insieme ai cloroplasti, rappresentano i compartimenti della cellula eucariotica specializzati nella produzione di energia immediatamente utilizzabile per il metabolismo: sono infatti deputati alla produzione di molecole di **adenosin-tri-fosfato ATP**. I mitocondri contengono la maggior parte del corredo metabolico necessario per effettuare la "respirazione cellulare", quel processo che utilizza ossigeno molecolare insieme alle molecole organiche per generare ATP, acqua e anidride carbonica. Se osservati al microscopio i mitocondri appaiono delimitati da una doppia membrana, una esterna ed una interna, separate da uno spazio intermembranario. La membrana interna forma delle estroflessioni che si estendono all'interno dell'organulo nella cosiddetta matrice mitocondriale, una componente di consistenza gelatinosa a causa della sua alta concentrazione di proteine; tali estroflessioni, dette creste mitocondriali, di solito sono lamellari o appiattite, ma talvolta anche tubulari. La matrice mitocondriale e la membrana interna rappresentano le principali componenti funzionali del mitocondrio. Infatti, gli enzimi e le proteine carrier, che intervengono nel metabolismo ossidativo e nella fosforilazione, sono localizzati all'interno della matrice della membrana interna. La membrana interna ha una composizione diversa da quella esterna: la superficie della membrana esterna è liscia, mentre quella della membrana interna è coperta da particelle, ciò a conferma delle differenti funzioni svolte dalle due membrane. Inoltre, se si sottopongono i mitocondri purificati a procedure blande di frazionamento, si separano i componenti per centrifugazione differenziale e si riesce a determinare la composizione chimica di ciascuna membrana e degli spazi da esse delimitati. Anche la composizione lipidica è particolare in quanto manca di molecole di colesterolo, mentre è presente un insolito fosfolipide, la cardiolipina. La membrana interna è impermeabile alla maggior parte di ioni e piccole molecole e costituisce una vera e propria barriera, a differenza della membrana esterna che è invece provvista di proteine, le porine, strutturate in modo da formare canali attraverso i quali possano passare molecole con dimensioni fino a 5000Da. Come conseguenza, la composizione dello spazio intermembranario risulta simile a quella

citoplasmatica. Mentre la matrice, cioè la parte interna dell'organulo, costituisce un compartimento a se stante. Le proteine provenienti dal citosol destinate alla matrice o alle creste mitocondriali, sono sintetizzate su ribosomi liberi, ed il loro trasferimento ai mitocondri risulta favorito dalla presenza di specifiche sequenze ammino-terminali; le catene polipeptidiche, tramite tali sequenze, si legano dapprima a recettori specifici posti sulla membrana esterna, per poi essere trasferiti alla membrana interna (sistema TOM/TIM). I mitocondri sono organuli che posseggono un proprio genoma costituito da una singola molecola circolare di DNA; esso specifica per la sintesi di alcuni tRNA, rRNA ed lacune proteine mitocondriali essenziali per il metabolismo ossidativo. Così il mitocondrio all'interno della cellula gode di una parziale autonomia possedendo una propria informazione genetica, specifica per proteine specifiche. Queste proteine sono sintetizzate proprio all'interno del mitocondrio grazie alla presenza di un proprio sistema di trascrizione e di traduzione, ribosomi compresi; la maggior parte delle proteine che costituiscono i mitocondri sono tuttavia importate dal citosol, perché specificate dal genoma nucleare. I mitocondri hanno la capacità di dividersi per scissione, raddoppiando il loro numero e distribuendosi nelle cellule neo formate in seguito alla divisione di una cellula madre. La duplicazione dei mitocondri e l'espressione dei loro geni sono controllate e regolate dal genoma nucleare, perché molte delle proteine necessarie per tali processi vengono prodotte sui ribosomi citoplasmatici; a volte i mitocondri sono localizzati in regioni particolari: per esempio nella coda dello spermatozoo può essere presente una guaina di mitocondri oppure, come avviene nella marmotta, un solo mitocondrio è strettamente avvolto attorno l'assonema. I mitocondri sono organuli plastici in grado di cambiare forma e posizione, spostandosi nel citoplasma, associati ad elementi del citoscheletro; in relazione alle specifiche funzioni cellulari vanno incontro a rapide modificazioni. Sezioni seriali di alcuni tipi cellulari mostrano che i profili ovali osservati possono essere ricondotti ad un unico mitocondrio ramificato; allora nelle cellule sarebbe presente un numero minore di mitocondri, ma di dimensioni maggiori rispetto a quando si osserva generalmente nelle microfotografie elettroniche e comunque organizzati a formare un'unica ed estesa rete mitocondriale dinamica. È stato ipotizzato che i mitocondri si siano originati da batteri che, inglobati da cellule più grandi, si siano poi stabiliti permanentemente all'interno del loro citoplasma instaurando un rapporto simbiotico; la scoperta che entrambi questi organuli, anche i cloroplasti, posseggono acidi nucleici ha avvalorato maggiormente la teoria dell'endosimbiosi, secondo la quale alcuni organuli si sarebbero evoluti grazie al vantaggio determinato dal rapporto di simbiosi. Secondo questa teoria il procariote inglobato avrebbe fornito alla cellula ospite dei vantaggi grazie alle proprie capacità metaboliche; in particolare si ritiene che i mitocondri possano essere derivati da batteri capaci di attuare il metabolismo ossidativo, mentre i cloroplasti potrebbero essere derivati da batteri foto sintetici. Dal loro canto, questi batteri inglobati avrebbero ricevuto dalla cellula ospite nutrimento e protezione.

Diverse osservazioni favoriscono l'avvalorarsi della tesi endosimbiontica:

- I mitocondri sono circondati da una doppia membrana; la membrana interna sarebbe quella del procariote originario, quella esterna sarebbe la membrana plasmatica della cellula ospite; le creste possono essere considerate strutture analoghe alle inflessioni di membrana che si trovano in molte famiglie di batteri
- Le dimensioni dei mitocondri sono dello stesso ordine di grandezza delle cellule procariotiche
- La struttura e le dimensioni dei ribosomi mitocondriali sono analoghe a quelle dei procarioti
- Sia i mitocondri che i cloroplasti contengono una molecola circolare di DNA

- I mitocondri, così come i procarioti, si dividono per semplice scissione
- La duplicazione del DNA mitocondriale avviene con modalità simili a quelle procariotiche
- Diverse sequenze nucleotidiche degli rRNA mitocondriali sono riconducibili a quelle di alcuni batteri

IL COMPLESSO DEL GOLGI

L'apparato del Golgi, si presenta come una serie di compartimenti o **sacculi** membranosi appiattiti, ordinati a formare una pila leggermente ricurva. Queste pile di sacculi, in genere da 3 a 8, occupano tipicamente la regione perinucleare del citoplasma e sono circondate da numerose vescicole e tubuli. L'apparato di Golgi può essere una singola, continua pila che circonda il nucleo, oppure può essere costituito da un gruppo compatto di sacculi impilati su un lato del nucleo; in particolare, nelle cellule in attiva fase secretiva, quest'organulo appare molto esteso. Questo complesso di sacculi funziona immagazzinando, impacchettando e distribuendo molecole, già sintetizzate in diverse regioni della cellula, e che devono essere utilizzate altrove. Si tratta di una struttura dinamica caratterizzata da un turn-over di costante che è direttamente correlato all'ampio flusso di proteine e lipidi provenienti dal RE. Nell'apparato del Golgi è possibile distinguere un fronte e un retro, due lati opposti, definiti rispettivamente **cis** e **trans** Golgi, che presentano una differente composizione delle relative membrane. In generale il materiale trasportato da vescicole provenienti dal RE arriva alle cisterne **cis** del Golgi, da dove vescicole spola partono per le altre regioni golgiane. Questi due ambiti strutturali assumono un aspetto reticolare per cui sono state definite rispettivamente **trans-Golgi-network (TGN)** e **cis-Golgi-network (CGN)**; in posizione intermedia si trovano le cosiddette cisterne mediali. Le cisterne posizionate nelle due facce del complesso si differenziano per forma, a volte dimensioni, contenuto, numero di vescicole associate ma soprattutto attività enzimatica. Le molecole che passano da un fronte all'altro del Golgi vengono modificate: le più comuni modifiche consistono nella modifica di amminoacidi, nell'aggiunta di piccole catene di zuccheri per formare glicoproteine o glicolipidi. Reazioni di solfatazione, acetilazione, deaminazione possono avvenire grazie alla presenza di enzimi specifici. Esiste una specifica correlazione tra gli eventi maturativi e la posizione degli enzimi nelle cisterne della pila, secondo una direzione che va dal lato **cis** al **trans**. L'apparato del Golgi interviene anche nel rimaneggiamento dei lipidi: in particolare nella sintesi dei glicolipidi e della sferingomielina. Esso inoltre provvede anche alla sintesi di polisaccaridi complessi come i glucosaminoglicani, tra cui l'acido ialuronico. Le molecole nuove, in quando modificate, vengono raccolte nelle cisterne dell'apparato, in particolare nelle estremità che si dilatano e che frequentemente si separano con una vera e propria gemmazione; si costituiscono così le vescicole di trasporto che si avviano verso la membrana plasmatica sia per scaricare il contenuto, sia per andare incontro ai meccanismi di secrezione, ovvero si dirigono verso varie direzioni della cellula. Le vescicole che si formano per gemmazione, periodicamente si fondono alle estremità delle cisterne successive. Molte di queste vescicole sono rivestite, sul lato citosolico, da proteine che, tra l'altro, permettono la curvatura della membrana; la composizione del rivestimento dipende dal ruolo della vescicola, per cui esistono diverse proteine di rivestimento (**COP I** e **COP II**). Va comunque detto che il meccanismo con cui le vescicole si muovono attraverso il Golgi non è del tutto chiaro, ma in particolare due sono le teorie più accreditate. Secondo il modello delle cisterne stazionarie ciascun compartimento ha strutture e composizione stabile; il traffico tra le cisterne è favorito da alcune delle vescicole, di cui si è appena detto, indicate come vescicole spola, o navetta, in quanto si formano e si fondono passando da una cisterna all'altra; invece secondo il modello

di maturazione delle cisterne, queste rappresenterebbero delle strutture transitorie che si formano e mano a mano si spostano in direzione cis-mediana-trans. È ragionevole ritenere che i due modelli non si escludano a vicenda. Altri dati sperimentali hanno prospettato la possibilità di una direzione di spostamento del materiale dalle regioni trans alle regioni cis del Golgi; tali evidenze appaiono in contrapposizione con quanto illustrato precedentemente secondo cui il movimento seguirebbe un flusso cis-trans. In effetti, il modello del flusso retrogrado è stato dimostrato per le proteine specifiche del RE che vanno al Golgi, per essere modificate e poi tornare in sede. I meccanismi di smistamento delle molecole elaborate nell'apparato di Golgi sono significativamente complessi perché numerose sono le direzioni e le destinazioni. Le molecole dirette verso la membrana plasmatica, perché destinate a farne parte, seguono la via della *secrezione costitutiva*, mentre le vescicole che contengono proteine dirette all'esterno della cellula possono seguire la via della *secrezione regolata*. Ancora segnali di tipo diverso fanno parte di quelle proteine che sono trattenute nel Golgi perché residenti funzionalmente in esso, segnali che impediscono a tali proteine di essere inserite in vescicole di trasporto.

LISOSOMI

Sono organuli che svolgono la funzione di strutture digestive, infatti all'interno di essi si accumulano degli enzimi idrolitici, da qui la denominazione di lisosoma. Si tratta infatti di idrolasi acide, le cui condizioni ideali di attività si hanno attorno a pH 5,0. L'altra concentrazione di idrogenioni all'interno dei lisosomi viene mantenuta grazie ad una pompa protonica ATP dipendente, presente nella membrana che limita l'organulo, che trasferisce continuamente ioni H^+ dal citosol all'interno del lisosoma. Gli enzimi idrolitici e i componenti della stessa membrana sono sintetizzati al livello del RER, successivamente trasferiti nell'apparato del Golgi, lato cis, per l'ulteriore rielaborazione; qui, all'estremità N-terminale già legata ad oligosaccaridi vengono aggiunti zuccheri quali il mannosio-6-fosfato, che viene riconosciuto come segnale da un recettore posto nelle cisterne trans del Golgi. Da qui gemmano le vescicole che contengono gli enzimi lisosomali. I lisosomi funzionalmente inattivi, denominati lisosomi primari, non hanno pH acido fino a quando non si fondono con un vacuolo alimentare, o altro materiale da digerire. In questo caso il lisosoma viene definito lisosoma secondario. Negli organismi pluricellulari i lisosomi sono utilizzati nei processi di eterofagia, che consentono di ricavare nutrimento da piccoli organismi e particelle inglobati in vacuoli alimentari tramite fenomeni endocitotici. Le singole cellule sfruttano i lisosomi anche per la digestione di propri organuli divenuti vecchi o non più necessari o danneggiati, i cui componenti vengono però riciclati: si tratta di un meccanismo detto autofagia; infatti il materiale da eliminare viene avvolto da membrane derivate dal RE formando una vescicola che si fonde con un lisosoma originando l'autofagosoma al cui interno avverrà la digestione. In questo modo si opera un rinnovamento interno. In seguito all'attività di digestione il materiale non degradabile può rimanere all'interno dei lisosomi che si trasformano nei cosiddetti corpi residui, i quali, fondendosi con la membrana plasmatica possono espellere il materiale non ingerito all'esterno della cellula, come avviene, per esempio, nei protozoi. A volte però, l'assenza di tale processo determina l'accumulo dei corpi residui nel citoplasma; tale condizione che si rileva in alcune cellule a vita lunga, quali i neuroni, sembrerebbe contribuire al loro invecchiamento. In casi piuttosto rari, i lisosomi possono effettuare una digestione extracellulare liberando i propri enzimi al di fuori della cellula; è quanto avviene, per esempio durante la fecondazione delle uova quando gli enzimi lisosomali accumulati nell'acrosoma dello spermatozoo vengono liberati per digerire e superare la barriera dei rivestimenti dell'ovocita.

PEROSSISOMI

Gli enzimi ossidativi, contenuti nei perossisomi, intervengono in vari processi metabolici a seconda dei differenti tessuti in cui si trovano. La caratteristica di questi organuli è la presenza di alcuni enzimi, quali *l'ossalasi, urato ossidasi, amminoacido ossidasi, glicolattossidasi*. Il 15% circa degli enzimi presenti nei perossisomi è costituito dall'enzima catalasi, che interviene nella neutralizzazione dell'acqua ossigenata convertendola in acqua ed ossigeno molecolare. In questo modo all'interno di un singolo perossisoma si produce e si degrada l'acqua ossigenata. Nelle cellule del fegato e dei reni, dove sono particolarmente abbondanti, i perossisomi svolgono ancora azione detossificante nei confronti di alcoli e altri composti tossici come formaldeide, nitriti e fenoli. A differenza dei lisosomi che si originano dal sistema di endomembrane, la biogenesi dei perossisomi si attua con un meccanismo che prevede anche una fase di divisione; per questa proprietà essi apparirebbero simili a mitocondri e cloroplasti, ma non posseggono acidi nucleici, e non vi sono evidenze di una loro origine da progenitori endosimbionti. In effetti in ciascuna cellula i perossisomi deriverebbero o dalla crescita e divisione degli organuli preesistenti o da sintesi de novo a partire da vescicole pre-perossisomiali. Praticamente questi veri e propri contenitori di sistemi enzimatici specifici grazie alla diversa distribuzione di tali molecole ed al fatto che sono delimitati da membrane, permettono alle cellule non solo di organizzare il proprio metabolismo, ma anche di evitare che si verifichi la liberazione nel citoplasma di enzimi che potrebbero intervenire in maniera inopportuna ed in momenti non adatti provocando "corto-circuiti" nelle attività citoplasmatiche. Alcuni difetti nella biogenesi dei perossisomi possono determinare patologie anche se ancora non ben note. La sindrome di Zellweger (ZS) è una rara malattia ereditaria caratterizzata da anomalie neurologiche, visive e del fegato che portano alla morte nella prima infanzia. Le cellule dei pazienti affetti da tale patologia presentano perossisomi svuotati perché privi dei loro enzimi che, pur essendo sintetizzati nel citosol, non possono essere importati all'interno degli organuli per un difetto nei relativi recettori o in qualche componente del sistema di trasporto.

CITOSCHELETRO

Nel citoplasma delle cellule eucariotiche è presente una rete di fibre di natura proteica che fa da supporto meccanico alla cellula, ne determina e mantiene la forma resistendo alla deformazione, trasmette forza meccanica, funge da ancoraggio per gli organuli che non si muovono liberamente all'interno del citoplasma ma sono guidati da alcune di queste fibre. L'insieme di queste fibre viene indicato con il termine di citoscheletro; esso risulta indispensabile soprattutto nelle cellule animali che a differenza delle cellule vegetali sono provviste di parete cellulare rigida. Gli studi condotti sul citoscheletro hanno evidenziato che si tratta di un sistema stabile ed allo stesso tempo dinamico che si rinnova costantemente, che può modificarsi rapidamente nel giro di pochi secondi, grazie a reazioni di polimerizzazione. Le diverse fibre che compongono questo sistema sono dei polimeri che si costituiscono a partire da sub unità proteiche che si attraggono chimicamente e si assemblano spontaneamente in lunghe catene, e allo stesso modo, si disassemblano. La natura dinamica dei

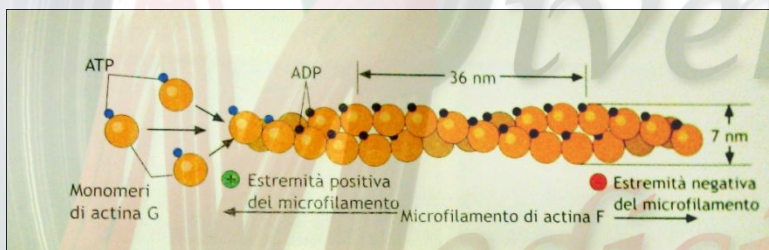
polimeri del citoscheletro permette alle cellule di cambiare forma rapidamente, nel giro di pochi secondi. Le proteine che lo compongono possono essere estratte dalle cellule, separate ed identificate;

il citoscheletro risulta costituito da tre tipi di strutture fibrose, ciascuna con proprietà meccaniche e dinamiche distinte:

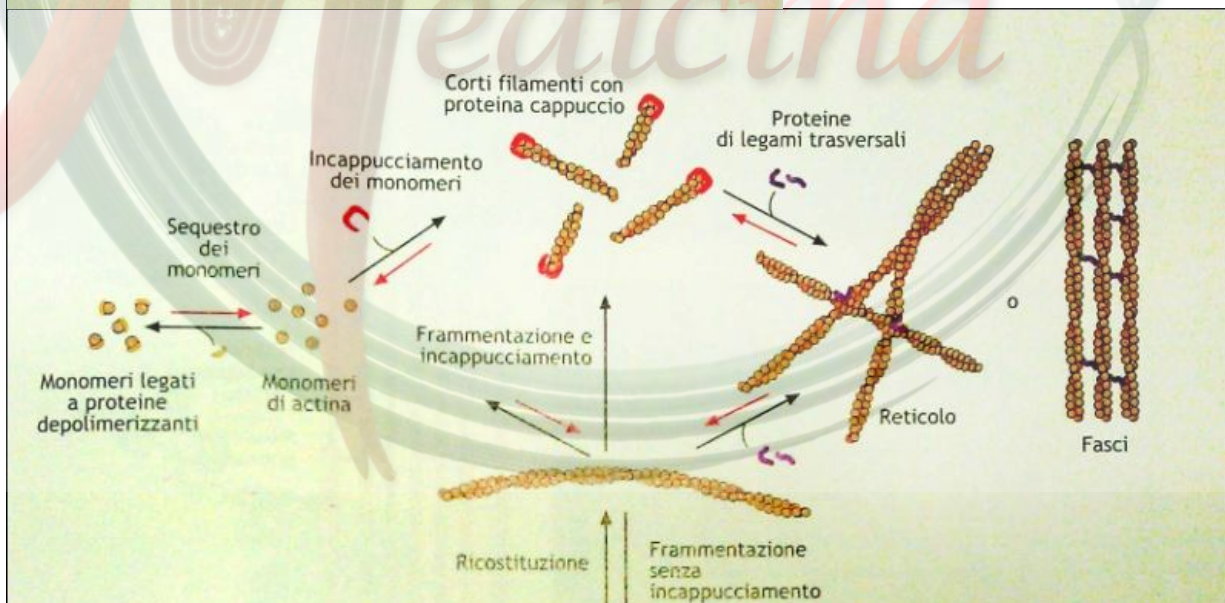
- I microfilamenti, o filamenti di actina, sono le strutture fibrose più flessibili, così che si legano a formare fascetti per contrastare le forze di compressione o per dare supporto a protrusioni cellulari asimmetriche
- I microtubuli sono strutture tubulari rigide che resistono sia alla compressione che alla distensione
- I filamenti intermedi sono delle strutture flessibili che presentano una notevole capacità di estensione, ma una modesta resistenza alla forza di compressione.

Oltre a queste tre strutture fondamentali si può dire che fanno parte del citoscheletro anche un insieme di proteine associate, circa una ventina, tra le quali la miosina delle cellule del muscolo.

Microfilamenti



Presenti in tutte le cellule eucariotiche, essi sono delle lunghe fibre costituite da due catene intrecciate ed avvolte in maniera lassa l'una sull'altra, come due fili di natura proteica, dalla forma



globulare: si tratta di molecole di actina, ed è per questo che i microfilamenti sono anche chiamati filamenti di actina. Esistono differenti forme della molecola. Ciascuna molecola di actina lega una molecola di ATP, o ADP. Le molecole di actina (actina G globulare) si associano spontaneamente testa-coda a formare catene (actina F filamentosa) sia nelle cellule che in vitro; l'organizzazione testa coda

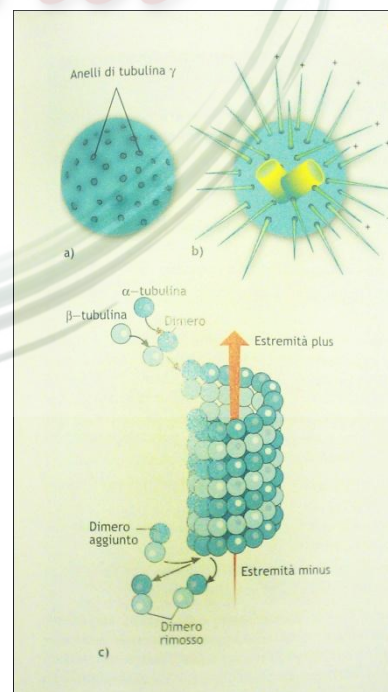
delle molecole impartisce una polarità al filamento di actina. La uniforme disposizione spaziale delle subunità asimmetriche determina due estremità: una estremità sfrangiata ed una appuntita. La crescita avviene per addizione o perdita delle subunità alle due estremità del polimero. L'aggiunta e la perdita dei monomeri di G actina avviene più lentamente nell'estremità appuntita e più velocemente nell'estremità sfrangiata. La cellula è in grado di regolare i processi di polimerizzazione attraverso l'ausilio di altre proteine che intervengono sia per l'allungamento che per l'accorciamento dei filamenti. Tra di esse le cosiddette Arp (proteine correlate all'actina) molto simili all'actina stessa, sembrano essere coinvolte nei processi di enucleazione dei microfilamenti nelle cellule che migrano. I microfilamenti si possono organizzare formando fasci organizzati, o reticoli, o gel poco organizzati, ovvero possono disporsi a formare delle strutture orientate (filopodi). I filamenti di actina sono responsabili del mantenimento e dei cambiamenti della forma della cellula, oppongono resistenza, trasmettono forza e delimitano la diffusione degli organuli. Come le dita di un guanto, i filamenti di actina supportano i microvilli, piccole protrusioni della membrana plasmatica che adeguatamente aumentano la superficie cellulare perché deputati all'assunzione di materiale nutritivo, così come si comportano da sensori. L'actina contribuisce al movimento della cellula in due modi: sia polimerizzando e depolimerizzando la rete dei filamenti corticali al di sotto della membrana, sia contribuendo all'estensione di pseudopodi, filopodi, e lamellipodi, particolari estroflessioni del citoplasma utilizzate per la locomozione cellulare e per la fagocitosi.

Il sistema actina-miosina costituisce l'apparato contrattile delle cellule muscolari, ed è anche responsabile della citocinesi.

Microtubuli

Sono presenti nel citoplasma di tutte le cellule eucariotiche ed è relativamente facile osservarli individualmente perché sono di dimensioni consistenti oltre che diffusi nel citoplasma. In tutti gli organismi i microtubuli presentano la stessa organizzazione e composizione: la cui parete è costituita da un anello di protofilamenti di natura proteica. Ciascun protofilamento è a sua volta formato da subunità globulari di α e β tubulina, unite da legami non covalenti; quindi ogni protofilamento è dato dall'impilamento di tubulina α e β che si alternano regolarmente.

In genere 13 protofilamenti si dispongono l'uno accanto all'altro per formare la parete del cilindretto microtubulare. La disposizione sempre orientata dei dimeri di tubulina, conferendo polarità al protofilamento e, di conseguenza anche al tubulo, consente di distinguere una estremità plus, verso cui sono orientate le β -tubuline, ed una estremità minus, verso cui si orientano le α -tubuline. In particolare l'estremità plus sarebbe quella periferica, quella minus invece, centrale ed ancora ad un centro di nucleazione, o MTOC, centro di organizzazione del microtubulo: il centrosoma per i microtubuli citoplasmatici; il corpo basale per l'assonema. Nelle cellule la reazione di polimerizzazione è facilitata nei centri di nucleazione dove sono presenti molecole di γ -tubulina, che sono in associazione con altre proteine e formano dei complessi ad anello di circa 25nm. Sembrerebbe che ciascuno di tali complessi funzioni come attrattore; ad esso, infatti, si associano i dimeri $\alpha\beta$ orientati in



modo che l'estremità minus sia orientata verso il MTOC, e la plus si avvia verso il citoplasma. Grazie alla loro lunghezza, estensione e rigidità, i microtubuli si oppongono alle forze di contrazione mantenendo la forma della cellula e conferendo sostegno alle strutture cellulari, e a quelle strutture costituite fondamentalmente da proiezioni della superficie cellulare, quali ciglia e flagelli. I microtubuli partecipano sostanzialmente al movimento di materiale o di organuli all'interno della cellula, anche la maggior parte delle cellule utilizza il proprio sistema di endomembrane per trasportare le molecole per brevi distanze. Invece, per i trasporti per lunghe distanze, che potrebbero avvenire ad esempio nei neuroni, il sistema di endomembrane risulta insufficiente ed il trasporto troppo lento per cui le cellule adoperano un sistema di trasporto più veloce e che scorre lungo i microtubuli come viene di seguito illustrato.

Motilità intracellulare

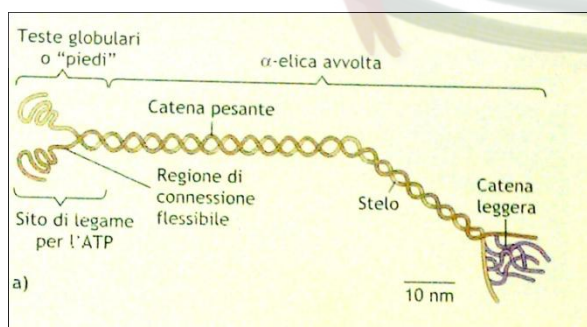
Ogni componente delle cellule viventi ha virtualmente la possibilità di muoversi per alcuni tratti, ma nei diversi tipi cellulari sia l'estensione che la velocità del movimento variano all'interno di un ampio range; agli estremi di quest'ultimo possiamo considerare il movimento del citoplasma nelle alghe e nelle amebe giganti, e il movimento di piccole molecole che diffondono nel citoplasma in maniera irrilevante o poco apprezzabile. Nelle cellule eucariotiche è proprio il citoscheletro che svolge un ruolo fondamentale nei fenomeni di trasporto e movimento all'interno del citoplasma, quali:

- Trasporto lungo i microtubuli
- Polimerizzazione e depolimerizzazione dei microtubuli
- Trasporto lungo i filamenti di actina
- Polimerizzazione e depolimerizzazione dei filamenti di actina

Affinché si espliciti tale funzione di motilità intracellulare è necessaria la partecipazione di speciali proteine che hanno il compito di caricare e guidare il materiale che deve circolare nel citoplasma lungo gli elementi del citoscheletro che fungono da veri e propri binari. Sono necessari:

- Proteine motrici che forniscono l'energia per il movimento
- Molecole che ancorano l'oggetto da trasportare alle proteine motrici
- Microtubuli e microfilamenti lungo cui l'oggetto si sposta come un treno sul proprio binario

Il movimento intracellulare è assicurato dalla presenza di proteine motrici che permettono il movimento di componenti subcellulari, quali organuli e cromosomi, lungo le strutture fibrose polarizzate del citoscheletro, i microfilamenti ed i microtubuli; le stesse proteine possono produrre forze che si trasmettono lungo la rete polimerica del citoscheletro.

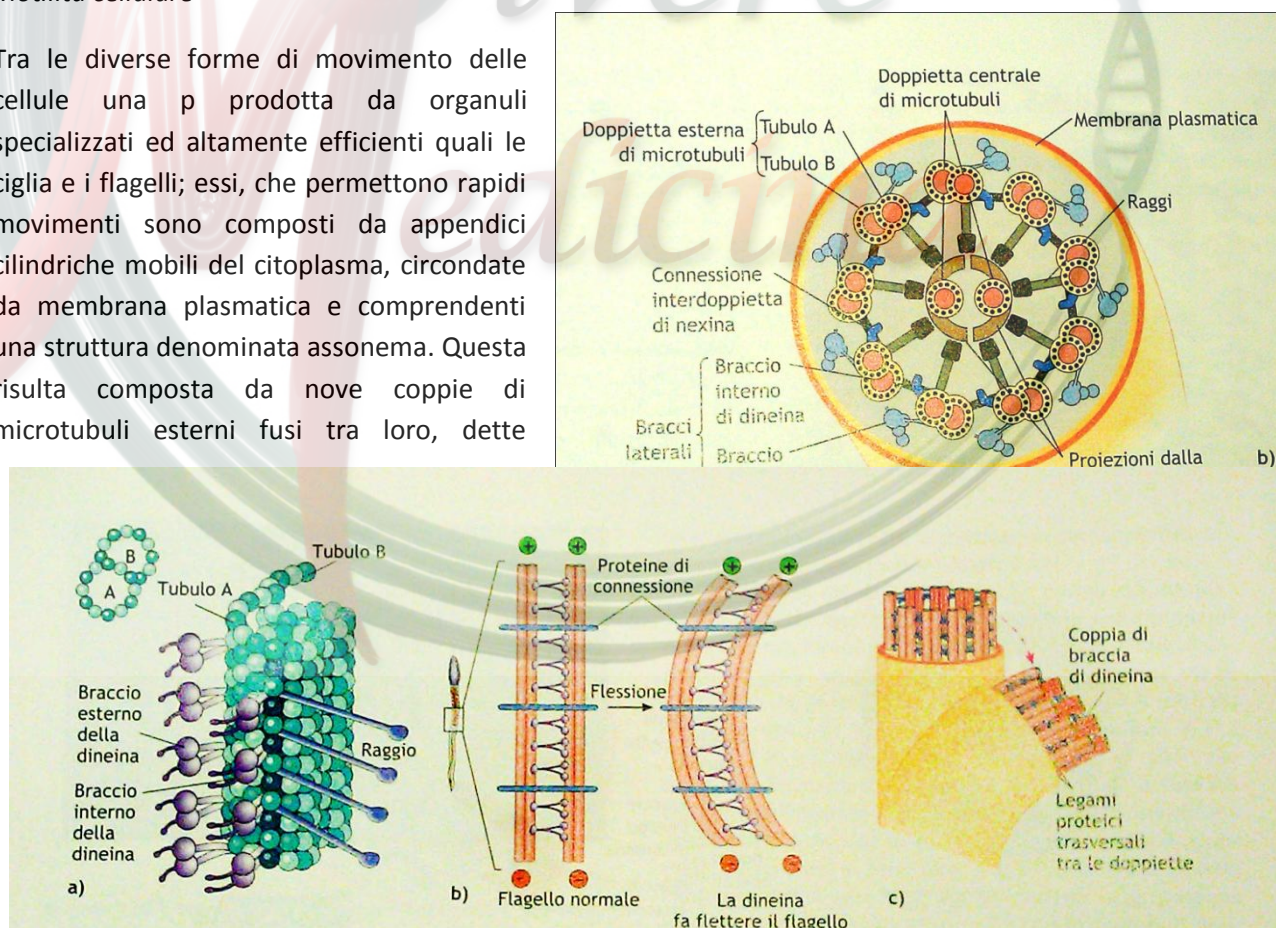


In tutti gli eucarioti sono state identificate tre classi di proteine motrici, la miosina, la kinesina e la dineina. Le miosine si dirigono verso l'estremità sfrangiata dei filamenti di actina, mentre le kinesine e le dineine si muovono rispettivamente verso l'estremità plus e minus dei microtubuli. Le miosine e le kinesine sono GTP-asi, le dineine sono ATP-asi. Convertono quindi l'energia chimica di GTP e ATP in

energia meccanica di movimento. Infatti, quando le proteine motrici sono ancorate ai polimeri citoscheletrici si ha il movimento, cioè il motore si muove e con esso qualunque carico vi sia attaccato; ma ciascun motore, costituendo il sito di attacco per uno specifico carico, assolve ad una speciale funzione, come le proteine motrici kinesina e dineina, che presentano particolare struttura ed attività. Queste proteine presentano due regioni: una sorta di testa, un dominio motore, che utilizza l'idrolisi di GTP o ATP per produrre movimento, ed una coda che permette ai motori di assemblarsi o di legare il carico da trasportare. Sono state identificate nove famiglie di kinesine, la maggior parte delle quali sono dimeriche, per lo più omopolimeri, costituiti da due catene polipeptidiche avvolte a spirale che muovendosi verso l'estremità plus (anterograde) dei microtubuli, trasportano una varietà di molecole o granuli. In genere il legame delle teste delle catene ai microtubuli induce una modifica nella struttura terziaria dei motori permettendo così che la molecola della kinesina cammini lungo le subunità di tubulina; contemporaneamente le code delle catene prendono contatto con il carico o con una molecola di connessione, legano per esempio vescicole del reticolo o altro materiale. Le proteine motore della classe delle dineine sono molecole ATPasiche giganti che si muovono verso l'estremità minus (retrograde) dei microtubuli e, sebbene non siano ancora compiutamente caratterizzate, mostrano una certa variabilità perché sono state identificate alcune isoforme presenti in tessuti specifici differenti. Le dineine utilizzano come molecola di connessione il complesso dinactina, un insieme di più subunità che si associano con molecole specifiche alla superficie delle membrane vescicolari. Nella cellula gli organuli si muovono lungo binari, quali i microtubuli ad una velocità di 1-2 $\mu\text{m/s}$. lo studio di questi movimenti è stato particolarmente favorito dalle osservazioni condotte con il microscopio ottico ad altro contrasto su cellule del SN.

Motilità cellulare

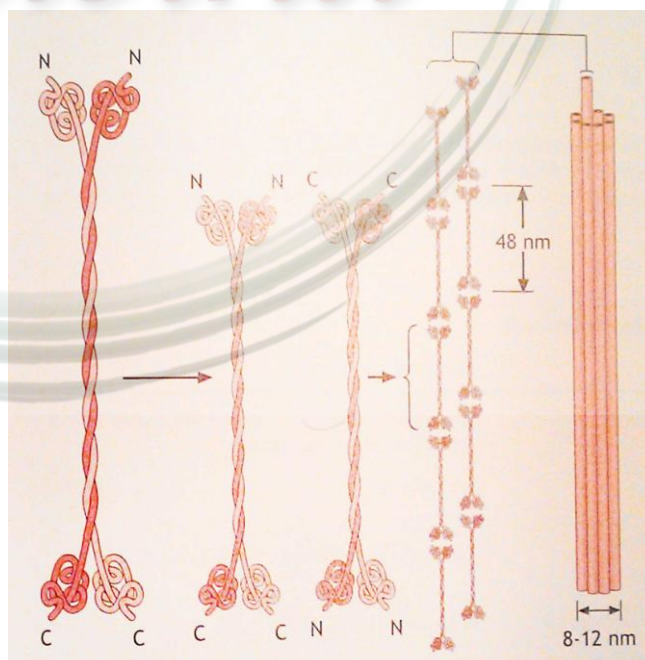
Tra le diverse forme di movimento delle cellule una prodotta da organuli specializzati ed altamente efficienti quali le ciglia e i flagelli; essi, che permettono rapidi movimenti sono composti da appendici cilindriche mobili del citoplasma, circondate da membrana plasmatica e comprendenti una struttura denominata assone. Questa risulta composta da nove coppie di microtubuli esterni fusi tra loro, dette



doppiette, e una coppia di microtubuli centrali; questa struttura è in genere citata come struttura 9+2. L'assonema comprende oltre alle doppiette, più di 200 proteine accessorie che ne rinforzano la struttura, lo rendono resistente ma anche elastico. Alcune di queste proteine uniscono le doppiette esterne tra di loro, altre si associano alla doppietta centrale e tra di esse sono anche presenti delle proteine motore come la dineina. I microtubuli derivano da una regione interna del micoplasma, il corpo basale, posto proprio al di sotto del punto da cui protrude il flagello sulla superficie cellulare. Esso è simile alle strutture centriolari che si trovano nel centrosoma. Ciglia e flagelli sono fondamentalmente simili nella struttura ma differiscono nella lunghezza e nel tipo di battito che effettuano. I flagelli, generalmente più lunghi, di solito sono presenti singolarmente o in coppia, poiché le coppie dei loro microtubuli si muovono scivolando le une sulle altre guidate da bracci composti da dineina, i flagelli eucariotici presentano movimento ondulatorio (a differenza del flagello batterico che effettua movimenti di rotazione). Le ciglia sono appendici più corte presenti in gran numero, spesso disposte in fila, battono rigidamente in un verso acquistando flessibilità nella direzione opposta (battito a remo). Sia ciglia che flagelli spingono o trascinano la cellula in un ambiente acquoso o promuovono il movimento del liquido circostante sulla superficie cellulare, con una attività che può arrivare fino a cento battiti al secondo. Le cellule hanno la possibilità di effettuare altri diversi tipi di movimento grazie alla presenza di filamenti di actina che possono permettere loro di cambiare forma altrettanto velocemente; alcune cellule sono capaci di scorrere lungo una superficie estendendo e retraendo proprio degli pseudopodi. Gli pseudopodi si allungano e si accorciano in seguito alla trasformazione della matrice citoplasmatica dallo stato fisico di sol a gel. Questo movimento che praticamente consiste nello strisciare sul substrato, è un fenomeno cellulare molto significativo che non solo permette alle amebe di muoversi, ma è essenziale per quelle cellule che intervengono nei processi di infiammazione, coagulazione, angiogenesi, riparazione di ferite ed anche metastatizzazione nel caso delle cellule tumorali.

Filamenti intermedi

Rappresentano gli elementi più stabili del citoscheletro e delle cellule animali, infatti i trattamenti chimici che permettono di rimuovere i microfilamenti e microtubuli lasciano inalterato il reticolo dei filamenti intermedi (IF), che di conseguenza, si ritiene debbano essere particolarmente coinvolti nel consolidare la forma di una cellula, nel darle sostegno, opponendosi alle forze di trazione. I filamenti intermedi devono il loro nome al fatto che hanno un diametro intermedio rispetto a quello dei microfilamenti e dei microtubuli. I domini all'estremità N- e C- terminali sono variabili in lunghezza e sequenza e conferiscono specificità alle diverse classi. Si tratta dunque di molecole proteiche allungate che si avvolgono l'una sull'altra a formare dimeri, che si associano poi in tetrameri; più tetrameri vanno a loro volta a formare dei protofilamenti, e da più protofilamenti (circa 8) si ottiene un filamento intermedio. I



filamenti intermedi, nel citoplasma, tendono a formare dei fascetti che si organizzano in una rete che si espande dalla membrana plasmatica al nucleo. Essi, ancorati alla membrana attraverso desmosomi ed emidesmosomi, funzionano come dei tendini cellulari, flessibili ma non estensibili, riuscendo a prevenire lo stiramento di cellule sottoposte a forze fisiche interne o esterne. Differenti proteine possono legarsi ai filamenti intermedi permettendo loro di connettersi con altre componenti cellulari, incluse le membrane e gli altri elementi del citoscheletro; tra esse la plectina, una proteina bastoncellare con le estremità globulari, che fa da ponte tra i vari filamenti intermedi e che connette questi ultimi con la membrana plasmatica, con i microtubuli e i filamenti di actina.

SESTA LEZIONE: ACIDI NUCLEICI, VIRUS (CENNI)

Con la sigla DNA e RNA indichiamo gli acidi nucleici, rispettivamente acido desossiribonucleico e acido ribonucleico. Il DNA è classicamente la molecola depositaria dell'informazione genetica in tutte le cellule ed in alcuni virus (ad eccezione dei virus a RNA). È una molecola formata da una doppia elica, in grado di trasferire di generazione in generazione l'intero patrimonio genetico della cellula fedelmente, cercando di evitare errori (mutazioni). L'acido ribonucleico è, invece, una molecola poco stabile, coinvolta nei processi di espressione e regolazione dell'informazione genetica. Nel 1953 Watson e Crick riuscirono a scoprire la "forma" del DNA. Una doppia elica, che aprendosi funge da stampo per eliche di nuova sintesi, costituisce il calco su cui si possono copiare molecole praticamente tutte identiche e che possono trasmettere i caratteri di generazione in generazione in modo fedele.

Fino agli anni 40 furono le proteine ad essere considerate il materiale genetico, infatti sono più complesse e per questo in grado di trasportare maggiore informazione. Esse sono costituite da venti amminoacidi, che possono combinarsi nel modo più disparato su un numero praticamente illimitato di posti, mentre nel DNA sono possibili solo combinazioni di quattro elementi, cioè i nucleotidi. Bisogna arrivare al 1928, quando Griffith scoprì l'esistenza del *principio trasformante*. Egli lavorava sul ceppo patogeno di un batterio, uno pneumococco in grado di causare polmonite letale negli animali. Griffith trovò che tali batteri potevano presentarsi in due forme: patogeni, provvisti di capsula e quindi in grado di formare colonie di tipo liscio S (smooth), e non patogeni, privi di capsule e quindi in grado di formare colonie di tipo rugoso R (rough). Griffith osservò che topi infettati con batteri di tipo S morivano, come atteso, e batteri di tipo S erano ritrovabili dopo l'autopsia. Quando gli animali erano infettati con batteri di tipo R, sopravvivevano. Quando gli animali erano infettati con batteri di tipo S uccisi con il calore, riuscivano a sopravvivere, ma se erano infettati con una miscela di batteri R vivi e batteri S uccisi dal calore, morivano e dall'autopsia si potevano riscontrare batteri S vivi. Questo risultato fece sospettare l'esistenza nei batteri S di qualcosa che poteva essere trasmessa ai batteri R, ed era in grado di modificarne le caratteristiche genetiche, in particolare di indurre nei batteri R la capacità di formare la capsula tipica dei batteri virulenti. Griffith chiamò questo processo "trasformazione genetica" e la sostanza che la induceva "principio trasformante", ma non andò oltre a questa affermazione: il principio trasformante fu identificato come DNA solo nel '44 da Avery, MacLeod e McCarty. I risultati ottenuti non furono tenuti in considerazione e fu solo nel 1952 con gli esperimenti di Hershey e Chase che furono rivalutati. Fu il fago T2 che si sa essere costituito essenzialmente da acido nucleico e proteine. Le proteine furono marcate con zolfo e il DNA con fosforo. Furono quindi preparate due aliquote di fagi diversamente marcati li misero in presenza di batteri intatti. In questo modo riuscirono a seguire il destino delle proteine e del DNA. Una volta avvenuta l'infezione, centrifugarono debolmente la miscela ed osservarono che, quando venivano usati fagi con DNA marcato, la radioattività rimaneva nel pellet, e quindi nelle cellule; mentre, viceversa, quando erano usati fagi con

proteine marcate la radioattività era presente solo nel sopranatante. La conclusione logica fu: il DNA del fago entra nel batterio, al momento dell'infezione. Il fatto che la radioattività dovuta al fosforo la si ritrovava, poi, nelle particelle fagiche della progenie dimostrava che il DNA era trasmesso di generazione in generazione. Questo non si verificava con lo zolfo marcato. Parallelamente altri studi utilizzarono la diffrattometria dei raggi X e permisero di "fotografare" il DNA. In pratica, un fascio di raggi X che incontra un aggregato molecolare viene deviato dai gusci elettronici che circondano gli atomi. Questi raggi deviati disegnano delle macchie su un emulsione fotografica permettendo di capire se la molecola ha una struttura cristallina, quale sia la posizione spaziale degli atomi e se ci sono elementi di regolarità. Quasi subito da queste immagini fu chiaro che il DNA non poteva essere costituito da una singola elica. Infatti, sia i parametri dimensionali misurati, sia l'elevata viscosità di soluzioni di DNA che crollava dopo riscaldamento della soluzione a 70-80°C, faceva pensare ad una struttura più complessa. Solo nel 1953 Watson e Crick riuscirono a definire un modello molecolare di DNA coerente con i risultati ottenuti dai vari ricercatori, che avevano fornito precedentemente numerosi parametri.

Struttura chimica degli acidi nucleici

Il DNA e l'RNA sono polinucleotidi, costituiti quindi da monomeri chiamati nucleotidi. I nucleotidi del DNA sono desossiribonucleotidi, mentre quelli dell'RNA sono ribonucleotidi. I nucleotidi sono costituiti da tre elementi: uno zucchero a cinque atomi di carbonio (C), il 2'-D-desossiribosio, o il D-ribosio, una base azotata ed un residuo di acido fosforico in posizione 2' (2' indica l'atomo di carbonio dello zucchero, mentre 2 indica la posizione sulla base): infatti, nel primo, al C2' è legato un atomo di idrogeno (manca l'ossigeno, quindi "desossi") mentre, nel secondo è legato un gruppo ossidrilico. L'insieme di zucchero e base azotata è detto nucleoside, il quale, con l'aggiunta di acido fosforico, diventa nucleotide. I nucleosidi, possono essere mono- di- o tri-fosfato. La parte variabile del nucleotide è la base azotata. Le basi azotate sono definite come anelli eterociclici: sono infatti molecole costituite da anelli aromatici contenenti atomi di carbonio ed azoto. Si dividono in basi puriniche e basi pirimidiniche, che differiscono notevolmente per dimensioni. Le purine sono costituite da due anelli condensati per un totale di nove atomi, mentre le pirimidine da un singolo anello esatomico. Adenina (A) e Guanina (G) sono le purine e sono presenti nel DNA e nell'RNA, mentre Timina (T) e Citosina (C) sono presenti nel DNA; l'unica differenza che si presenta è che nell'RNA la Timina è sostituita dall'Uracile (U). I nucleotidi non sono solo i costituenti degli acidi nucleici, ma svolgono numerose funzioni. La molecola di ATP viene utilizzata in numerose reazioni che necessitano di energia; altri nucleotidi svolgono funzioni di regolazione: per esempio l'AMP-ciclico, che è coinvolto nei meccanismi di trasduzione del segnale, o il GTP che, legando le proteine G, le attiva ed innesca una cascata di eventi all'interno della cellula in risposta a stimoli esterni. Dal punto di vista energetico tutti i nucleosidi trifosfato sono equivalenti.

Costituzione di una catena polinucleotidica

Due nucleotidi nell'ambito di una singola elica sono legati insieme da un *ponte fosfodiesterico*, un legame covalente che si instaura tra il gruppo ossidrilico legato al C3' del primo nucleotide, ed il gruppo fosfato legato al C5' del secondo. Questo identifica, grazie alla specificità della DNA polimerasi e della

RNA polimerasi, la direzione di sintesi degli acidi nucleici, che è $5'P \rightarrow 3'OH$, che vuol dire che il primo nucleotide in una catena avrà sempre libera l'estremità $5'P$ mentre l'ultimo nucleotide avrà libera l'estremità $3'OH$. In una singola elica si identifica uno scheletro (backbone), costituito da una regolare alternanza di molecole di zucchero e acido fosforico, da cui sporgono le basi azotate, ed è proprio nella sequenza delle basi azotate che è contenuta l'informazione genetica, ovvero tutte le informazioni necessarie per costruire le proteine che saranno utilizzate per la vita della cellula e dell'intero organismo. L'aggiunta di nucleotidi all'elica nascente richiede, ovviamente, energia che viene fornita da nucleotidi stessi. Infatti, nella reazione di polimerizzazione sono utilizzati nucleosidi trifosfato, i quali libero l'energia sufficiente per la formazione del ponte fosfodiesterico in seguito alla rottura del legame ad alta energia esistente tra il primo P e gli altri due. La successiva idrolisi P_i-P_i (pirofosfato) rende la reazione irreversibile.

OTTAVA LEZIONE: DNA (MODELLO GENERALE)

Il DNA è la molecola che deve essere ereditata di generazione in generazione. Le caratteristiche strutturali delle molecole di DNA quindi devono necessariamente soddisfare la necessità di ereditare caratteri che si sono affermati in seguito al processo di selezione e il fluire dell'informazione deve essere assicurato nel modo più fedele possibile. Il meccanismo con cui il DNA assicura la costanza dell'informazione deve anche prevedere la possibilità di errori che possano spiegare le variazioni esistenti nel mondo vivente una volta che il processo di selezione li abbia stabilmente inseriti nel genoma. Tali errori, che chiameremo mutazioni, sono la causa continua del potenziale insorgere di nuove caratteristiche di una specie che grazie a tale variabilità ha maggiori capacità di adattamento e quindi di sopravvivenza ad eventuali cambiamenti ambientali. La relazione fra struttura e funzione, mirabilmente descritta dal Ruffini con la frase: "la forma è l'immagine plastica della funzione", fu anche decisiva nello stimolare gli stessi Watson e Crick a formulare un'ipotesi relativa al fluire dell'informazione contenuta nel DNA di generazione in generazione. Poiché ogni filamento determina la sequenza del filamento complementare, ogni singolo filamento della molecola che si apre può agire da stampo per dirigere la sintesi di un nuovo filamento. Il risultato è un modello di replicazione semiconservativa, che fu dimostrato essere il modo in cui il DNA assicura la costanza dell'informazione. La scoperta di una molecola capace di auto replicarsi con un meccanismo che sfrutta il banale principio dello stampo, cioè di un calco che assicuri una accurata riproduzione di se stessa, spiega anche come questa si sia propagata evitando di scomparire nel corso dell'evoluzione.

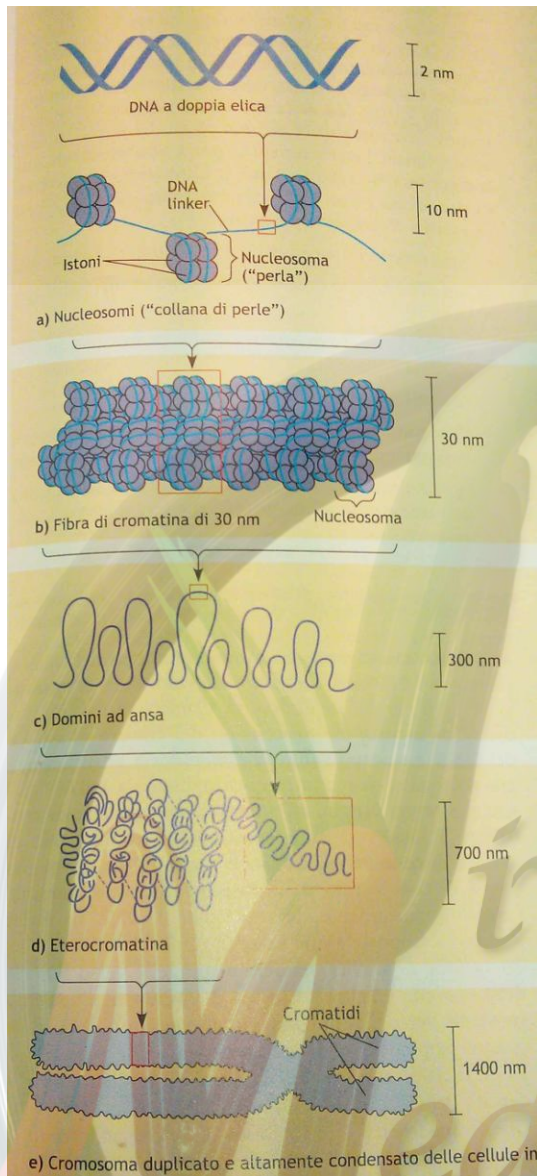
Esperimento di Meselson e Stahl

Accanto al modello di replicazione semiconservativa sono possibili altri due meccanismi: il modello conservativo, entrambi i filamenti stampo ricostituirebbero la doppia elica "vecchia" e di conseguenza i due filamenti sintetizzati costituirebbero una doppia elica nuova. Nel modello dispersivo il DNA delle due molecole che vengono trasmesse alle cellule figlie sarebbe composto sia da tratti vecchi che da tratti nuovi. Meselson e Stahl fecero crescere batteri di *Escherichia coli*, in un terreno contenente cloruro di ammonio il cui azoto era l'isotopo pesante non radioattivo (^{15}N). Il DNA di tali batteri cresciuti in un siffatto terreno di coltura era mescolato in una provetta di centrifuga con una soluzione di cloruro di cesio ($CsCl$). In seguito a centrifugazione il $CsCl$ forma un gradiente di concentrazione nella provetta ed il DNA andrà a galleggiare nel punto della provetta ove la densità della soluzione e quella del DNA si equivarranno. Nel caso del DNA estratto dai batteri cresciuti nel terreno con l'azoto pesante, essendo

composto da basi azotate contenenti ^{15}N , si depositava verso il fondo della provetta. Se il DNA era quello contenente l'isotopo leggero dell'azoto (^{14}N), questo si depositava ove il gradiente lo permetteva, cioè più in alto nella provetta, ove il CsCl era meno concentrato e quindi ove la soluzione era meno densa. L'esperimento prevedeva poi di coltivare batteri tutti contenenti DNA con azoto pesante in un terreno contenente azoto leggero e di prelevare i batteri a intervalli di tempo regolari. Il tempo di ogni prelievo era di circa 30', cioè quello corrispondente alla divisione di E. coli, e quindi alla replicazione del DNA in essa contenuto. Il risultato dell'analisi della densità del DNA vedeva nella provetta un unico tipo di molecole con densità intermedia fra DNA pesante e DNA leggero. Tale risultato escludeva immediatamente il modello della replicazione conservativa. Non poteva essere però escluso il modello dispersivo perché la densità intermedia potrebbe indicare che le molecole del DNA siano costituite da tratti nuovi e vecchi che si alternano al loro interno. L'analisi delle generazioni successive alla prima erano necessarie per chiarire ulteriormente la modalità di replicazione del DNA. Il DNA delle generazioni successive alla prima si depositava in due punti della provetta: uno corrispondente alla densità intermedia de DNA ottenuto dopo la prima generazione e l'altro corrispondente alla densità del DNA leggero. Il DNA leggero tendeva ad aumentare in concentrazione a discapito del DNA intermedio. Ciò indicava che, via via che i batteri si dividevano ed il DNA si replicava, aumentavano sempre più le molecole di DNA leggero rispetto a quelle costituite da un'elica pesante ed un'elica leggera che, invece, costituivano la totalità delle molecole di DNA ottenute dopo la prima generazione. Ciò era compatibile solo col modello semiconservativo.

Strategie di compattamento del DNA (virus, eucarioti, batteri, piccoli DNA circolari)

Il genoma virale può essere formato da DNA a singola elica, o a doppia elica, RNA a singola elica o a doppia elica. Molti virus hanno un genoma lineare, altri invece presentano un genoma circolare. Per quanto riguarda i genomi a doppia elica lineare, questi si compattano avvolgendosi in senso centripeto (dalla periferia verso il centro) intorno ad un asse virtuale perpendicolare all'asse testa-coda del virus. Per quanto riguarda i piccoli genomi circolari costituiti da DNA a doppia elica, questi sono **superspiralizzati** con avvitalamento destrorso. In questo caso la molecola di DNA è caratterizzata dal fatto di avere un minor numero di giri di elica rispetto ad un DNA lineare di pari lunghezza. Nei procarioti l'informazione è contenuta in una molecola di DNA circolare posta in una zona del citoplasma chiamata nucleoide. Se la cellula batterica viene lisata utilizzando una concentrazione salina fisiologica, il DNA viene rilasciato come struttura formata da un filamento di 12 nm di spessore; se invece si usa una concentrazione salina 1M di NaCl allora la struttura rilasciata sarà costituita da anse, ma queste saranno sottili, 2nm, praticamente DNA nudo. Quale delle due strutture è quella reale? Entrambe. Il DNA è impacchettato intorno a proteine basiche di tipo istonico (HLP histone-like proteins) e, questa fibra elementare è organizzata in anse, cioè in domini indipendenti che sono stabilizzati alla base da piccoli tratti di RNA e proteine. La presenza dell'RNA è stata dimostrata da osservazioni sperimentali. Se consideriamo il DNA presente in un nucleo di una cellula umana, esso presenta, come già detto, sui montanti cariche negative, dovute al fosfato che tenderebbero a separare la doppia elica, infatti cariche dello stesso segno tendono a respingersi. Ciò non avviene perché le cariche negative sono neutralizzate da proteine di natura basica (nei virus e nelle cellule prive di istoni le cariche negative sono contrastate da contro ioni Mg^{2+} e K^+). Negli eucarioti questo compito è svolto dagli **istoni**. Si tratta di proteine basiche, dotate quindi di cariche positive (NH_3^+), che permettono il compattamento de DNA. Si



conoscono ad oggi due classi di istoni: la prima classe comprende le proteine **H2A, H2B H3 e H4**; mentre la seconda comprende solo l'istone **H1**. Gli istoni della prima classe si organizzano a formare delle strutture ottameriche, i rocchetti di avvolgimento, che permettono la prima fase del compattamento, ovvero la formazione della "collana di perle". La struttura è costituita da agglomerati, le perle, unite da un filamento sottile. Le perle sono formate da DNA e proteine istoniche, mentre il filamento di connessione è rappresentato solo da DNA. Con il termine **nucleosoma** si indica l'insieme formato da un rocchetto di avvolgimento, fatto di istoni, e DNA ad esso associato. Il nucleosoma è unità fondamentale della cromatina. L'organizzazione molecolare del nucleosoma è costituita da un core di istoni (formato da due tetrameri, ciascuno dei quali è formato dalla prima classe di proteine istoniche H2A H2B H3 E H4) intorno al quale si avvolge il DNA. Il ruolo dell'istone H1 è quello di stabilizzare il nucleosoma ancorando il DNA al rocchetto. Il tratto di DNA compreso fra due nucleosomi successivi è detto **DNA linker**. La fibra elementare può compattarsi ulteriormente grazie all'istone H1 che, sistematosi sul rocchetto di avvolgimento, "pinzetta il DNA in entrata ed in uscita e, avvicinando i diversi rocchetti, grazie a legami testa coda tra altri H1, forma il **solenoid**. Esso, a sua volta, può formare anse, e poi **superanse**, fino ad arrivare alla forma massimamente compattata della

cromatina – il **cromosoma metafase** – che ha uno spessore totale di 1400nm. Questi ultimi livelli di impacchettamento della cromatina richiedono una struttura di ancoraggio di natura proteica detta "**scaffold**" costituita da proteine non istoniche. La cromatina che possiamo definire come DNA e proteine istoniche, può presentarsi in due stadi: **euromatina** e **eterocromatina**. L'euromatina è la forma bassamente compattata del DNA, mentre l'eterocromatina è la forma fortemente compattata del DNA. Distinguiamo una **eterocromatina costitutiva** che resta allo stato compattato, sempre e in tutte le cellule, e rappresenta la frazione di DNA che non viene mai trascritta. L'**eterocromatina facoltativa** risulta invece inattivata in modo specifico in alcune fasi della vita di un organismo. Quindi, mentre l'euromatina è sempre attiva dal punto di vista trascrizionale, l'eterocromatina non potrà esserlo mai, se costitutiva; se facoltativa potrà esserlo in certi momenti. Le differenze strutturali fra i due stati della cromatina possono essere imputati a diversi motivi, fra cui:

- Una diversa interazione tra DNA linker e istone H1
- Un diverso stato di acetilazione degli istoni
- Un diverso stato di fosforilazione che interessa l'istone H2B
- La metilazione degli istoni

- L'ubiquitinazione, cioè l'aggiunta di unità di ubiquitina, una proteina che lega il bersaglio covalentemente
- La sumolazione, cioè l'aggiunta di unità SUMO, una proteina simile all'ubiquitina, che lega il bersaglio covalentemente.

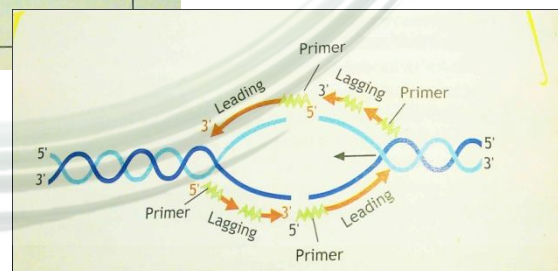
Caratteristiche generali della duplicazione del DNA

Affinché il DNA si dupliichi è necessario che la doppia elica si apra onde consentire alle due singole eliche disgiunte di costruire lo stampo per le eliche di nuova sintesi. Queste verranno polimerizzate da enzimi (le *DNA polimerasi*) a partire dai quattro desossiribonucleosidi trifosfati che, attraverso una prima idrolisi il cui prodotto è il pirofosfato ed i desossiribonucleosidi monofosfato, libereranno un primo pacchetto di energia. Un secondo pacchetto dell'energia verrà liberata dall'idrolisi del pirofosfato. L'energia totale liberata consentirà non solo il legame fosfodiester fra i cari nucleosidi, ma verrà anche utilizzata per altri processi energetici connessi all'attività dell'apparato di replicazione. Il riconoscimento dei nucleotidi che dovranno formare la nuova elica è dettato dalla regola della



complementarietà che prevede gli appaiamenti fra A e T, e G e C. Inoltre, l'attività degli enzimi polimerizzanti è tale da poter utilizzare solo nucleosidi trifosfati al 5', e pertanto, la catena polinucleotidica è costruita sempre a partire da 5'-P al 3'-OH su entrambe le eliche che fungono da stampo. L'apertura della doppia elica produce una **bolla di replicazione** all'interno della quale si opera l'intero apparato per la sintesi del DNA. Si costituisce dunque la **forcella di replicazione** nel punto in cui il

DNA continuamente si srotola, e ciò accade al confine tra i segmenti che si stanno reduplicando e la doppia elica che si sta aprendo. In una bolla di replicazione, quindi, avremo due forcelle di replicazione che procedono in entrambe le direzioni a partire dall'origine. Ciò definisce il progredire delle forcelle come bidirezionale, ma in ogni forcella la direzione di sintesi è sempre $5' \rightarrow 3'$. A valle della forcella di replicazione il DNA si superspiralizza come conseguenza della torsione necessaria per separare i due filamenti. Ciò potrebbe provocare un groviglio tale da non permettere l'avanzamento delle forcelle di replicazione. È necessario quindi allentare la tensione dovuta alla torsione in modo da permettere al DNA di tornare in forma rilassata, e tale compito è svolto da particolari enzimi detti



topoisomerasi. Com'è noto, il nome di un enzima è composto da una radice che descrive la sua funzione più il suffisso -asi. Un topoisomero è un isomero a tutti gli effetti. Un topoisomero del DNA è una molecola di DNA che differisce dall'originale perché spiralizzata in modo diverso, nello specifico, perché ad ogni giro di elica che contiene un numero diverso di basi azotate dall'originale. In definitiva si tratta di un isomero topologico. Via via che le forcelle di replicazione avanzano, lo stress torsionale a valle della forcella è allentato dalle topoisomerasi che possono essere di due tipi: le topoisomerasi di tipo I, che allentano i superavvolgimenti a valle inducendo un taglio in uno dei due filamenti (il filamento tagliato si svolge ruotando attorno a quello integro, e poi quando il DNA è tornato in forma rilassata, viene riattaccato), e la topoisomerasi II, che funziona invece tagliando e poi ricongiungendo entrambi i filamenti. Potendo quindi avanzare le forcelle di replicazione esporranno continuamente nuovi tratti che fungeranno da stampo. Dal momento che la polimerizzazione avviene dal terminale 5' al terminale 3', avremo un'elica di nuova sintesi che viaggerà verso la forcella di replicazione che si apre continuamente, mentre l'altra elica terrà la direzione contraria, essendo ciò una logica conseguenza dell'antiparallelismo. Mentre il filamento che viaggia verso la forcella di replicazione viene sintetizzato in modo continuo (*leading chain* o filamento anticipato), il filamento che viene dalla forcella di replicazione verrà sintetizzato via via che viene esposto lo stampo, e quindi per frammenti. Sarà necessario aspettare che la *leading chain* sia cresciuta per un determinato pezzo perché si abbia la sintesi dell'altro filamento che, per tal motivo, viene detto *lagging chain*, o filamento in ritardo.

NONA LEZIONE: REPLICAZIONE DEI BATTERI, MODELLO θ .

L'inizio della replicazione

La replicazione inizia sul cromosoma batterico a partire da un sito specifico denominato **origine**, ed indicato come **oriC**. Si tratta di una sequenza specifica che è riconosciuta da una **proteina d'inizio (dnaA)**. L'interazione fra la proteina d'inizio ed oriC determina l'apertura della doppia elica in un sito adiacente ricco in A-T nel quale intervengono le **elicasi**, proteine che legandosi al DNA promuovono ancora di più la separazione dei due filamenti. Le elicasi utilizzano una molecola di ATP per ogni giro d'elica svolto, ragione per cui l'origine è adiacente ad un'invaginazione della membrana plasmatica detta mesosoma, ove avviene la sintesi di ATP da parte della cellula batterica. Successivamente alle elicasi, intervengono le **proteine che destabilizzano la doppia elica (HDP: helix destabilizing proteins)**, dette anche **proteine che si legano al DNA a singola elica (SSB: single strand binding proteins)**. La funzione di queste proteine è quella di impedire che il DNA si richiuda. L'enorme quantità di legami idrogeno ancora presenti infatti tende a riassociare i piccoli tratti a singolo filamento. È infatti noto che il DNA ha normalmente la capacità di effettuare un movimento a fisarmonica, tale da far esclamare che il DNA "respira" a causa della continua apertura ed immediata chiusura delle eliche complementari. Esiste un continuo equilibrio fra l'associazione e la dissociazione di filamenti: le SSB spostano l'equilibrio verso la dissociazione. La continua apertura della doppia elica induce dei superavvolgimenti che ostacolerebbero, se non rimossi, il processo di duplicazione. Ecco, allora, che nei batteri entra in funzione la topoisomerasi II, la **girasi**, che, viaggiando lungo il DNA, allenta continuamente la tensione prodotta. Fra i due filamenti aperti possono inserirsi quindi gli enzimi polimerizzanti.

L'attività delle polimerasi

Il primo enzima ad agire è quello deputato a fabbricare un innesco, o **primer**, che altro non è che un piccolo polinucleotide, che procede dal 5' al 3' ed è legato allo stampo con legami idrogeno, che inizia la reazione di polimerizzazione. Gli enzimi che polimerizzano il DNA, cioè la polimerasi I, II e III non sono capaci di iniziare dal nulla la replicazione; la funzione dell'innesco è quella di fornire alla DNA polimerasi la possibilità di funzionare. Che molecola potrà essere il polinucleotide che funge da innesco, se non un è un piccolo frammento di DNA? Un piccolo polinucleotide non può che essere un RNA. Una RNA polimerasi DNA-dipendente, detta anche **primasi**. L'RNA polimerasi, infatti, non necessita di un innesco e forma un piccolo RNA non più grande di cinque - dieci nucleotidi consentendo alla DNA polimerasi III di legare al terminale 3' il primo desossiribonucleotide. Sulla leading chain, allora la DNA polimerasi III procederà in modo contiguo viaggiando nella direzione di apertura della forcella di replicazione. Qual è il motivo dell'uso di un RNA come innesco? Gli RNA usati come innesco verranno eliminati per cui se vi sono stati errori, questi verranno rimossi con l'eliminazione degli RNA. Se, dunque, la leading chain ha bisogno di un unico innesco, la lagging chain necessiterà di tanti inneschi per quanti sono i frammenti che si formano; ogni volta che sarà disponibile un tratto che funge da stampo, via via che si ha la separazione dei due filamenti, sarà necessario che intervenga la primasi. Chiaramente, l'attività replicativa avanza su forcelle di replicazione che si formano da entrambi i lati della bolla, facendo assumere al DNA batterico la caratteristica forma di lettera θ .

Gli inneschi vanno rimossi. Sul lagging chain, la DNA polimerasi III avanzerà polimerizzando desossiribonucleotidi fino ad incontrare l'innesco del frammento successivo. A questo punto la DNA polimerasi II viene sostituita dalla DNA polimerasi I, che probabilmente insieme alla DNA polimerasi II è in grado di eliminare l'RNA. La DNA polimerasi I infatti possiede un'attività esonucleasica che viene esercitata in direzione $5' \rightarrow 3'$; ciò significa è in grado di rimuovere nucleotidi, uno alla volta, a partire dall'estremità 5'. Così la DNA polimerasi I, mentre rimuove ribonucleotidi, contemporaneamente li sostituisce con desossiribonucleotidi colmando lo spazio occupato dall'innesco. Si pensa che a questa attività partecipi anche la DNA polimerasi II. A questo punto, il frammento che sta crescendo giunge alle spalle del 5' del frammento successivo.

Problemi connessi alla duplicazione per frammenti

L'attività polimerasica è in grado di aggiungere progressivamente un nucleotide alla volta al filamento nascente. Per contro è ora necessario congiungere i vari frammenti di DNA e che DNA polimerasi III e la DNA polimerasi I hanno creato. Non potendo i frammenti essere saldati da una polimerasi (in quanto questa è capace di aggiungere un nucleotide alla volta), è necessario l'intervento di un altro enzima capace di legare i frammenti e perciò detto **ligasi**. Dal momento che le due forcelle di replicazione avanzano in direzione opposta ognuno dei due filamenti sarà un leading chain a partire dall'origine della replicazione verso l'apertura della doppia elica. Di conseguenza, ognuno dei due filamenti sarà anche lagging chain a partire dal punto in cui si forma l'innesco del filamento che viene dal punto di apertura della doppia elica. Le due forcelle di replicazione dovranno necessariamente incontrarsi e lo faranno in una regione del cromosoma batterico detta **ter**. La replicazione per frammenti è stata scoperta nel 1968 da R. Okazaki. L'estrazione del DNA rivelava la presenza di frammenti di 1000-2000 nucleotidi che iniziavano con piccoli RNA. Si osservava poi che a tempi più lunghi fra la marcatura e l'estrazione, aumentava la lunghezza dei frammenti. Questo esperimento rivelò che anche il DNA batterico è sintetizzato ad una velocità estremamente elevata, e permette ad una cellula batterica di dividersi circa ogni 30'. La struttura del DNA pone anche un altro problema: la DNA polimerasi una volta sintetizzata la leading chain, torna indietro sulla

lagging chain? Dato che è stato ipotizzato che l'apparato replicatorio si muova sempre e solo nella direzione di apertura della forcella, fu proposto che la lagging chain formi un'ansa consentendo così alla DNA polimerasi III di muoversi nella stessa direzione e di polimerizzare i nuovi filamenti su entrambi gli stampi in direzione $5' \rightarrow 3'$. La formazione dell'ansa eviterebbe alla DNA polimerasi un inutile viaggio a ritroso sulla lagging chain.

Attività esonucleasica della DNA polimerasi III: la correzione di bozze

Il meccanismo di replicazione del DNA, come si è visto, sembrerebbe non prevedere errori. Tuttavia si calcola che, in linea teorica, un appaiamento di basi scorretto possa avvenire una volta ogni $10^5 - 10^6$ nucleotidi. In realtà avvengono errori solo una volta ogni 10^9 nucleotidi. La lagging chain viene curiosamente replicata in maniera più accurata, per un fattore pari a circa cinque volte rispetto la leading chain. Tale evento assicurerebbe una certa stabilità nell'ereditarietà dei caratteri sulla lagging chain, e contemporaneamente, un certo numero di mutazioni per i processi di adattamento sulla leading chain. Chiaramente a causa della bi direzionalità gli eventi sulla leading chain e sulla lagging chain sono perfettamente bilanciati. La previsione degli appaiamenti sbagliati ed il riscontro reale è dovuta al fatto che esiste un'attività enzimatica di correzione già durante la replicazione. A questa attività poi si aggiunge una ulteriore attività di correzione dopo la replicazione. **L'enzima correttore di bozze**, cioè quello che agisce durante la replicazione, è la DNA polimerasi III. Tale enzima infatti possiede un'attività esonucleasica $3' \rightarrow 5'$ che entra in funzione allorché viene inserito un nucleotide sbagliato, quindi, non in grado di formare i legami di idrogeno corretti con la base che si trova sullo stampo. L'instabilità degli appaiamenti scorretti non consentono alla DNA polimerasi di continuare la sintesi. L'attività polimerizzante quindi si arresta e ciò scatena l'attività depolimerizzante, esonucleasica, dell'enzima che, in pratica, torna sui suoi primi passi eliminando l'errore. A tal punto sarà possibile riprendere il lavoro di sintesi del filamenti di DNA.

UNDICESIMA LEZIONE: REPLICAZIONE NEGLI EUCARIOTI E PROCARIOTI

I principi generali che sono alla base del processo di duplicazione del DNA sono rispettati anche per la cellula eucariotica. Svolgono quindi la loro azione le elicasi, le proteine di svolgimento, la primasi, le DNA polimerasi, le topoisomerasi e le ligasi. L'apparato di replicazione deve fare i conti con una serie di peculiarità che caratterizzano l'organizzazione del DNA eucariotico. Nascono, così, alcuni problemi da risolvere e questi sono principalmente collegati alla dimensione dei cromosomi, alla presenza dei nucleosomi, ed infine, al fatto che il DNA è organizzato linearmente. Negli ultimi anni sono state scoperte nuove DNA polimerasi, alcune delle quali con l'attività di "correttore di bozze", altre che, invece, non sono sensibili ai meccanismi di riparazione. Possono quindi consentire la replicazione del DNA anche quando la molecola sia danneggiata senza che siano intervenuti meccanismi di riparazione.

I cromosomi presentano una lunghezza ragguardevole

il grosso cromosoma umano come cromosoma uno presenta circa $2,5 \times 10^9$ nucleotidi appaiati a velocità di duplicazione inoltre di organismi eucarioti è inferiore di circa 10 volte rispetto a quella che si verifica durante la divisione del cromosoma batterico. La fase S del ciclo cellulare, cioè quella corrispondente alla sintesi del DNA, dura mediamente dalle sei alle otto ore. Lo stratagemma impiegato perché avvenga una

replicazione abbastanza rapida prevede l'apertura della doppia elica in più punti, detti **repliconi** lungo cromosoma. In ciascun replicone le forcelle di replicazione procedono allontanandosi in direzione opposta l'una all'altra; in tal modo ogni forcella incontrerà le forcelle adiacenti. Mentre nella cellula batterica vi è un'unica sequenza della molecola di Dna responsabile dell'apertura della doppia elica, oriC, negli eucarioti si può verificare che esistano delle sequenze regolatrici distanti dal sito di apertura. È questo il caso di ACE in Drosophila. Questi elementi vengono definiti replicatori, per distinguerli dai siti di apertura, detti ori, ove inizia la replicazione. In diversi casi, comunque replicatori ori si sovrappongono. Le polimerasi che agiscono nella duplicazione del DNA eucariotico vengono denominate con le lettere greche da α a γ . La polimerasi gamma è attiva nel mitocondrio e la polimerasi beta viene utilizzata nei meccanismi relativi alla riparazione del DNA. Tutte le polimerasi, esclusa la polimerasi beta, hanno attività esonucleasica $3' \rightarrow 5'$ assicurando un'azione del tipo "correzione di bozze". L'inizio della replicazione è assicurato da un complesso primasi/polimerasi alfa che polimerizza l'innescio ed un piccolo tratto di DNA. Il **fattore di replicazione c (RF-C)**, assieme all'**antigene nucleare di proliferazione cellulare (PCNA)**, in un processo ATP-dipendente, favorisce lo sgombramento del complesso primasi/polimerasi α e il legame con la polimerasi δ , che risulta essere il principale enzima sia sulla leading chain che sulla lagging chain. La polimerasi α avrebbe un ruolo fondamentale nei processi di riparazione ma sembra poter essere coinvolta anche nella duplicazione della lagging chain. La rimozione degli inneschi avviene anche grazie ad una **RNasiH** che rimuove, appunto, l'RNA che rende ibrida la doppia elica. La rimozione dell'RNA avviene anche grazie alla cooperazione di un fattore noto come **FEN-1 (flap endonuclease)** perché coinvolta nella rimozione di tratti ramificati) e ha un'attività $5' \rightarrow 3'$. Infine la saldatura di tutti i frammenti di Okazaki viene effettuata dalla ligasi.

Replicazione ed organizzazione della cromatina

Durante la replicazione è lecito chiedersi cosa succeda ai nucleosomi che devono necessariamente abbandonare la doppia elica in modo da lasciar passare tutto il complesso apparato enzimatico. Gli istoni, inoltre, devono poi ricollocarsi sulle molecole di DNA frutto della replicazione. Una prima generalizzazione riguarda il fatto che lo stato di compattamento della cromatina regola in quale momento della fase S debba avvenire la duplicazione del DNA. La regola è intuibile: la replicazione avverrà prima nei tratti eucromatinici ed ha in un secondo momento dei tratti eterocromatinici. Così, ad esempio, il tratto di DNA, quasi totalmente inattivo, che formerà in interfase il corpo di Barr nelle cellule femminili, e che è fortemente eterocromatinico, si replicherà tardivamente. Il corpo di Barr diventerà cromosoma X durante la divisione cellulare ed è interessante notare che l'altro tratto di DNA eucromatinico si duplicherà prima. Durante la duplicazione possiamo considerare gli istoni come divisi in due categorie: quelli che costituivano i vecchi ottameri ed istoni di nuova sintesi. Si possono immaginare tre modalità di ripartizione degli istoni durante il processo replicativo. Chiameremo i possibili modi di ripartire gli istoni a due doppi filamenti come conservativo, semiconservativo e dispersivo. Nel modello conservativo gli ottameri vecchi conservano la loro identità. Così, ottameri nuovi e vecchi si distribuiscono in modo casuale fra i due doppi filamenti frutto della duplicazione. Nel modello semiconservativo, ogni ottamero è formato da un tetramero costituito da istoni nuovi. Nel modello dispersivo, gli ottameri sono ricostituiti prendendo a caso istoni vecchi e istoni di nuova sintesi. Attualmente è ancora in corso una discussione su quale sia il modello più fedele alla ricostruzione dei nucleosomi: l'ipotesi più accreditata è quella che fa riferimento al modello conservativo.

Replicazione dei telomeri

L'ultima difficoltà con cui dobbiamo fare i conti per quanto riguarda la duplicazione del DNA eucariotico è quella nota come il problema della replicazione dei terminali. I tratti terminali, denominati telomeri, di un cromosoma lineare, infatti hanno gli estremi costituiti dalla doppia elica di DNA che portano come è noto

un 5' e un 3' che si affrontano di conseguenza all'antiparallelismo. In filamento che termina con il 3' fungerà da stampo per la primasi, per cui il filamento di nuova sintesi avrà la sua parte iniziale costituita dall'RNA che funzionerà da innesco. Allora il problema è: una volta rimosso l'innesco, come verrà riempito il vuoto (gap) al 5'? il rischio che si corre è quello di un continuo accorciamento dei cromosomi via via che il DNA si replica di generazione in generazione. Un enzima capace di dare una risposta al problema della replicazione dei telomeri è chiamato **telomerasi**. L'attività telomerasica è stata rilevata in tutti gli organismi eucariotici, uomo compreso. La peculiarità dei telomeri è quella di essere costituiti da tratti di DNA di lunghezza variabile. All'interno di grossi gruppi sistematici però le sequenze telomeriche sono identiche e sono sostituite da brevi ripetizioni. La telomerasi è costituita da un "core" enzimatico e da proteine associate. Il core dell'enzima risulta formato da una proteina denominata **TERT** (telomerase reverse transcriptase) ed un piccolo RNA chiamato **TERC** (telomerase RNA component) complementare alle sequenze ripetute dei telomeri. TERT è molto conservata da un punto di vista filogenico, infatti, se isolata è in grado di catalizzare la reduplicazione dei telomeri in associazione con RNA estratto da cellule di coniglio. È dunque chiaro che la telomerasi, che utilizza RNA per sintetizzare DNA, è una trascrittasi inversa. TERT possiede anche somiglianze strutturali con le convenzionali trascrittasi inverse dimostrando che tali enzimi sono stati usati, nel corso dell'evoluzione, non solamente per la replicazione dei genomi virali, ma anche per la normale proliferazione cellulare. In breve, la telomerasi utilizza il suo RNA come stampo per allungare l'estremo 3' in modo da offrire uno stampo più lungo per l'azione della primasi nella sintesi del filamento complementare dall'estremo 5' verso il 3'. In tal modo l'eliminazione dell'innesco non eroderà progressivamente il DNA. Rimangono però due problemi relativi al monitoraggio dell'allungamento dell'estremo 3', e quindi dei telomeri, ed alla presenza di un filamento a singola elica che non viene riconosciuto come tratto danneggiato. Il monitoraggio della lunghezza dei telomeri costituisce attualmente un importante filone di ricerca dal momento che si suppone che nelle cellule somatiche l'espressione della telomerasi sia repressa. Il DNA delle cellule somatiche è quindi soggetto ad erosione e l'accorciamento dei telomeri sembra un evento fondamentale che determina fenomeni di senescenza. La riattivazione della telomerasi in cellule in cui normalmente è repressa viene associata con la trasformazione neoplastica potendo le cellule dividersi indefinitamente. La possibilità di far esprimere TERT in cellule umane che non erano più in grado di dividersi ha fatto sì che tali cellule abbiano riacquisito una capacità illimitata di proliferare. È probabile che esistano proteine in grado di regolare l'allungamento e l'accorciamento delle estremità telomeriche mantenendole di lunghezza costante. Nell'uomo è stata recentemente isolata una proteina, denominata TRF 1, capace di legarsi ai telomeri. L'eliminazione di tale proteina provoca l'allungamento delle estremità telomeriche, mentre la sua massiva espressione ne provoca l'accorciamento. La funzione di questa proteina potrebbe essere duplice, e cioè spiazzare la telomerasi, e quindi, regolare la lunghezza delle ripetizioni aggiunge e contemporaneamente incappucciare il tratto a singola elica evitando che questo inneschi un segnale di DNA danneggiato che potrebbe arrestare la progressione del ciclo cellulare.

PCNA: antigene nucleare di proliferazione cellulare: un collegamento fra duplicazione del DNA e ciclo cellulare

Il PCNA è stato identificato nel nucleo di cellule in divisione e pertanto, definito come antigene nucleare di cellule proliferanti. Solo recentemente il PCNA è stato indicato come un componente essenziale dell'apparato di replicazione essendo una proteina accessoria della DNA polimerasi ϵ e della DNA polimerasi δ . Il PCNA è anche coinvolto in processi di riparazione del DNA, nella ricombinazione ed è in relazione con proteine che controllano il ciclo cellulare. La sua struttura rivela una forma circolare con un

diametro interno tale da poter ospitare il DNA a doppia elica. Potendo legare la DNA polimerasi δ e potendo interagire con la DNA polimerasi α , avrebbe un ruolo essenziale nel coordinare la sintesi della leading chain e della lagging chain. Il PCNA viene portato sul DNA grazie a RF-C in un processo ATP-dipendente, e ciò consente alla DNA polimerasi δ di ancorarsi al DNA legandosi al PCNA e di sloggiare il complesso primasi /polimerasi α . L'attività del PCNA durante la replicazione avrebbe anche un ruolo nel riassetto della cromatina. Il PCNA interagisce non solo con molti componenti del complesso macchinario che regola il ciclo cellulare, ma anche con quelle proteine che inibiscono la divisione cellulare in seguito ad un eventuale danneggiamento del DNA. Così è stato dimostrato che il PCNA lega la **ciclina D**. Questa ha un ruolo fondamentale nel determinare la fase di **start**, cioè quella che fa entrare le cellule nel ciclo all'inizio della fase G_1 . Il ruolo fondamentale della ciclina D e della sua chinasi è quello di fosforilare la proteina retinoblastoma. Questa fosforilazione consente di entrare nel ciclo cellulare ed iniziare il percorso che porterà la cellula in fase S grazie all'apporto della ciclina E e della sua chinasi. Il legame tra ciclina D e PCNA sequestra il PCNA e non consente una precoce sintesi di DNA in fase G_1 . Durante la transizione fra la fase G_1 e la fase S vi è una diminuzione dei livelli di ciclina D che liberano il PCNA dal complesso, consentendone la sintesi di DNA. Allo stesso modo se il DNA è danneggiato, i livelli di ciclina D diminuiscono consentendo al PCNA di partecipare ai processi di riparazione. Il PCNA interagisce anche con p21, la cui sintesi dipende da una proteina denominata p53. Se il DNA è danneggiato in modo tale da indurre una elevata sintesi di p21, ecco che p21 lega il PCNA inibendo la sintesi di DNA. Un altro sito di p21 può bloccare la fase S direttamente inibendo la chinasi associata alla ciclina E e alla ciclina A.

Riparazione del DNA

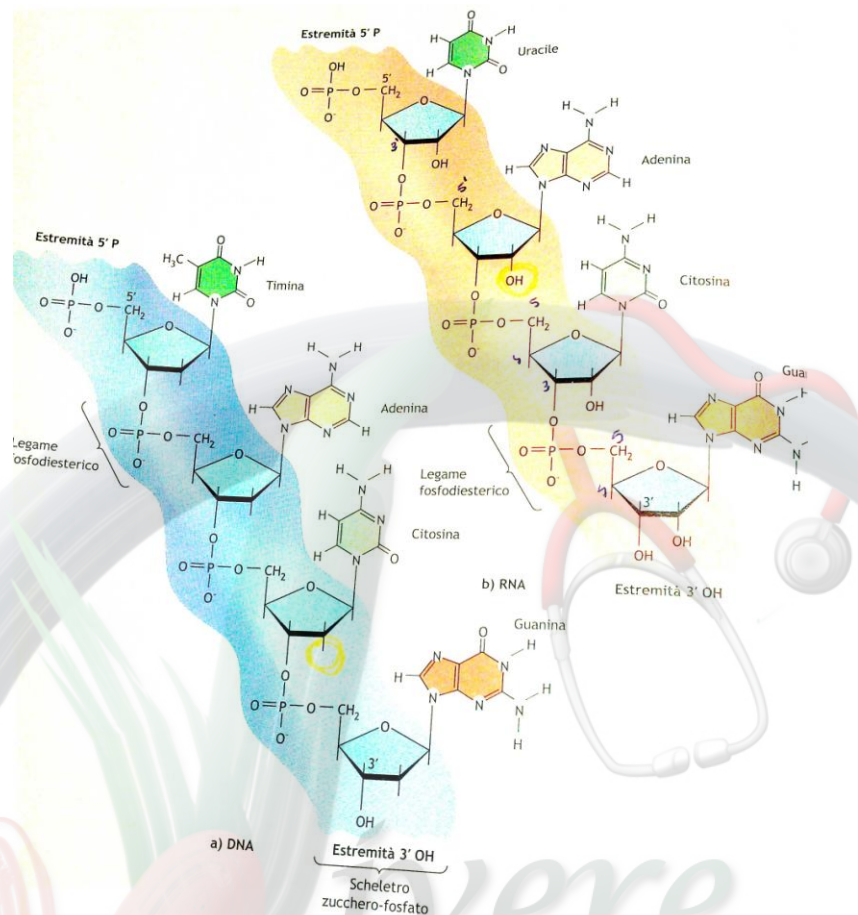
Come ripetutamente detto in precedenza il meccanismo di replicazione del DNA deve contemplare la possibilità di errori che, una volta inseriti stabilmente nel genoma e potendo essere ereditabili, costituiscono delle cosiddette mutazioni. Quindi, in un organismo pluricellulare, le mutazioni che sono a carico delle cellule della linea germinale vengono trasmesse alla progenie, mentre, quelle relative alla linea somatica, possono provocare l'insorgere di una trasformazione neoplastica o accelerare i processi di invecchiamento. Alterazioni della struttura del DNA, oltre che spontanee, possono essere indotte anche da fattori ambientali. Ad esempio i raggi ultravioletti possono provocare legami covalenti fra le basi pirimidiniche impilate su un singolo filamento generando dimeri di pirimidina. È dunque necessario riparare i danni e mantenere le frequenze di mutazione in valori sufficientemente bassi ma tali da garantire comunque la variabilità. In genere il meccanismo di correzione si basa sul riconoscimento del tratto da riparare, dovuto a distorsioni della doppia elica. I dimeri di pirimidina vengono rotti da un enzima chiamato **fotoliasi**, che si attiva a lunghezze d'onda della luce visibile intorno ai 320-370nm. Oltre alla riparazione alla luce, i dimeri possono essere rimossi anche grazie alla riparazione per escissione (excision repair) detta anche riparazione al buio. In questo caso viene riconosciuta la distorsione della doppia elica ed effettuato un taglio di alcuni nucleotidi a monte ed a valle del dimero. Dopo la rimozione del tratto da correggere rimane, così, una interruzione che deve essere riempita, cosa che viene prontamente assicurata dalla DNA polimerasi I, nei batteri, o δ negli eucarioti. Infine la ligasi salda i segmenti. Nella **riparazione dovuta alla glicosilasi** viene rimossa la base anormale dal desossiribosio a cui è legata. Ciò viene fatto da una glicosilasi che rompe il legame glicosidico che unisce la base allo zucchero. Questo sito senza la base viene definito a seconda dei casi, sito apurinico, se viene a mancare una purina; o sito pirimidinico, se viene a mancare una pirimidina. Una **AP endonucleasi**, dove AP sta per apurinico o pirimidinico, taglia lo scheletro zucchero-fosfato immediatamente a monte del sito caratterizzato dall'assenza della base. La DNA polimerasi inizia a sintetizzare dall'estremo 3' generato dal taglio un piccolo frammento di DNA rimuovendo anche alcuni nucleotidi adiacenti grazie all'attività esonucleasica 5' $\rightarrow$ 3'. La **riparazione per correzione di un**

appaiaimento errato tra basi (mismatch repair) prevede la rimozione di un lungo filamento che include la banda mal appaiata. Come fa l'enzima di riparazione a riconoscere il filamento di nuova sintesi ove è avvenuto l'errore, distinguendolo dal filamento stampo? Una confusione fra i due filamenti infatti stabilizzerebbe l'errore nella doppia elica! Il segnale di cui si avvale l'enzima di correzione, nei batteri, è la metilazione di A nelle sequenze GATC. Nella doppia elica parentale entrambi i filamenti sono metilati; quando la doppia elica si apre, i filamenti neo sintetizzati saranno demetilati per un breve periodo di tempo, quanto basta all'enzima correttore per riconoscere il filamento senza gruppi metilici, ed, in questo, la distorsione dovuta all'appaiaimento sbagliato. Il tratto di DNA contenente la base erroneamente inserita viene quindi rimosso e l'interruzione viene riempita dalle rispettive DNA polimerasi. Come al solito la ligasi completa l'opera. Altri meccanismi di riparazione, come ad esempio la rimozione di gruppi alchilici dalle basi non prevedono la sostituzione di tratti più o meno estesi di DNA, ma il diretto ripristino della base corretta. Se il DNA è danneggiato, la cellula esce dal ciclo cellulare e torna a dividersi solo se, eventualmente, il danno viene riparato. Il danneggiamento del DNA, prima e dopo la fase S, costituisce uno dei punti di controllo (check point) del ciclo cellulare. È stato recentemente ipotizzato, nel lievito, che una fosfatasi che attiva nel nucleo la ciclina B (responsabile dell'ingresso in mitosi) viene traslocata nel citoplasma in risposta al danneggiamento del DNA dopo la fase S. Viene così inibita l'attività della ciclina B e della sua chinasi e la cellula non può entrare in mitosi.

DODICESIMA LEZIONE ACIDO RIBONUCLEICO – RNA

L'acido ribonucleico è un polimero lineare di ribonucleotidi. Il monomero dell'RNA è costituito da una molecola di ribosio, una base azotata (A,G,C,U) ed una molecola di acido fosforico. La base azotata è legata al C1' con un legame C-N glicosidico, mentre l'acido fosforico è legato al C5' con un legame esterico. Analogamente al DNA anche per l'RNA vale il concetto di polarità individuata da 5' verso il 3'. La molecola di RNA è costituita da una singola elica che può assumere una struttura di ordine superiore formando dei tratti a doppio filamento grazie alla formazione di legami intraelica fra le due basi complementari (A=U e G≡C). un esempio è rappresentato dal tRNA che, per assumere forma a trifoglio, si piega nello spazio. Distinguiamo diversi tipi di RNA:

- **RNA ribosomale** (rRNA) che troviamo come costituente dei ribosomi
- **RNA messaggero** (mRNA) che porta l'informazione che deve essere tradotta in proteina
- **RNA di trasferimento** (tRNA) che è impegnato durante la sintesi proteica nel trasporto degli amminoacidi sul messaggero
- **Piccoli RNA citoplasmatici** (scRNA) che si trovano come componenti di ribonucleoproteine
- **Piccoli RNA nucleari** (snRNA) coinvolti nei meccanismi di splicing (maturazione dell'RNA eterogeneo nucleare)
- **Piccoli RNA nucleolari** (snoRNA) coinvolti nella maturazione dell'rRNA
- **microRNA** (miRNA) piccole catene di RNA coinvolte nella regolazione dell'espressione genica in piante e animali.



TREDICESIMA

LEZIONE: VIRUS

Caratteristiche generali

I virus rappresentano una delle forme di aggregazione molecolare più semplici esistenti in natura. Essi sono strutture biologiche incapaci di replicazione autonoma, che pertanto necessitano dell'interazione con una cellula che funga da ospite: possono essere quindi definiti *parassiti endocellulari obbligati*. In generale, la struttura virale è costituita da un solo tipo di acido nucleico (DNA o RNA) a singolo o a doppio filamento, che rappresenta il materiale genetico virale, e da un involucro proteico costituito da una o pochi tipi di proteine presenti in copie multiple – ogni tipo di proteina è codificata da un singolo gene virale. Tale struttura è definita **capside**, ed è tipica dei cosiddetti **virus nudi**. L'insieme dell'acido nucleico più il capsidone origina un **nucleocapside**, anche definito **virione** o **particella virale**. Molti virus, principalmente quelli animali possono presentare un involucro esterno al capsidone (**pericapsidone** o **envelope**) e sono definiti virus provvisti di involucro (enveloped viruses). L'envelope è normalmente costituito da un doppio strato fosfolipidico di origine cellulare, acquisito dalla cellula ospite al momento del rilascio dei virioni, e da molecole glicoproteiche codificate dal genoma virale. Le glicoproteine virali dell'envelope (**docking proteins**), o strutture superficiali paragonabili dei virus senza involucro, sono necessarie al virus per interagire con la cellula da infettare. L'interazione tra le proteine virali e la cellula è mediata da strutture recettoriali cellulari, e durante tale interazione le proteine del virus mimano i ligandi fisiologici dei recettori stessi. Spesso i singoli monomeri delle glicoproteine virali si associano a costruire delle formazioni chiamate spikes (spine) che consentono al virus di attaccarsi meglio allo specifico recettore cellulare; esse rappresentano i principali antigeni dei virus provvisti di envelope. L'interazione tra proteine virali e recettori cellulari è alla base della *specificità di ospite* o *tropismo virale*. Tutti i virus batterici (**batteriofagi**, o **fagi**) presentano una struttura caratterizzata da una **testa** o capsidone, di forma icosaedrica o filamentosa con

dimensione variabile. Come per gli altri virus, la testa, organizzata da una o pochi tipi di proteine presenti in copie multiple, racchiude l'acido nucleico. La maggior parte dei fagi presenta una **coda**, di varie dimensioni, costituita da un cilindro proteico cavo (nucleo centrale, o core), a simmetria elicoidale, attraverso il quale viene trasferito l'acido nucleico virale. In alcuni fagi, soprattutto i più complessi come il fago T4, la coda è circondata da una **guaina contrattile** separata dalla testa da un **collo** circondato da un collare. La struttura terminale della coda è costituita dalla piastra basale, da cui sporgono delle spine, e a cui sono attaccate delle fibre, contenenti le proteine di attacco ai recettori batterici. Non tutti i fagi hanno la piastra basale e le fibre della coda. In questi casi, altre strutture sono coinvolte nel legame della particella fagica al batterio. Tutti i virus possiedono sulla loro superficie proteine dette **proteine di attacco**, capaci di legare in maniera specifica siti recettoriali appropriati presenti sulla superficie di una cellula ospite. Tale interazione determina la specificità del virus per cui esso può entrare e replicarsi in una data cellula. La **gamma degli ospiti** di un virus è pertanto correlata alla distribuzione dei recettori cellulari che può andare da possibilità alquanto limitate, come per esempio il virus che causa il raffreddore nell'uomo, che è specifico per le cellule del tratto respiratorio superiore, a condizioni di più larga possibilità, cioè di potere infettare tipi di cellule abbastanza differenti, oppure lo stesso tipo di cellula ma di molte specie ospiti, come nel caso dell'influenza che può replicarsi in anatre, polli, uccelli selvatici, maiale e uomo. I virus, una volta entrati nella cellula, perdono la loro individualità strutturale in seguito alla perdita del capside e dell'eventuale involucro ipoproteico; sono costituiti da acido nucleico e proteine che in parte controllano l'attività biosintetica della cellula ospite avendo come fine ultimo quello di replicare il materiale genetico virale e di portare alla sintesi delle proteine virali. Alcuni virus possono integrare il loro acido nucleico in quello della cellula ospite. In tale modo, il genoma virale, detto **provirus**, si replica ogni qualvolta si replica il materiale genetico della cellula, riacquistando la capacità di produrre dei virioni, nel momento in cui si verificano determinate condizioni.

Classificazione

Per lungo tempo uno dei problemi più pressanti per i virologi è stato quello di rispondere alla necessità di una classificazione che riunisse in gruppi principali quei virus che mostravano proprietà simili. La difficoltà nell'affrontare tale problematica è stata sempre legata inevitabilmente alla scelta dei criteri su cui basare una classificazione che rispondesse alle varie esigenze ed interessi delle diverse categorie di studiosi.

Si sono succedute classificazioni basate sulle cellule ospiti in cui i virus si riproducono (tassonomia: Ordine virales; sottordine= phagineae, batteri; zoophagineae= cellule animali; phitophagineae= cellule vegetali) o sull'affinità dei virus per i tessuti (virus neurotropi, dermatropi, viscerotropi). Con l'accumularsi delle informazioni sulla chimica dei virus e sulle loro caratteristiche fisiche, grazie ai progressi soprattutto della microscopia elettronica, si è passati a sistemi di classificazione basati sulle proprietà intrinseche dei virus quali il tipo di acido nucleico, la simmetria del capside, la presenza o meno dell'envelope, le dimensioni, l'ospite. Probabilmente, la classificazione più utile è quella che si basa sul tipo di acido nucleico contenuto dal virus e sulla modalità della sua espressione. Questa classificazione viene riportata nel **Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of viruses (2005)**:

- Gruppo I: dsDNA viruses (DNA doppio filamento)
- Gruppo II: ssDNA viruses (DNA singolo filamento)
- Gruppo III: dsRNA viruses (RNA doppio filamento)
- Gruppo IV: positive-sense ssRNA viruses (RNA singolo filamento)
- Gruppo V: negative-sense ssRNA viruses (RNA singolo filamento)
- Gruppo VI: RNA reverse transcribing viruses (trascrittasi inversa di RNA)

- Gruppo VII: DNA reverse transcribing viruses (trascrittasi inversa di DNA)

Ciclo replicativo dei virus

I virus, poiché non hanno una struttura cellulare e non possono quindi svolgere attività metaboliche, non riescono a sopravvivere per molto tempo al di fuori della cellula, della quale, anzi, hanno bisogno per la loro replicazione. Anche se nelle linee generali il ciclo replicativo dei diversi virus è caratterizzato da un susseguirsi di eventi molecolari che si assomigliano, esistono delle sostanziali diversificazioni che dipendono essenzialmente dal tipo di virus. Ogni ciclo replicativo è rappresentato da momenti o fasi che riflettono un rapporto virus-cellula ospite tipico. Queste fasi in sintesi sono: 1) **attacco**; 2) **penetrazione**; 3) **liberazione dell'acido nucleico**; 4) **replicazione e biosintesi**; 5) **assemblaggio**; 6) **rilascio**.

Virus eucariotici

- **Attacco** In questa fase il virus si aggancia alla cellula ospite mediante un legame specifico tra le proteine di attacco presenti sulla superficie del suo capsido, o che si proiettano all'esterno dall'involucro lipoproteico - envelope - (per i virus che ne sono provvisti), e i siti recettoriali presenti sulla superficie della cellula bersaglio. Tale interazione richiede l'attività di ioni in grado di ridurre le repulsioni elettrostatiche.
- **Penetrazione** Il virus entra nella cellula ospite. I virus eucariotici hanno evoluto due diverse modalità per mezzo delle quali sono in grado di attraversare le membrane cellulari ed entrare nel citoplasma: a) per **fusione**, processo pH-indipendente, in cui l'involucro esterno virale si fonde con la membrana cellulare portando così il nucleocapside all'interno della cellula; b) per **endocitosi mediata da recettore**, processo pH -dipendente, in cui il virus, dopo essersi attaccato ai recettori cellulari, viene inglobato in una vescicola rivestita da **clatrina** la quale, una volta all'interno della cellula, perde il rivestimento di clatrina e si fonde con un **endosoma**. Il pH acido interno dell'endosoma induce un cambiamento conformazionale nelle proteine dell'envelope portando all'esposizione di domini idrofobici che facilitano la fusione delle membrane endosomale e virale con conseguente liberazione del nucleocapside nel citoplasma. La penetrazione per endocitosi riveste carattere di obbligatorietà per i cosiddetti virus nudi, mentre i virus provvisti di envelope possono sfruttare entrambi i meccanismi.
- **Liberazione dell'acido nucleico** (**uncoating**, perdita del rivestimento) Dopo la penetrazione all'interno della cellula, le proteine capsidi che o nucleocapsidiche virali vengono degradate, ed il genoma virale viene liberato nel citoplasma dove, a seconda della natura del virus, può rimanere oppure può essere indirizzato al nucleo prima di passare alla fase successiva del ciclo.
- **Replicazione e biosintesi** Il genoma virale può contenere le informazioni genetiche necessarie per la sintesi di tre classi di proteine: a) particolari enzimi richiesti per la replicazione del genoma virale; b) fattori per inibire, a seconda dei virus, la duplicazione del DNA, la trascrizione o la traduzione degli mRNA della cellula ospite; c) proteine strutturali per assemblare nuovi virioni. Qualunque sia il tipo di acido nucleico posseduto, il virus, per raggiungere i propri fini, deve quindi inibire i normali processi vitali della cellula ospite ed "impadronirsi" del macchinario biosintetico cellulare per favorire la replicazione virale. Il ruolo centrale per raggiungere questo scopo è occupato dalla

molecola dell'mRNA virale che deve essere tradotto in proteine strutturali virali e in proteine enzimatiche coinvolte nella degradazione dell'acido nucleico della cellula ospite (in alcuni casi) e nella replicazione del genoma del virus. I genomi virali devono anche fornire lo stampo che può essere replicato per produrre una progenie di genomi identici che poi singolarmente saranno impacchettati nei virioni di nuova produzione. Ovviamente i dettagli di questo processo variano tra i differenti tipi di virus.

- **Assemblaggio** Una volta che le molecole di acido nucleico e di proteine strutturali virali si accumulano nella cellula, comincia un processo di auto assemblaggio favorito per alcuni virus dalla attività di proteine cellulari chiamate **chaperonine**, che giocano un ruolo critico nel determinare un ripiegamento corretto nel determinare un ripiegamento corretto delle molecole proteiche. Alcuni virus assemblano i vari componenti in particelle "immature" che necessitano di ulteriori modificazioni per produrre particelle infettive mature.
- **Rilascio** In questa fase, i virioni di nuova produzione vengono liberati all'esterno della cellula. La liberazione dei virioni nudi solitamente dipende dalla "lisi" della cellula. I virus provvisti di envelope, invece, possono essere rilasciati dalla cellula mediante un processo di **gemmazione**, che si attua in due fasi: 1) prima vengono inserite nella membrana le glicoproteine, codificate dal virus, le quali con il loro dominio citoplasmatico possono interagire con le proteine capsidi che provocando l'avvolgimento della membrana stessa intorno al capside; 2) subito dopo i virus vengono rilasciati dalla cellula, la cui membrana può definitivamente rilassarsi.

Gli esiti di una infezione virale possono essere diversi:

- **Infezione produttiva:** le cellule sono **permissive**, consentono cioè la replicazione virale e l'esito è quindi la formazione ed il rilascio di una progenie virale, con conseguente morte della cellula in maniera diretta per i virus "nudi" o anche indiretta, attraverso cioè eventi quali l'**apoptosi** o la **necrosi**.
- **Infezione abortiva:** le cellule sono **non permissive** perché mancano alcuni fattori cellulari necessari, con conseguente mancanza di produzione di particelle virali.
- **Infezione restrittiva:** le cellule sono transitoriamente permissive, ma vengono prodotti pochi virus. La produzione virale poi cessa ma il genoma del virus persiste nella cellula ospite, stabilendo una cosiddetta infezione **latente**, come per esempio nel caso di infezioni da virus di Epstein-Barr o Herpes simplex. Le infezioni latenti, però. Possono trasformarsi in infezioni produttive mediante attivazione da parte di vari stimoli, come rialzi termici o stress.

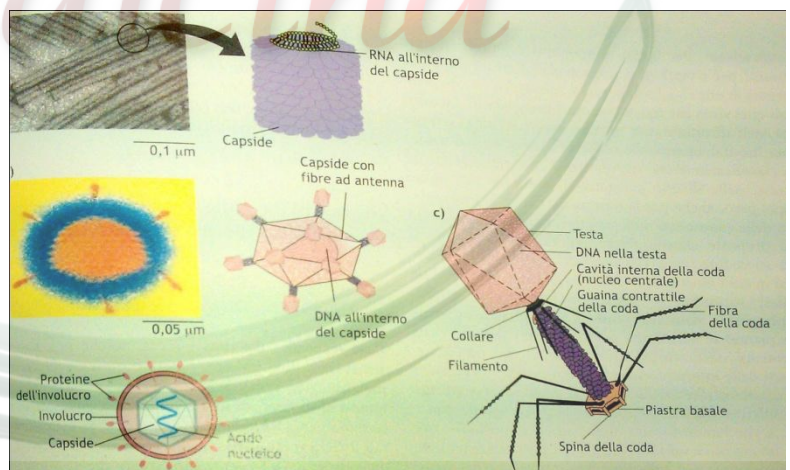
In una piccola percentuale di cellule animali "non permissive", l'infezione con certi virus può portare alla **trasformazione cellulare**, cioè a cambiamenti genetici stabili che innescano un processo di crescita cellulare incontrollata (**immortalizzazione**). Negli animali, tali cambiamenti cellulari indotti da virus possono esitare in cancro. I virus responsabili della trasformazione neoplastica sono chiamati **oncogeni** o **tumoral**i e possono essere virus a DNA o RNA:

- **Virus a DNA** – sicuramente fra i più studiati il virus **SV40** e il virus del **Polioma**. Nell'uomo, i virus del **papilloma HPV**, che possono causare tumori benigni, verruche o tumori maligni del pene, della vulva e della cervice uterina; il virus dell'**epatite B**; alcuni virus **erpetici**, fra cui il virus di **Epstein-Barr**, che causa il sarcoma di Burkitt.
- **Virus a RNA** – fra questi i **retrovirus** che possiedono geni, **oncogeni virali**, che rappresentano versioni modificate di normali geni cellulari. Tra i più noti, **HTLV-1**, che causa leucemia T o linfomi; **HIV-1** il virus dell'AIDS.

I virus possono provocare il cancro per i loro effetti principalmente su due importanti tipi di geni o sui loro prodotti genici: **geni soppressori tumorali e oncogeni**, che entrano in gioco in maniera critica nella regolazione cellulare.

Batteriofagi

- **Attacco** In questa fase il batteriofago si ancora alla cellula batterica mediante legame tra le proteine di attacco presenti sulle estremità libere delle fibre della coda e i recettori specifici esistenti sulla superficie della cellula batterica. Questo attacco viene rafforzato grazie alla piastra basale, che si sistema sulla superficie del batterio legandosi saldamente ad essa.
- **Penetrazione** Una volta formato un legame irreversibile con la cellula batterica, il fago inietta il suo acido nucleico all'interno della cellula ospite. Tale evento è favorito dall'azione di un enzima del fago associato alla piastra basale, il **lisozima**, che determina



la rottura di una porzione della parete batterica, e dalla contrazione della guaina della coda che fa sì che il tubo costituente il nucleo centrale venga fatto passare attraverso la membrana del batterio. In questo modo, l'acido nucleico del fago passa attraverso il nucleo centrale nella cellula, mentre il capsid rimane all'esterno. I fagi che non possiedono la guaina contrattile, per espletare questa fase si servono di un meccanismo

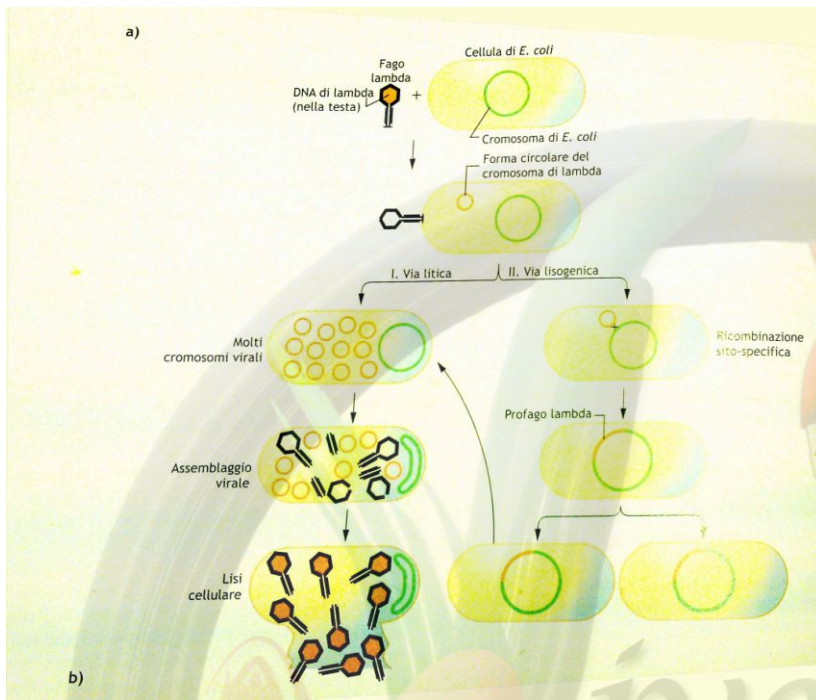
di iniezione del DNA simile a quello descritto sopra per i fagi T-pari ed entrano nella cellula lasciando fuori il capsido.

- **Replicazione** i fagi possono moltiplicarsi attraverso due meccanismi alternativi: il **ciclo litico** o il **ciclo liso genico**.

1. **Ciclo litico** è caratteristico dei **fagi litici o virulenti**, consente la moltiplicazione dei fagi e alla fine del processo si ha la morte cellulare per lisi. Durante questo ciclo si verificano:

- Un **periodo di eclisse** – subito dopo l'ingresso del DNA fagico nella cellula, viene sintetizzato mRNA fagico, dalla cui traduzione, mediante l'uso dell'apparato biosintetico cellulare, vengono prodotte **proteine fagiche precoci (early proteins)**: alcune sono nucleasi che degradano il DNA della cellula ospite, altre servono alla replicazione del DNA fagico che si serve dei nucleotidi ottenuti dalla degradazione del DNA dell'ospite, mentre altre ancora interagiscono con l'RNA polimerasi batterica modificandola in modo da non permetterle più di legarsi ai promotori dei geni batterici, impedendone così l'espressione. Al momento della sintesi di nuovo DNA fagico, i nucleotidi di origine cellulare contenenti citosina vengono trasformati, da parte di enzimi fagici, in nucleotidi aventi idrossimetilcitosina (HMC) impedendo così che le molecole di DNA fagico vengano degradate dagli stessi enzimi fagici che degradano il DNA batterico. In un secondo momento, verso la metà del ciclo, la stessa RNA polimerasi viene ulteriormente modificata in modo da riconoscere i geni fagici tardivi, la cui espressione porterà alla sintesi delle **proteine fagiche tardive (late proteins)**, cioè proteine strutturali del fago. Questa fase viene chiamata eclissi perché durante questo periodo non si evidenziano particelle fagiche infettanti né all'esterno né all'interno del batterio.
- La **maturazione** – le proteine capsidi che sintetizzate si autoassemblano ed il DNA viene impacchettato nella testa. In ultimo si aggiungono le fibre della coda e le particelle fagiche si accumulano nella cellula batterica.
- Il **rilascio** – un enzima virale, chiamato **lisozima**, assieme ad altre proteine tardive, determina la rottura della membrana cellulare, consentendo così la liberazione nel mezzo extracellulare delle nuove particelle fagiche. La cellula batterica muore. Il numero dei fagi prodotti dall'infezione di un solo batterio può arrivare a 200.

2. **Ciclo liso genico** è tipico dei fagi cosiddetti **lisogenici o temperati** i quali possono moltiplicarsi attraverso un ciclo litico o, alternativamente, entrare in uno stato di quiescenza nella cellula ospite. Quando un virus



entra nel ciclo liso genico, il suo cromosoma “ricombina” con il cromosoma della cellula ospite **integrandosi** in esso. Il DNA del fago inserito viene chiamato **profago**, in quando non è un vero fago, ma ha la potenzialità di produrne uno. Le cellule che contengono un profago vengono chiamate **batteri lisogeni**. Delle proteine di repressione, codificate da alcuni geni del profago, impediscono la trascrizione di tutti gli altri geni dello stesso profago; in questo modo viene repressa la sintesi ed il rilascio di nuovi fagi. In questa condizione, ogni volta che il cromosoma batterico si replica, viene replicato anche il profago. Quest’ultimo può rimanere latente

all’interno del cromosoma batterico per molte generazioni. In qualsiasi momento, però, un evento “avverso” (esposizione ai raggi UV o ionizzanti, ad agenti chimici mutageni etc.) può determinare la produzione di proteasi che degradano le proteine di repressione. Di conseguenza i geni del fago vengono espressi, il genoma fagico viene liberato dal cromosoma batterico e può così cominciare un ciclo litico.

Origine e natura dei virus

Diverse sono le teorie che tendono a spiegare l’origine dei virus:

- **Evoluzione retrograda (degenerazione parassitaria)**, secondo la quale i virus sarebbero delle forme di vita degenerate che hanno perso moltissime funzioni che gli altri organismi possiedono ed hanno conservato l’informazione genetica necessaria per l’espletamento della loro vita parassitaria.
- **Origini cellulari (evasione di geni)**, secondo la quale i virus deriverebbero da porzioni del genoma della cellula che si sono rese indipendenti, acquisendo nel tempo un involucro proteico e modificandosi, così, in agenti capaci di infettare altre cellule.

- **Entità indipendenti (coevoluzione con i procarioti e poi con gli eucarioti)**, secondo cui i virus si sono evoluti seguendo una via parallela a quella degli organismi cellulari, a partire da molecole capaci di auto replicazione esiste nel primitivo “mondo a RNA”

In tutti i casi certamente essi sono evoluti dopo la comparsa delle cellule.

VIROIDI E PRIONI

In aggiunta ai virus, le cellule animali e delle piante possono essere infettate da agenti con una struttura ancora più semplice di quella dei virus, caratterizzata dalla sola presenza di una molecola di acido nucleico (viroidi) o, sorprendentemente, di una molecola proteica (prioni).

Viroidi

I viroidi sono piccoli agenti infettivi delle piante, per la prima volta descritti nel 1971. Essi si distinguono dai virus per le dimensioni molto più piccole della grandezza del virus più piccolo perché: 1) caratterizzati esclusivamente da un genoma costituito da RNA circolare, 2) i loro genomi non codificano alcuna proteina e 3) non esistono in forma libera.

Se ne conoscono più di 25 tipi suddivisi in due famiglie:

Pospoviridae, che si replicano nel nucleo delle cellule secondo un meccanismo di replicazione conosciuto come **a cerchio rotante asimmetrico**

Avsunviroidae, che si replicano nei cloroplasti della cellula ospite, secondo il modello replicativo **a cerchio rotante simmetrico**

La loro diffusione può avvenire per trasporto meccanico o per propagazione vegetativa e probabilmente anche per mezzo di insetti.

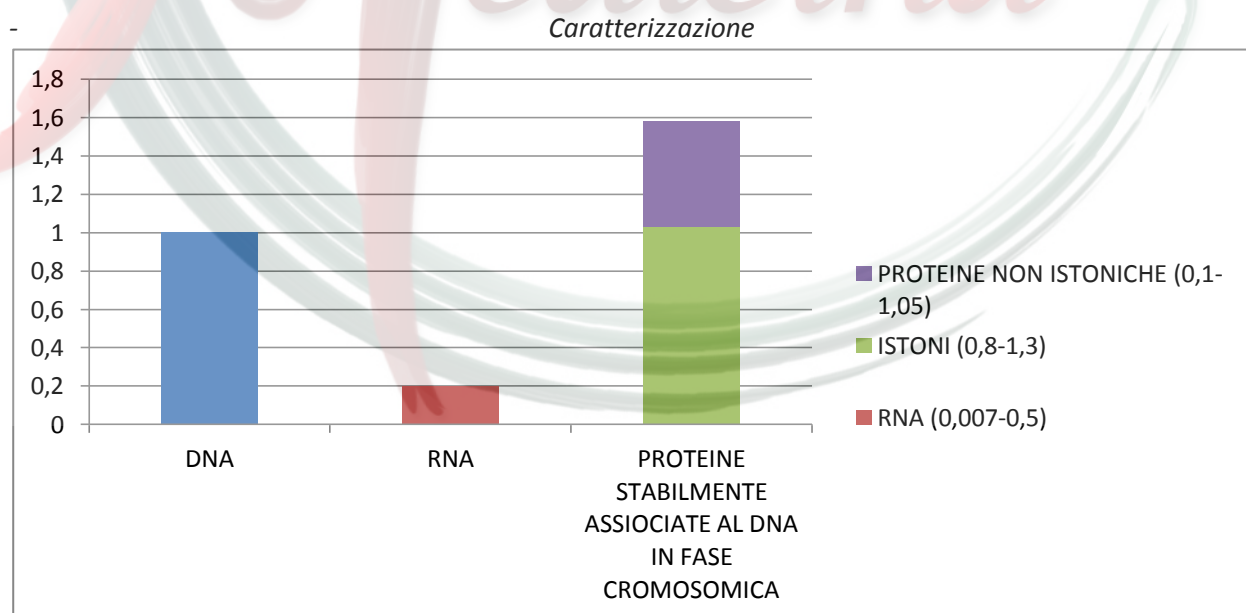
Prioni

Nel 1967 S. Griffith propose per primo l'ipotesi, **protein only**, che tendeva a spiegare come agenti infettivi presumibilmente costituiti soltanto da proteine ed assolutamente privi di acidi nucleici potessero essere responsabili di alcune malattie degli animali e dell'uomo che colpiscono il sistema nervoso distruggendo in massa i neuroni, portando fatalmente a morte gli individui infetti. Oggi viene più accettato che queste malattie, generalmente classificate come Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (TSE), siano causate da **prioni**, termine coniato nel 1982 ad indicare agenti infettivi, costituiti da sole proteine, trovati nel materiale infettivo purificato da tessuti nervosi colpiti. Certamente l'ipotesi che una proteina possa avere capacità infettanti per certi versi è controversa. Tuttavia, le proprietà dei differenti amminoacidi che costituiscono una proteina influenzano il suo ripiegamento determinandone la struttura e la conformazione specifica, e di conseguenza la funzione biologica: differenti sequenze amminoacidi che producono proteine con differenti conformazioni e funzioni. La proteina di cui è composto un prione è stata chiamata **PrP**, un abbreviazione di Prion-Related-Protein, e nel '85 è stato isolato il gene che la codifica (**PRNP**), indagini più avanzate hanno consentito di identificare più forme della proteina: a) una forma normale presente nelle cellule del sistema nervoso, chiamata **PrPC** (la C sta per cellulare), in cui sono presenti corte sequenze di amminoacidi

organizzate a foglietto β , e prevalenza di regioni α -elica. Tale proteina è probabilmente coinvolta nel trasporto di ioni, e nei processi di segnalazione cellulare, o azioni cellula-cellula; b) una forma presente nel materiale infetto, denominata **PrPSc** (Sc sta per Scrapie, malattia da prione che si verifica nelle pecore), in cui le regioni a foglietto β sono più estese, resistente alle proteasi, enzimi che normalmente degradano le proteine. Nonostante i ripetuti tentativi fatti, la PrPSc è il solo agente infettante isolabile da tessuti affetti dalla malattia, mentre non è stata mai riscontrata la presenza di acidi nucleici. Alcune malattie da prioni sono le malattie che possono essere sporadiche, familiari o infettive. Nel gene PRNP di persone affette da malattia prionica ereditaria sono stati riscontrati più di 20 tipi di mutazioni che portano la cellula a produrre proteine prioniche con struttura anormale. La proteina anormale, PrPSc, si accumula nel cervello e distrugge le cellule nervose, determinando così le caratteristiche mentali e comportamentali delle malattie da prioni. Diversi altri cambiamenti nel gene, chiamati *polimorfismi* non causano malattia, ma aumentano il rischio dell'individuo ad ammalarsi o comunque ad avere una alterazione del corso della malattia. Differenze nella sequenza amminoacidica di PrP giocano un ruolo importante nel determinare se prioni di una specie possono infettare ospiti di specie diversa. I prioni quindi entrando nelle cellule nervose convertono la proteina normale PrPC nella forma proteica prionica PrPSc. Dal punto di vista molecolare le regioni normalmente configurate al α -elica si rilassano formando foglietti β più estesi. Sempre più molecole PrPC si trasformano in molecole di PrPSc finché alla fine i prioni riempiono completamente le cellule nervose. Le cellule cominciano a funzionare sempre meno fino ad arrivare alla morte cellulare con rilascio dei prioni che entrano in altre cellule, e le infettano e le distruggono, lasciando il tessuto "crivellato" di buchi, da cui la similitudine con una spugna (spongiforme) tipiche malattie da prioni riscontrabili nell'uomo sono la malattia di Creutzfeldt-Jacob; la sindrome di Gerstmann-Straussler-Scheinker, denominata "fatal familial insomnia". Tra gli animali le più note soprattutto per l'eco mediatico sono la sindrome della mucca pazza (BSE, bovine spongiform encephalopathy) e lo scrapie.

QUATTORDICESIMA LEZIONE: CROMATINA

Costituzione chimica della cromatina



ISTONI: caratteristica basicità, eccesso di carica positiva

PROTEINE NON ISTONICHE: associate al DNA nei momenti non funzionali, notoriamente acide, in contrapposizione alla basicità degli istoni

Nucleoproteine → N.B. il DNA NON è una nucleo proteina

- **PROTAMINE** *basiche, simili agli istoni, esistenti in alcune specie animali, retaggio evolutivo, associate al DNA anche nella fase non funzionale.*
- **PROTEINE NON ISTONICHE** *DNA-RNA polimerasi, proteine che regolano l'assemblarsi ed il disassemblarsi del DNA in cromosomi, particolarmente presenti in interfase.*
- **ISTONI** *piccole proteine; presentano residui basici (Arg, Lys); classificati per la quantità di Arginina e Lisina.*

Istone H1 – molto ricco di Lisina

Istone H2A – poco ricco di Lisina

Istone H2B – molto ricco di Lisina

Istone H3 – molto ricco di Arginina

Istone H4 – molto ricco di Arginina

TRASCRIZIONE MATURAZIONE DEGLI RNA

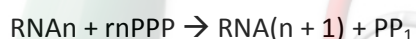
Introduzione

L'informazione scritta sulla molecola di DNA è costituita da un alfabeto composta da desossiribonucleotidi e costituisce una "banca dati" che viene resa operativa per esplicare le diverse funzioni cellulari. Questo alfabeto deve essere trasformato in modo che sia comprensibile per tutto l'apparato che è deputato a fabbricare quanto il DNA richiede. Le molecole che costituiscono l'interfaccia tra il DNA, che non è in grado di portare l'informazione dove serve, e l'apparato biosintetico sono gli RNA. Il riscrivere le sequenze desossiribonucleotidiche del DNA in sequenze ribonucleotidiche, cioè in molecole di RNA, costituisce il processo definito **trascrizione** e l'RNA sintetizzato viene comunemente denominato **trascritto**. Generalmente viene detto che la funzione degli RNA è strettamente connessa con la sintesi proteica dal momento che gli RNA prodotti interagiscono fra loro per promuovere la formazione dei legami peptidici. Una recente acquisizione circa l'RNA riguarda il fatto che ad esso sono ascrivibili svariate funzioni, non strettamente correlate con la sintesi di proteine. Così l'RNA può partecipare ad un'attività catalitica, o addirittura svolgerla. Infatti, essendo un **ribozima**, può partecipare al riconoscimento di segnali in processi maturativi di proteine o degli stessi RNA e può intervenire nei meccanismi connessi al compattamento della cromatina. Il ritrovamento in cellule eucariotiche di doppi filamenti RNA-RNA di difficile e solo recentissima

interpretazione funzionale (**smallRNA, microRNA**) fa pensare che anchra molto c'è da capire sulle attività di questa molecola e che la suddivisione dell'RNA in tre rigide categorie quali l'RNA messaggero, RNA ribosomale e RNA transfer possa essere considerato ormai superata.

Caratteristiche generali della trascrizione

La sintesi degli RNA segue regole che sono generali per la polimerizzazione degli acidi nucleici e che riguardano la necessità dell'esistenza di uno stampo, che detta la direzione della crescita della catena polinucleotidica, e la direzione stessa di crescita, che avviene dal terminale 5' al terminale 3'. L'apparato enzimatico che opera viene denominato RNA polimerasi, ed i nucleotidi che verranno adoperati saranno ribonucleosidi trifosfati in 5' e precisamente l'adenosina trifosfato (ATP), la guanosina trifosfato (GTP), la citidina trifosfato (CTP) e l'uridina trifosfato (UTP). La reazione generale non necessita di alcun innesco, contrariamente alla replicazione del DNA, può essere schematizzata nel seguente modo:



Il ribonucleoside trifosfato (rnPPP) perde il pirofosfato (PP_i), per legarsi all'RNA nascente, e la successiva idrolisi di PP_i in due molecole di fosfato inorganico renderà altamente esoergonica la reazione, stabilizzando notevolmente il legame fosfodiesterico. Delle due eliche di DNA, generalmente, viene copiata come RNA solo un'elica che funge da stampo, ed è quella che contiene l'informazione. Un dato filamento però può essere trascrivente per alcuni tratti e non trascrivente per altri. Il tratto che viene trascritto (che definiamo per ora gene) deve contenere dei segnali che indicano ove l'RNA polimerasi riconosce l'elica senso e segnale di termine della trascrizione. Tuttavia esistono eccezioni a questa regola, infatti il fago T4 usa alternativamente le due eliche dello stesso tratto di DNA in due fasi diverse dell'infezione. Anche negli eucarioti sono state individuate tali eventualità: è il caso, ad esempio, nei vertebrati, del tratto di DNA che contiene il gene per il fattore ipotalamico di rilascio delle gonadotropine (GnRH). In questo caso si individua la possibilità che si generino molecole RNA-RNA complementari. Si indica come **promotore** il sito del DNA ove si lega la RNA polimerasi prima di iniziare la trascrizione. La polimerasi scorre dal 3' al 5'. Di conseguenza la molecola di RNA che emerge sarà identica in sequenza di basi all'elica non trascrivente del DNA con la sostituzione di U nell'RNA al posto di T. risulta quindi più comodo scrivere le sequenze dei geni considerando la sequenza di basi dal 5' al 3' del filamento non trascrivente, perché leggendo questo filamento si legge la sequenza dell'RNA. Questa convenzione si usa anche per indicare tratti di DNA che non vengono trascritti come ad esempio i promotori. I tratti di RNA che vengono sintetizzati possono essere estremamente lunghi, per cui l'enzima deve rimanere adeso al DNA in modo stabile dal punto di inizio della trascrizione fino alla terminazione. Inoltre la velocità di trascrizione è più bassa di quella di replicazione. Quest'ultima proprietà fa prevedere che gli apparati enzimatici preposti rispettivamente alla replicazione ed alla trascrizione possano collidere. Tre sono le soluzioni ipotizzabili nel caso di una collisione:

- a) L'apparato di replicazione può spiazzare completamente l'apparato di trascrizione
- b) L'apparato di replicazione può rallentare e inseguire l'apparato di trascrizione
- c) L'apparato di replicazione può sorpassare l'apparato di trascrizione senza spiarlo dallo stampo

È evidente che preservare il lavoro svolto sia sempre vantaggioso; così, dato che i legami fra ribonucleotidi vengono effettuati grazie ad un notevole sforzo energetico da parte della cellula, sembra logico pensare che la forcella di replicazione passi attraverso l'apparato di trascrizione senza spiarlo. Di conseguenza la

trascrizione potrà riprendere dopo un momento di pausa. Infatti, sono stati descritti i geni la cui trascrizione dura più a lungo della fase G1 ed S. quando la forcella di replicazione giunge a ridosso della RNA polimerasi provoca una momentanea destabilizzazione dell'ibrido DNA-RNA. L'RNA nascente rimane legato all'RNA polimerasi che si comporta in modo da essere comunque adesa al DNA stampo, e ciò assicura la ripresa della trascrizione alle spalle della DNA polimerasi. Si ipotizza che ciò avvenga durante la trascrizione e non quando l'RNA polimerasi abbia appena riconosciuto il promotore. Questa interazione non è molto forte, per cui l'RNA polimerasi sarebbe completamente eliminata dal sistema.

Trascrizione nei batteri

L'enzima chiave della trascrizione, l'RNA polimerasi, è costituito in tutti i batteri da quattro subunità che formano il "core". Il core della molecola, cioè l'**apoenzima**, risulta quindi dall'assemblaggio di due subunità α , una subunità β , ed una subunità β' . L'**oloenzima**, cioè la molecola completa, prevede l'assemblaggio di un altro componente, la subunità σ , al core della molecola. La subunità σ lega direttamente i promotori sul DNA. L'**apoenzima** non può iniziare la trascrizione, ma può allungare il trascritto dopo la fase di inizio della trascrizione, e la dissociazione dall'oloenzima dalla subunità σ . Sono state isolate diverse subunità σ e ciascuna di esse conferisce al l'apoenzima specificità di legame a differenti promotori e la capacità di rispondere a differenti segnali di regolazione dell'attività trascrizionale. Così, un oloenzima contenente una subunità σ può individuare solo una determinata classe di promotori. I promotori batterici degli mRNA sono costituiti da due serie di sequenze nucleotidiche definite -35, -10. Il segno - sta a indicare la distanza, in numero di nucleotidi, dal punto di inizio della trascrizione indicato come +1. La sequenza -10 risulta ricca di adenine e timine che, essendo collegate alle timine e adenine complementari con due legami idrogeno per coppie di basi, consentono una più facile apertura della doppia elica rispetto a regioni ricche di citosina e guanina. Questa regione viene definita **PRIBNOW BOX**. Una volta che la doppia elica del DNA si è aperta, inizia la sintesi dell'RNA in direzione 5' $\rightarrow$ 3' a partire dal nucleotide +1 rispetto al promotore. La sintesi dell'RNA non procede a velocità costante ma subisce dei **rallentamenti (pause) dovuti alla presenza di tratti ricchi di citosine e guanine sul DNA**. i tre legami a idrogeno, per ogni coppia C-G, quindi, ostacolano lo scorrimento dell'RNA polimerasi. Un certo numero di coppie C-G caratterizzano i siti ove la trascrizione termina. Questi siti, inoltre, sono formati da sequenze palindromiche che, sull'RNA, portano alla formazione di **anse (loops)**. Sembra che il forte rallentamento della polimerasi al **sito terminatore** costituisca il segnale per il rilascio del trascritto. Esiste anche una modalità di termine della trascrizione che dipende dall'esistenza di un **fattore p**. Questa è una proteina tetramerica con attività ATP-asi che sull'RNA nascente insegue la polimerasi viaggiando a velocità costante. Approfittando dei rallentamenti della polimerasi, p la raggiunge in prossimità del loop, che, a differenza della **terminazione p – indipendente**, non è molto ricco di C-G. il ruolo del fattore p nella terminazione p – indipendente sarebbe quello di favorire il distacco del trascritto. In alcuni casi l'RNA polimerasi ha bisogno di attivatori per poter essere ancorata al promotore. Un fenomeno, questo, che è descritto come "recruitment". Uno degli attivatori maggiormente studiato è la proteina CAP (catabolite activator protein) che si lega ad una sequenza molto vicina al promotore dei geni, che operano per il catabolismo del lattosio (lac) e del galattosio (gal). È chiaro che gli attivatori non necessariamente devono interagire con α , ma altre parti della polimerasi possono essere coinvolte in questa interazione proteina-proteina che regolano la trascrizione. I promotori, inoltre, possono anche interagire con **repressori** che, chiaramente, riducono il livello di trascrizione. L'RNA polimerasi può formare trascritti che possono portare più informazioni nello stesso filamento di RNA. In questo caso, il trascritto, sarà definito **mRNA policistronico**, lì dove il cistrone è un segmento di DNA cui corrisponde un solo peptide.

Maturazione degli RNA nei batteri

Gli mRNA batterici sono caratterizzati da pochi eventi maturazionali, dal momento che la loro estremità 5' è immediatamente catturata dai ribosomi che legano l'mRNA in un processo di traduzione che avviene contemporaneamente alla trascrizione. Alcune basi all'interno del trascritto possono essere metilate ed in alcuni casi viene anche descritta l'aggiunta di una piccola coda di ribonucleotidi, contenenti adenina, detti poliA, come negli eucarioti. Gli rRNA batterici hanno un coefficiente di sedimentazione di 16S, 23S e 5S. Questi rRNA hanno un ruolo chiave nella sintesi proteica. In E. coli il DNA possiede sette copie di tratti di DNA, oltre le sequenze stampo per il 16S, il 23S, ed il 5S, nell'ordine, possiede anche le sequenze per alcuni tRNA. Questo DNA possiede due promotori localizzati, il primo a -300, ed il secondo a 110 nucleotidi a valle del primo. Ogni promotore a sua volta possiede sequenze simili a quelle descritte per gli mRNA. L'RNA precursore, che emerge da ognuno dei sette tratti di DNA distribuiti nel cromosoma circolare, possiederà tratti spaziatori e tratti che corrispondono agli rRNA e ai tRNA. Sia gli rRNA che i tRNA vengono lasciati grazie a tagli che sono effettuati da endonucleasi, le RNasi. Mentre alcuni tRNA derivano dall'RNA precursore, che genera prevalentemente gli rRNA, la maggior parte dei tRNA proviene dalla sequenza di DNA contenenti l'informazione per più molecole di tRNA, e possono essere di tipo diverso. La sequenza 5' - CCA -3', che caratterizzano l'estremo 3' di tutti i tRNA, solo in alcuni casi tRNA viene aggiunto come evento post-trascrizionale. Un evento maturativo di tutti i tRNA è la modificazione delle basi canoniche che porta alla formazione delle basi rare, quali, ad esempio **l'ipoxantina, il diidrouacile, e anche la stessa timina**. Negli archeobatteri e nei ciano batteri, sono state identificate anche **sequenze introni che**, dotate loro stesse della capacità enzimica (**ribozima**) di eliminarsi dal precursore. Questo fenomeno di auto-splicing, riveste una particolare importanza nella formulazione della teoria **"RNA WORLD"**

Trascrizione negli eucarioti

L'apparato di trascrizione negli organismi eucariotici risulta molto più complesso rispetto a quello precedentemente descritto per i procarioti, ed in particolare per gli eubatteri. Tale complessità riguarda sia l'apparato enzimatico e le sue interazioni con altre proteine sia le sequenze non trascritte che modulano l'attività di un gene a questo livello. Tre sono le RNA polimerasi che agiscono negli eucarioti e vengono denominate **RNA polimerasi I, II e III** le funzioni delle tre polimerasi sono diverse, il che significa che riconoscono promotori diversi. In particolare, la RNA polimerasi I sintetizzerà il precursore 45S che nel nucleolo maturerà negli RNA 18S 28S 5,8S, la RNA polimerasi II sintetizzerà gli mRNA e la RNA polimerasi III sintetizzerà l'rRNA 5S e i tRNA. Nella cellula eucariotica agisce anche un'altra classe di RNA, i piccoli RNA (**small RNA: sRNA**), che può ancora essere suddivisa in sRNA nucleari (**snRNA**), sRNA nucleolari (snoRNA) e sRNA citoplasmatici (**scRNA**). Questi piccoli RNA sono associati a proteine e, nel nucleo, costituiscono le **snRNP** (small nuclear riboprotein particles). La RNA polimerasi II sintetizza la maggior parte degli snRNA, mentre la RNA polimerasi II sintetizza qualche snRNA e l'unico scRNA conosciuto finora (la particella **SRP**) gli snoRNA sono generati dalla RNA polimerasi II come risultato del processo di splicing. Recentemente sono state identificate molecole di RNA piccolissime con funzioni di regolazione dell'espressione del gene. Questi microRNA (**miRNA**), trascritti dalle RNA polimerasi II, sono presenti in tutti gli eucarioti. Numerosi geni che producono miRNA sono stati identificati analizzando il genoma delle cellule staminali di topo. Le tre polimerasi sono costituite da un core capace di polimerizzare e da fattori generali di trascrizione: i cosiddetti **GTF** (general transcription factors). Le differenze tra le tre polimerasi consistono nel tipo di

subunità che le compongono. I GTF della RNA polimerasi II sono almeno sette (**TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIF, TFIIH, TFIIF**). I promotori riconosciuti dalle RNA polimerasi hanno caratteristiche peculiari. L'RNA polimerasi I riconosce due sequenze che costituiscono l'**elemento promotore core** situato da -35 a +15 rispetto al punto di inizio della trascrizione, ed un **elemento promotore a monte**, che si trova da -150 a -50. Esiste una notevole variabilità delle sequenze che caratterizzano questi due promotori fra le varie specie. L'RNA polimerasi II riconosce il promotore caratterizzato da una sequenza particolare definita **TATA box** per la sua composizione di adenine e timine. Talvolta è necessaria anche un'altra sequenza, distante circa -80 nucleotidi dal sito di inizio, definita **CAAT box**. La complessità del funzionamento dell'RNA polimerasi II è poi evidenziata dal fatto che altre sequenze del DNA possono legare **attivatori (recruitment)** che, a loro volta, possono essere connesse con l'RNA polimerasi grazie a **coattivatori o corepressori**. Le sequenze di DNA che sono coinvolte nella modulazione della trascrizione vengono definite **enchaincerg** e legano proteine regolatrici che incrementano l'efficienza della trascrizione fino a 100 volte. Il momento chiave dell'attività dell'RNA polimerasi II è il riconoscimento della TATA box da parte della **TBP (TATA-binding protein)**, che è una componente di TFIID. TBP è associata a fattori altamente conservati, denominati **TAF (TBP associated factors)**. Il complesso TBP-TAF costituisce TFIID. In seguito al legame di TFIID si possono legare in sequenza TFIIA e TFIIB. Questo è un altro momento fondamentale perché TFIIB è in grado di legare un attivatore posizionato più a monte sul DNA, direttamente o indirettamente attraverso un coattivatore. Ciò genera la formazione di una curva (bending) sul DNA che è essenziale per la trascrizione. Si legano poi TFIIE/F, TFIIH e TFIIF ed il core dell'RNA polimerasi II per consentire lo srotolamento del DNA e l'inizio della sintesi dell'mRNA grazie all'idrolisi di una molecola di ATP. La presenza della TATA box non è una caratteristica di tutti i promotori per la RNA polimerasi II. Esistono numerosi promotori definiti **TATAless**, che vengono comunque riconosciuti da TFIID. I promotori per l'RNA polimerasi I e l'RNA polimerasi III non hanno né TATAbox né CAATbox. Addirittura i promotori per l'RNA polimerasi III sono intragenici. Si pensa che TBP possa riconoscere tutti i promotori, sia quelli per l'RNA polimerasi I sia quelli per l'RNA polimerasi II, compresi i TATAless, che quelli per l'RNA polimerasi III assumendo un ruolo universale nella trascrizione degli eucarioti. Nella RNA polimerasi II, ad esempio, TBP è stata ritrovata associata alla componente TFIIB che, assieme a TFIIA e TFIIC partecipa alla sintesi degli RNA 5S dei tRNA e degli sc e snRNA. Nei procarioti il catabolismo del lattosio viene ad esempio operato da tre proteine che derivano da un unico mRNA policistronico. Questa unità trascrizionale è parte del cosiddetto **operone del lattosio, o operone lac**. Gli eucarioti non presentano modelli simili a quello dell'operone. Quindi ogni gene eucariotico partecipa singolarmente a più attività, per alcune delle quali dovrà essere soggetto ad una certa efficienza di trascrizione, ma, per altre, ad una diversa efficienza. Il termine della trascrizione da parte dell'RNA polimerasi II avviene con un meccanismo che si scatena a valle del sito di poliadenilazione, il dominio carbossi-terminale dell'enzima CTD partecipa con i fattori di tagli alla liberazione dell'mRNA poliadenilato (forma matura) in seguito, la parte residuale del trascritto viene eliminata da Rat1. In alcuni casi si suppone che operi un meccanismo in cui è necessaria anche un'attività insita in una conformazione dell'RNA (ribozima).

Problema del rimodellamento della cromatina

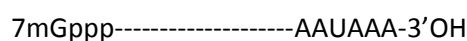
L'organizzazione della cromatina è cruciale nel permettere o meno che un determinato gene sintetizzi RNA. La manifestazione più eclatante, relativa al compattamento della cromatina è la quasi totale inattivazione di uno dei due cromosomi X nella femmina dei mammiferi. Fenomeno che riflette il fatto che mentre il sesso femminile possiede due cromosomi X, nel maschio ve ne è uno solo. Le cellule femminili in interfase possono essere distinte da quelle maschili per la presenza del **corpo di Barr**: una piccola massa fortemente eterocromatinica che negli anni sessanta fu messa in relazione con il cromosoma X inattivo. Il

riarrangiamento della cromatina durante la trascrizione è anche testimoniato dall'osservazione relativa all'aumento della sensibilità della digestione con DNasi. I siti che presentano maggiore sensibilità sono localizzati nelle regioni al 5' dei geni. Essi si estendono verso l'estremo 3', nel momento della trascrizione, e vengono denominati **siti ipersensibili alle nucleasi**. Il DNA è dunque maggiormente esposto all'attacco delle nucleasi e ciò può avvenire perché intervengono proteine specifiche che rimodellano la struttura del nucleosoma, senza però distruggerla, utilizzando ATP. Nel lievito ed in *Drosophila* sono stati individuati due complessi proteici, ATP-dipendenti, denominati rispettivamente **SWI/SWF** e **fattore GAGA**. Mentre SWI/SWF non sembra interagire con sequenze specifiche del DNA, ma coopera direttamente con proteine che modulano la trascrizione, il fattore GAGA riconosce sequenze ricche di GA/CT. Ancora la **fosforilazione**, la **metilazione** e l'**acetilazione**, l'**ubiquitinazione** la **sumoilazione** sembrano avere ruoli importanti agendo in modo da alterare le distribuzioni di cariche elettriche. Il **codice istonico** rappresenta quindi il risultato di tutte le combinazioni ottenute dall'aggiunta o dalla sottrazione dei gruppi sopracitati. Non è quindi detto che più metilazioni o ubiquitinazioni abbiano un risultato additivo in termini di attivazione della trascrizione. La neutralizzazione delle cariche positive dei residui di lisina da parte di gruppi acetilici, generalmente decresce l'affinità per il DNA da parte dell'ottamero, per cui i fattori di trascrizione possono meglio posizionarsi sul DNA. Quindi: **acetilazione** → FORMAZIONE DI EUCROMATINA; **deacetilazione** → FORMAZIONE DI ETEROCROMATINA. Quando gli istoni sono deacetilati, la trascrizione è repressa; quando gli istoni sono acetilati, si ha attiva trascrizione essendo la cromatina meno compatta. Come è noto un organismo diploide possiede due alleli (geni) di origine paterna e materna per ogni carattere. L'**imprinting** è quel fenomeno che determina quale dei due alleli debba sempre esprimersi in un clone cellulare, e dipende dall'eredità degli stati attivi o repressi della cromatina.

Maturazione dell'mRNA

Durante il trasferimento dal nucleo al citoplasma, l'mRNA subisce profonde trasformazioni che vengono denominate come *capping*, *metilazione*, *poliadenilazione*, *splicing ed editing*. Il risultato è che il **pre-mRNA** o **hnRNA (heterogeneous nuclear)** è profondamente diverso dal prodotto maturo, fino ad essere anche decine di volte più lungo. Il **capping** è l'aggiunta di guanosina monofosfato in 5' (GMP) al primo nucleotide che l'RNA, che è chiaramente un trifosfato in 5'. La funzione del cap (cappello o cappuccio) è quella di proteggere l'estremo 5' del messaggero dalle ribonucleasi e di posizionare i ribosomi in modo da leggere l'mRNA nella giusta cornice di lettura individuando il punto di inizio della traduzione. La **poliadenilazione** riguarda l'aggiunta al terminale 3' di numerosi ribonucleotidi contenenti adenina. Questa coda, che allunga l'mRNA nel nucleo dopo che è stato trascritto, viene detta **poliA**. Poche sono le eccezioni alla regola della poliadenilazione, e riguardano ad esempio l'mRNA degli istoni. Affinchè avvenga questo evento maturazionale, il messaggero deve possedere la caratteristica sequenza AAUAAA di circa 10-35 nucleotidi a monte dal sito di poliadenilazione. Altre sequenze fondamentali per l'aggiunta della coda sono YGUGUUY (dove Y è una pirimidina) circa 50 nucleotidi a valle di AAUAAA.

Il primo evento relativo alla realizzazione della poliadenilazione è la scissione endonucleotidica della porzione terminale 3' del trascritto che genera due frammenti di RNA. Il primo frammento è il più lungo e costituirà l'mRNA che deve ulteriormente maturare, e sarà così costituito:



Dove 7mG rappresenta il cap. il secondo frammento costituisce quanto il trascritto possedeva al terminale 3'OH, e può essere così rappresentato:



A questo punto entrano in attività altri fattori proteici noti come **cleavage and polyadenilation factors (CPF)** che consentono alla **poliA polimerasi (PAP)** di riconoscere la sequenza AAUUAAA. L'aggiunta della coda avviene in due tappe: nella prima, la PAP aggiunge solo una decina di AMP e nella seconda agisce un'altra proteina denominata **polyA-binding protein PABII** che riconosce la corta coda formata da PAP e procede alla fase di allungamento portando il poliA ad una lunghezza di circa 200 nucleotidi. Il ruolo della coda di poli A sarebbe quello di contribuire in modo determinante alla **stabilità dell'mRNA**. Infatti la deadenilazione, cioè la perdita progressiva della coda, regola l'attivazione degli enzimi deputati al "decapping" (togliere il cappello) dell'mRNA. Solo quando la coda di poliA si è ridotta a 10-15 nucleotidi inizia anche la degradazione dell'altro estremo della molecola del **messaggero**.

Lo **splicing** consiste nel rimuovere dall'interno del trascritto che sta maturando, sequenze che non hanno significato. Questi blocchi di pre-mRNA che vengono rimossi si chiamano **introni**. La perdita degli introni determina la necessità di ricucire i pezzi della molecola che andranno a costituire l'mRNA maturo. Tali parti di molecola costituiscono gli **esoni** e splicing è appunto il processo di giuntaggio. A seconda del gene possono essere presenti fino anche a sessanta introni che vengono identificati per la presenza all'estremo 5' della sequenza GU ed all'estremo 3' della sequenza AG. GU/AG si trovano quindi rispettivamente nei punti di giunzione esone-introne-esone e vengono riconosciute da un particolare complesso di snRNA e proteine (**snRNP** small nuclear ribonucleoprotein particle, pronunciato snurp). Questi complessi ribonucleoproteici, denominati spliceosomi, vengono identificati con la lettera U perché l'snRNA è ricco di uridina. Quindi, vengono individuati i punti di confine con gli esoni, mentre viene individuato, verso l'estremo 3' dell'introne, un nucleotide contenente A, che serve a legare il carbonio 2' del ribosio all'estremo 5' dell'introne una volta tagliato. L'eliminazione degli introni, prevede quindi la formazione di una struttura che assomiglia ad un cappio, e pertanto denominata **lariat**. Dopo la rimozione del lariat, altre proteine promuovono la saldatura degli esoni. Fra le proteine che compongono lo spliceosoma ve ne sono alcune denominate Sm che vengono assemblate nel citoplasma all'snRNA. Questo, per lo più sintetizzato dall'RNA polimerasi II, subisce nel nucleo un capping, come l'mRNA, e viene trasportato nel citoplasma ove, in seguito all'assemblaggio con le proteine Sm, viene iper-metilato (m^3Gcap). Quindi il complesso ribonucleoproteico, assemblato nel citoplasma, trasloca nel nucleo. Le proteine Sm, altamente basiche, formano un cerchio all'interno del quale può passare un RNA a singolo filamento che potrebbe essere stabilizzato dalle cariche positive delle proteine. L'apparato di splicing è localizzato in regioni del nucleo denominate speckle. Per quale motivo gli hnmRNA, cioè gli mRNA immaturi, non possono essere trasportati nel citoplasma? La risposta è affidata al ruolo di trasportatori proteici (proteine **Aly**, che si associano alle Tap dell'RNA) che sono in grado di trasportare esclusivamente gli mRNA maturi attraverso il complesso del poro nucleare. Gli spliceosomi non sono localizzati a caso nel nucleo ma si trovano in zone ben precise e costituiscono, assieme al nucleolo, una serie di compartimenti funzionali. Da momento che le snRNP devono la loro attività probabilmente soprattutto agli RNA che le compongono possono essere considerate ribozimi, seppure imperfetti. Invece ci sono esempi di splicing in cui lo stesso introne possiede la necessaria attività catalitica (**self, o autosplicing**). Se l'introne non prende la forma del cappio si ha l'**introne del gruppo I**; se prende la forma del cappio si ha l'**introne del gruppo II**. Questi introni sono autentici ribozimi. Il meccanismo ora descritto è definito **cis-splicing** perché riguarda ricuciture all'interno dello stesso filamento di mRNA. Si è visto che è possibile la giuntura di RNA trascritti da differenti regioni del DNA. questo fenomeno è detto **trans-splicing**. Altro meccanismo particolare è lo **splicing alternativo** che

permette la formazione di trascritti maturi diversi in seguito al fatto che alcuni introni vengono considerati esoni. Da un tratto di DNA origineranno, quindi, prodotti diversi. È il caso ad esempio, delle immunoglobuline M e D che vengono generate dallo stesso mRNA a seconda di quali tratti vengano rimossi. Come riconoscere, allora, alternativamente introni ed esoni? Sembra che fattori proteici denominati **fattori di splicing alternativo** collaborino con gli spliceosomi aiutandoli, di volta in volta a riconoscere i siti su cui operare i tagli. L'RNA polimerasi, può infatti iniziare a trascrivere a partire da un secondo segnale (**sito di inizio della trascrizione alternativa**). È il caso del gene GnRH che presenta due trascritti diversi a livello ipotalamico e a livello di altri tessuti come ad esempio la placenta. Altri geni possono avere anche **segnali di terminazioni della trascrizione alternativi**. Ultimo meccanismo di maturazione scoperto di recente è il cosiddetto **editing** cioè il cambiamento a livello post-trascrizionale delle sequenze dell'mRNA. Così nei mitocondri e nei cloroplasti delle piante superiori si ha la delezione ed addizione di residui di uridina o il cambiamento di molte uridine in citidine. Anche l'mRNA nucleare è in alcuni casi soggetto ad editing. Nei mammiferi, ad esempio, il gene per l'apolipoproteina-B produce un mRNA che, dopo la trascrizione presenta la conversione di una C in U. ciò genera una proteina un po' diversa nell'intestino rispetto al fegato. Il meccanismo di editing prevede la formazione di **duplex gRNA-mRNA**, di cui uno funge da filamento guida (gRNA) ed indica, attraverso alcuni appaiamenti sbagliati, quali sono i nucleotidi da sostituire sull'mRNA. I gRNA sono di provenienza intronica. Non sempre quindi, gli introni rimossi vengono degradati.

Maturazione di rRNA e tRNA

Gli rRNA maturi che costituiscono i ribosomi sono il **28S, il 18S il 5.8S e il 5S**. I primi tre provengono da un unico grande **precursore di 45-41S** la cui sintesi e maturazione avvengono nella **zona fibrillare del nucleolo**. I geni per il grande pre-rRNA sono ripetuti centinaia di volte, sono organizzati in gruppi, cluster, e determinano la **regione organizzatrice del nucleolo (NOR)**. Questa si trova su una coppia di cromosomi omologhi ove si determina una costrizione secondaria allorché il cromosoma prende forma. In poche specie, i NOR sono più distribuiti nel genoma. Nell'uomo, in particolare, sono cinque le coppie di cromosomi che contengono i cluster di geni deputati alla sintesi del grande pre-rRNA. I vari cluster inoltre possono formare un numero variabile di nucleoli. Un singolo gene all'interno di un cluster è separato da uno **spaziatore intergenico (spacer)**, che non dà origine ad alcun trascritto. La struttura del singolo gene vede nel suo interno le sequenze che daranno origine all'rRNA 18S, 5.8S e 28S. queste sequenze sono separate da spaziatori intragenici che saranno letti dall'RNA polimerasi I. Così, per avere gli rRNA maturi è necessario eliminare i tratti di RNA corrispondenti agli spaziatori intragenici. In alcune specie poi è anche necessario eliminare una sequenza intronica che si trova nel tratto di RNA corrispondente al 28S che, quindi, dovrà essere sottoposto ad un processo di giuntura, quindi, di vero e proprio splicing. L'rRNA 18S viene formato quasi subito dal precursore che, oltre al frammento 18S, genererà un frammento residuo di circa 32S. da questo, con un tagli successivo, si formeranno il 5.8S ed il 28S. Lo splicing che avviene nella maturazione del 28S non prevede l'attività di snRNP ma è proprio la sequenza intronica di per sé a dettare la sua eliminazione e la giunta degli esoni. È, questo un esempio di self-splicing. Modificazioni, poi, occorrono a livello dei singoli nucleotidi del 45-41S immediatamente dopo la trascrizione. Queste consistono nella **metilazione**, probabilmente con funzioni protettive, del carbonio 2' del ribosio (**2'-O-metilazione**) e nella sostituzione di numerosi residui di uridina con la pseudo uridina. Un'osservazione interessante riguarda la totale assenza di **sequenze consensus** (che generalmente hanno un universale ruolo di segnale) o di strutture secondarie che potrebbero costituire i segnali che indicano i siti da metilare. Il meccanismo della metilazione del pre-rRNA nucleolare coinvolge l'attività dei piccoli **RNA nucleolari (snoRNA)** che, sorprendentemente sono spesso introni prodotti da parte di pre-mRNA destinati alla sintesi

di proteine. Assieme ad uno “scaffold” proteico formato principalmente dalla coilina, gli snoRNA vanno a costituire nel nucleolo gli “small Cajal bodies” (scaRNA). Addirittura è stato isolato nell’uomo un gene che produce un RNA con tutte le caratteristiche di un mRNA. Peculiarità del gene è che, dopom la trascrizione, gli introni prodotti dallo splicing formeranno ben otto snoRNA, mentre gli esoni saranno degradati. Dunque, il ruolo di questo RNA non sarebbe quello di produrre proteine, ma di ospitare nel suo RNA le particelle U. il nome attribuito al gene è stato quindi UHG cioè “U Host Gene”. Questa scoperta ha fatto anche concludere che il nome di introni ed esoni non deve necessariamente riferirsi a ciò che viene degradato ed utilizzato ma alle sequenze che vengano fisicamente separate durante lo splicing. Gli snoRNA si legano specificamente ad una proteina che si trova nel nucleolo, denominata fibrillarina. La maturazione dell’rRNA 5S anch’esso sintetizzato da cluster di geni ripetuti che non formano nucleolo, prevede la semplice rimozione di sequenze all’estremità 3’ della molecola. I geni per i tRNA sono organizzati in gruppi e in ogni cluster, ciascun gene è separato dai geni vicini da spaziatori intergenici che non danno vita a trascritti, come accade per gli rRNA. Il pre-tRNA deve perdere sequenze sia al terminale 5’ che al terminale 3’ e in alcune specie, è necessario anche lo splicing per rimuovere un introne. La rimozione di questo introne è totalmente dipendente da enzimi proteici, contrariamente agli altri processi di splicing precedentemente descritti. Altri eventi maturativi riguardano modificazioni da **tRNA nucleotidil trasferasi**.

Struttura e concetto di gene

Risulta ora chiaro che il tratto di DNA che da origine ad un trascritto e che abbiamo precedentemente definito gene, è qualcosa di molto complesso. Una descrizione molto semplificata, che fa riferimento al tratto deputato alla sintesi dell’mRNA, vede la presenza di sequenze regolative ed un promotore a valle del quale inizierà la trascrizione. Il primo tratto di DNA formerà una porzione di RNA che non sarà tradotta, sarà soggetta al capping e viene deginita 5’UTR (untranslated region). Segue la regione codificante, contenente introni ed esoni, a valle della quale vi è la regione corrispondente alla 3’UTR ed ai segnali per la poliadenilazione sull’RNA. Negli eucarioti abbiamo visto che la trascrizione dell’mRNA è regolata da tratti che si trovano parecchie basi a monte dal sito di inizio. Esistono, inoltre, più promotori, da cui dipendono siti alternativi di inizio della trascrizione e siti alternativi di terminazione. A cavallo degli anni 50 il concetto di gene veniva espresso con la frase **“un gene, una proteina o una catena polipeptidica”**. Tale concetto non poteva essere verificato, dal momento che ad esempio, gli rRNA e i tRNA derivano da tratti di DNA a cui non corrispondono proteine. Allora viene spesso presa in considerazione la possibilità di omologare un gene ad un unità trascrizionale. Allo stato attuale possiamo dire che una definizione di gene è impossibile, essendo impossibile abbracciare tutti i modi di essere del gene con una semplice frase che sia sufficientemente esauriente.

RNA world

Come può un sistema informazionale, che per duplicarsi e funzionare ha bisogno delle proteine, essere nato, e allo stesso tempo come possano essersi formate le proteine, se queste necessitano a monte del sistema informazionale? Crick scriveva “probabilmente il primo enzima era un RNA con proprietà di replicarsi”. Negli anni ottanta furono scoperti **RNA con attività catalitiche (ribozimi)**. Questa scoperta dava fondamento a quanto profetizzato da Crick, dal momento che l’attività catalitica dell’RNA rendeva questa molecola “autonoma”, cioè in grado di funzionare sia da molecola informazionale che da catalizzatore. Un **“mondo primitivo a RNA”** quindi non aveva bisogno di DNA ne di proteine. I desossiribonucleotidi, poi, si sarebbero originati da ribonucleotidi ed il DNA si sarebbe formato per un’attività di trascrittasi inversa. La **formazione delle molecole di DNA, più stabili e quindi con possibilità di essere più lunghe, avrebbero determinato la sostituzione dell’RNA come molecola informazionale.**

LA STRUTTURA DEL CODICE GENETICO E LA TRADUZIONE

Introduzione

Il concetto definito dal **dogma centrale della biologia** prevede che il **DNA**, che ha la proprietà di duplicarsi, venga copiato come RNA (**trascrizione**) e che tale molecola intermedia (in particolare **l'mRNA**) venga letta per sintetizzare proteine (traduzione). Questo meccanismo che viene **sinteticamente** indicato con la simbologia:



Implicitamente richiede uno stratagemma attraverso il quale un alfabeto formato solo da quattro lettere sia trasformato in un vocabolario di venti parole, ventidue con selenocisteina e pirrolisina, che variamente combinate formano una proteina. Agli inizi degli anni 60 una serie di studi favorirono il formularsi del **principio di colinearità**, che indicava una certa corrispondenza fra una sequenza **nucleotidica** ed una sequenza **amminoacidica**: infatti, al variare di un nucleotide nel DNA poteva variare un amminoacido nella “corrispondente” sequenza all’interno della proteina. Tale principio iniziava il lungo iter relativo alla definizione del **concetto di gene** ma non chiariva l’enigma sul come una sequenza di soli quattro nucleotidi potesse corrispondere ad un assortimento di venti-ventidue amminoacidi. Un semplice ragionamento matematico porta a concepire come unità elementare codificante un determinato assortimento di nucleotidi. Ad un singolo nucleotide infatti non può corrispondere un amminoacido. Cosa significa combinare un certo numero di elementi su due posti? Significa che i quattro nucleotidi A G U C possono dare le seguenti combinazioni: AA AG AU AC GG GA GU GC.... Fino a 16 combinazioni diverse. Essendo gli amminoacidi 22, il codice genetico, cioè le combinazioni di nucleotidi dell’mRNA cui corrispondono gli amminoacidi, non può essere basato su questo minimo calcolo combinatorio. Bisogna quindi considerare una complessità di ordine superiore e focalizzarsi sulla possibilità di combinare i quattro nucleotidi su tre posti, cioè a tre a tre. In questo caso avremo che le combinazioni potranno codificare 64 amminoacidi: un numero troppo grande. Allora il calcolo combinatorio ci dice che l’unità elementare codificante dovrebbe essere composta da tre nucleotidi (**triplette** o **codoni**) ma questa unità genera parole ridondanti: ciò potrebbe significare che 42 codoni non hanno significato o invece, che esistono molti codoni sinonimi (**degenerazione del codice genetico**). Quanto ora illustreremo parte dalla definizione dell’unità minima codificante (codone o tripletta) grazie all’esperimento di Brenner e Crick e giunge fino alla decifrazione del codice e alla sua lettura. Definiremo meglio il **codice genetico come insieme dei codoni a cui corrispondono i vari amminoacidi più i codoni di termine (non senso)** e impareremo che le sue proprietà fondamentali sono:

- 1) **Continuo e senza virgole** : i codoni sono letti in successione e senza alcuna interruzione per dare la sequenza amminoacidica di una proteina o di un polipeptide
- 2) **Degenere** : molti codoni sono sinonimi

Proprietà del codice genetico

Escludendo, che il codice sia embriatico o sovrapposto, resterà da chiarire se questo sia continuo senza virgole se sia degenere. Cosa significa embriatico o sovrapposto? La modalità di lettura delle unità elementari codificanti può avvenire in due modi: per contiguità o per sovrapposizione. Ammesso che l'unità elementare codificante sia una tripletta

ABC

ABC

Dove ogni tripletta sia definita dalle lettere ABC. Oppure potremmo avere la seguente modalità di lettura

AB

C

AB

Dove C appartiene sia alla tripletta ABC sia alla successiva tripletta che diventerà CAB. La lettera C dunque è comune fra la prima e la seconda tripletta. Nel secondo caso si parlerà di codice embriatico o sovrapposto, mentre nel primo caso parleremo di codice discontinuo. È evidente che il principio di colinearità esclude che la modalità di lettura delle unità elementari codificanti possa essere per sovrapposizione: in questo caso il variare di un nucleotide potrebbe portare al variare di due amminoacidi. Se cambia C, supponiamo con D, cambieranno entrambe le triplette, diventando ABD e DAB. Con il codice continuo invece la sostituzione di C con D nella prima tripletta non inciderà nella composizione della tripletta successiva. Esistono tuttavia delle eccezioni a questa regola. Queste riguardano DNA molto piccoli che devono sfruttare tutte le basi che li compongono. Così ad esempio, la lettura delle sequenze di mRNA derivate dal batteriofago ϕ X174 avviene per sovrapposizione. Una volta definito che il codice viene letto in modo continuo, resta da definire se esistono o meno interruzioni che sono state definite virgole. Una sequenza di basi infatti, potrebbe dare una sequenza di amminoacidi attraverso una lettura che preveda tratti che vengono tradotti e tratti privi di significato, appunto le virgole. Ad esempio il tratto

ABCABCABCABCABCABCCCCCCCCCCCCDABCABCABCABC

Potrebbe possedere le sequenze indicate dalla lettera D che non hanno significato. Oppure essere organizzato privo di sequenze inutili. Inoltre, ancora, non abbiamo chiarito definitivamente se l'unità elementare codificante sia una tripletta e se il codice sia degenere. L'esperimento di Brenner e Crick, che tolse ogni dubbio, consisteva nella manipolazione del gene rII che si trova nel fago T4 che infetta Escherichia coli. Il gene rII se funziona correttamente è in grado di provocare la lisi dei batteri infettati, cosa facilmente riscontrabile nella costura batterica per la presenza di "placche" di lisi: veri e propri fori che si vedono a occhio nudo nello strato uniforme della coltura. Utilizzando una sostanza, la **proflavina**, Brenner e Crick furono in grado di ottenere batteriofagi mutati in rII, che erano portatori di **inserzioni** (+) o **delezioni** (-). Il numero di inserzioni o delezioni indotte fu determinante per l'interpretazione

dell'esperimento. Con una sola + o due + (o -) le placche di lisi non si formavano. Viceversa, con tre o multipli di tre inserzioni o delezioni si ripristinava la lisi dei batteri infettati. Le inserzioni sono **mutazioni** che provocano l'inserimento di un nucleotide in una data sequenza. La proflavina viene definita "agente intercalante" perché si inserisce nella sequenza nucleotidica come fosse un nucleotide aggiunto. In condizioni diverse da quelle che generano l'inserzione, la proflavina genera delezioni: cioè la perdita di nucleotidi in una data sequenza. Se la sequenza viene letta linearmente, l'inserzione o la delezione provoca uno slittamento della cornice di lettura della basi, e la mutazione viene definita "**frameshift**" ovvero slittamento della cornice di lettura. Ovviamente ogni variazione + viene annullata da una variazione -.

Esempio

Mio mio mio mio mio mio mio mio mio mio mio mio mio mio mio

Delezione

Mio mio m iom iom iom iom iom iom iom iom iom iom iom io

Seconda delezione

Mio mio m iom iom iom i omi omi omi omi omi omi omi omi o

Terza delezione

Mio mio m iom iom iom i omi omi omio mio mio mio mio mio

Applicando tale ragionamento all'esperimento di brenner e Crick abbiamo che le placche di lisi appaiono generalmente di nuovo dopo che è effettuata la terza delezione in rII perché a valle di questa si ripristina la cornice di lettura originaria. Quindi il DNA viene copiato un mRNA nuovamente in grado di produrre una proteina funzionante nonostante un tratto di questi resti cambiato. Il ripristino della lisi dovuto ad uno slittamento della cornice di lettura di tre (o multipli di tre) nucleotidi indica inequivocabilmente che l'unità elementare codificante è una tripletta. Quindi il **codice è senza virgole ed è degenero**. Dal momento che le triplette non senso sono segnali di stop per la traduzione (vengono definite anche **codoni di stop**) allora se fossero presenti nel tratto mutato non si potrebbe mai ripristinare la lisi. La sintesi della proteina infatti si interromperebbe all'interno del tratto mutato e non potrebbe riprendere a valle della terza delezione.

La decifrazione del codice e la direzione di lettura

Recentemente ai classici 20 amminoacidi si sono aggiunti la selenocisteina e la pirrolisina che hanno come codoni specifici UGA e UAG. Tali codoni erano stati identificati come segnali di stop: quindi come triplette a cui non corrisponde alcun amminoacido. Più avanti sarà spiegato come codoni di stop possono anche codificare per selenocisteina e pirrolisina. I primi esperimenti di decifrazione del codice utilizzavano sistemi cell-free caratterizzati dalla presenza della macchina biosintetica di Escherichia coli, di amminoacidi marcati radio attivamente e di omopolimeri composti da uno solo dei quattro ribonucleotidi dell'mRNA. Fu così possibile vedere che il poliU è responsabile della sintesi della polifenilalanina, il poliA dirige la sintesi della polilisina e il poliC presiede alla sintesi della poliprolina. Per il poliG vi furono notevoli difficoltà e non fu possibile ottenere alcun risultato. L'attribuzione dei significati alle triplette UUU AAA e CCC fu dunque il primo risultato. Il passo successivo fu la sintesi di copolimeri

casuali. Le molecole di poliAC possono formare otto diversi codoni (CCC, CCA, CAC, ACC, CAA, ACA, AAC, AAA). Nel '64 il saggio di legame ai ribosomi utilizzava le singole triplette appositamente sintetizzate che quindi legavano l'apparato biosintetico solo se si verificava il riconoscimento fra la tripletta e lo specifico amminoacil-tRNA. In questo caso, il complesso non passava attraverso un filtro poroso che risultava marcato; il calibro del poro era tale da non far passare il grosso complesso costituito dall'apparato biosintetico. Viceversa, in mancanza di riconoscimento il filtro non era in grado di fare da barriera. La decifrazione del codice, così come descritta, definitivamente chiarì le sinonimie e la presenza di triplette non senso che servono quasi sempre come segnali di stop. Inoltre si vide che il codice era universale, cioè in tutti gli organismi, procariotici o eucariotici, il codice è esattamente identico con le eccezioni di alcuni codoni mitocondriali. L'mRNA formato dalle varie triplette viene letto in direzione 5' → 3' mentre la direzione della sintesi proteica va dall'estremo NH₂ all'estremo COOH. La direzione di crescita della catena polipeptidica fu chiarita da Dintzis nel 1962.

L'apparato di traduzione: i ribosomi ed i tRNA

I **ribosomi** hanno un diametro di circa 15-30 nm e sono costituiti da due subunità che hanno una forma simile nei batteri ed eucarioti, salvo qualche differenza, ed esse sono formate da proteine ed rRNA. Le proteine vengono indicate con le lettere S e L (small e large) a seconda se appartengono alla subunità maggiore o minore. Nella subunità minore dei ribosomi batterici (30S) troviamo l'rRNA 16S, mentre nella maggiore (50S) sono presenti gli rRNA 23S e 5S. analogamente l'rRNA 18S è presente nella subunità minore (40S) dei ribosomi eucariotici, mentre gli RNA 28S, 5,8S e 5S sono presenti nella subunità maggiore (60S). circa la biogenesi dei ribosomi il precursore degli rRNA nei batteri è trascritto da una porzione del genoma che contiene anche tRNA. Negli eucarioti il precursore è sintetizzato a partire dall'organizzatore del nucleolo (NOR) e matura nella regione fibrillare del nucleolo. Nella regione granulare, si ha l'assemblaggio con proteine provenienti da citoplasma e con l'rRNA 5S che non viene trascritto nel NOR. Sia nei procarioti che negli eucarioti, gli ioni bivalenti hanno grande importanza nell'unione fra le due subunità, stabilizzando lo stato assemblato che nei batteri sarà 70S e negli eucarioti 80S. È da notare che le unità Svedberg non possono sommarsi. Il complesso formato dalle proteine e dagli rRNA ha un ruolo fondamentale in alcune reazioni che avvengono durante la sintesi proteica. In particolare, l'attività catalitica sembra risiedere in alcuni rRNA che sarebbero quindi dei veri e propri ribozimi. I tRNA vengono raffigurati con una forma a **trifoglio**. L'analisi fatta usando la diffrazione a raggi X rivela l'esistenza di una **struttura tridimensionale a L rovesciata**. Partendo dall'estremità 3' e proseguendo lungo la struttura a trifoglio verso l'estremo 5' si trova immediatamente la sequenza 5'-CCA-3'-OH. Tale sito viene definito accettore perché lega l'amminoacido all'estremo COOH dopo che questo è stato attivato. L'enzima che lega l'amminoacido al sito accettore si chiama **amminoacil-tRNA-sintetasi** e lega specificatamente un amminoacido al suo tRNA riconoscendolo in siti specifici. Il primo braccio che si incontra definisce l'**ansa TψC (ψ= pseudouracile)** e, immediatamente dopo si incontra il **braccio variabile**. L'ansa TψC si ritiene che interagisca con l'rRNA 5S della subunità maggiore del ribosoma per ancorare meglio il tRNA alla struttura. Il braccio variabile può contenere fino ad una ventina di ribonucleotidi e serve a mantenere costanti le dimensioni fra i vari tRNA. Infatti quanto maggiore è la lunghezza dei tRNA più ampia sarà l'ansa variabile in modo da mantenere, fra tutti i tRNA, uguale il parametro di altezza compreso fra il 3' e l'**ansa dell'anticodone** che viene immediatamente dopo. Questa possiede tre nucleotidi, che definiscono l'**anticodone**, che si appaiano, per disposizione antiparallela, ai tre nucleotidi del codone. Il quarto ed ultimo braccio termina con G che contiene il **diidrouracile**. La degenerazione del codice è sulla terza base (al 3') dell'mRNA. Appaiando tRNA ed mRNA si può notare che la prima base dell'anti

codone (al 5'P sul tRNA) può essere definita “**vacillante (wobble)**” in accordo con l'ipotesi di Crick fatta nel '66. Egli ipotizzava che la degenerazione del codice fosse dovuta in parte alla base vacillante in quanto essendo situata all'interno di un'ansa poteva non allinearsi con la base del 3' corrispondente del codone per formare legami idrogeno richiesti. Quindi la terza base del codone non era discriminante. È poi interessante notare che il massimo numero di sinonimi si ha per ogni accoppiamento che si verifichi per codoni che ai primi due posti presentano G e o C. il massimo numero possibile di legami idrogeno infatti (C≡C) dà grande stabilità a questa interazione codone-anticodone che renderebbe problematico discriminare i tRNA, al variare della terza base, se le prime due basi sono C e/o G: quindi codone e anticodone si attraggono a vicenda con una forza tale che l'identità della terza base non risulta importante. La presenza di basi rare al 5' dell'anticodone rende il riconoscimento fra basi meno specifico. L'ipoxantina infatti riconosce parimenti U C ed A sul codone. Ultima caratteristica del tRNA e dell'rRNA è il fatto che essi determinano l'attività catalitica del centro peptidil-transferasico deputato alla formazione del legame peptidico. Ciò avviene per l'interazione fra il braccio accettore (5'-CCA-3') del tRNA e l'rRNA 23S della subunità maggiore del ribosoma.

La traduzione

Distinguiamo innanzitutto una fase **ATP-dipendente** ed una **GTP-dipendente**. Nell'ambito della fase GTP-dipendente poi distinguiamo tre momenti: **l'inizio**, **l'allungamento** ed il **termine**.

Fase ATP-dipendente Perché gli amminoacidi siano portati sui codoni specifici è necessario che siano legati al proprio tRNA. La formazione del complesso **amminoacil-tRNA sintetasi**. Generalmente vi è una sola amminoacil-tRNA sintetasi per ogni amminoacido. Il riconoscimento fra l'amminoacido ed il suo tRNA avviene perché l'enzima riconosce vari segnali (sequenze specifiche) interspersi nei tRNA. La reazione prevede due tappe: la prima è la formazione dell'anidride mista fra il COOH dell'amminoacido ed il residuo fosforico dell'AMP, che deriva dall'ATP per liberazione del pirofosfato; la seconda tappa è la reazione del complesso amminoacil-tRNA con conseguente perdita dell'AMP, ed idrolisi del pirofosfato formatosi in precedenza. Ciò rende il legame estere fra l'amminoacido ed il tRNA altamente stabile e, quindi, altamente energetico.

Fase GTP-dipendente *Inizio*: il problema connesso con l'inizio della sintesi proteica è quello di individuare nell'ambiente citoplasmatico da parte dei ribosomi e tRNA, non solo l'mRNA ma anche la giusta **cornice di lettura**. È infatti necessario individuare sull'mRNA il giusto segnale di inizio della traduzione costituito dalla tripletta AUG (talvolta GUG), che è distante una trentina di basi a partire dall'estremo 5'P. È stato evidenziato da Shine e Dalgarno che al 5' dell'mRNA, prima della corretta tripletta d'inizio, c'è un segnale costituito da basi complementari ad una sequenza posta sull'rRNA 16S. tale segnale consente alla subunità minore del ribosoma, grazie ai fattori **IF1** e **IF3 (initiation factor)** di adattarsi per prima sull'mRNA posizionandosi in modo da individuare l'AUG di inizio e di conseguenza la giusta cornice di lettura. In un secondo momento, **IF2**, grazie all'idrolisi di GTP, porta il primo amminoacido specificato alla tripletta AUG iniziatrice. Tale amminoacido è la **formil-metionina (fMet)** Altra importante attività della sequenza di Shine Dalgarno è quella di evitare errori all'inizio della traduzione, probabilmente interagendo col sito E del ribosoma (vedi più avanti). Nella fase di allungamento, come vedremo, AUG, codificherà per la **metionina (Met)**. La perdita di IF3 dalla subunità 30S favorisce l'assemblaggio con la subunità maggiore di 50S ed il complesso si stabilizza ulteriormente per la dissociazione di IF1 da 30S a questo punto, dopo l'allontanamento di IF2 si ha il ribosoma completo in cui si individuano un sito **P (peptidilico)**, occupato dal tRNA^{fMet}, e un sito **A**

(**amminoacilico**) vuoto, posizionato sulla tripletta successiva. A questi due siti bisogna aggiungere nel ribosoma completo, anche la formazione del sito **E (exit)**.

Allungamento: l'arrivo dell'amminoacido richiesto dalla tripletta successiva nel sito A costituisce l'allungamento che è mediato da fattori specifici **EF Ts-Tu ed EFG (EF= elongation factors)**. In particolare Tu si dissocia da Ts e, utilizzando GTP, porta l'amminoacil-tRNA sul messaggero. Dopo aver liberato l'amminoacido, Tu si ricongiunge a Ts. Il ciclo riprenderà per la tripletta successiva. EF-Tu, dunque, porta il tRNA carico nel sito A, ed il tRNA interagisce con il ribosoma grazie all'appaiamento dell'ansa T ψ S con il tratto complementare dell'rRNA 5S. ciò rende più stabile l'eventuale legame codone-anticodone. La posizione dei tRNA sul ribosoma dovrà essere tale che il centro peptidil-transferasico della subunità maggiore possa favorire la formazione del legame peptidico fra il COOH dell'amminoacido legato al tRNA che occupa il sito P e l'NH₂ dell'amminoacido posto sul tRNA giunto nel sito A. tale reazione utilizza l'energia che era stata impiegata per legare l'amminoacido al suo tRNA durante la fase ATP-dipendente. Risulta così chiaro come l'allungamento nella catena polipeptidica avvenga nella **direzione NH₂ → COOH** e che l'mRNA venga letto dal 5' al 3', a questo punto, il fattore di allungamento EFG promuove lo slittamento del ribosoma, con ulteriore consumo di GTP, sulla tripletta successiva. Il sito A sarà nuovamente vuoto, il sito P avrà il tRNA a cui è legato il peptide nascente ed il sito E sarà caratterizzato dal tRNA scarico che uscirà dal sistema. Nel sito A vuoto, EF-Tu porterà un nuovo complesso amminoacil-tRNA che sarà riconosciuto dalla nuova interazione codone-anticodone. Un problema che nasce durante l'allungamento è come la tripletta AUG sia riconosciuta dal tRNA per la metionina e non più da tRNA per la formilmetionina. Il tRNA^{fMet} ha proprietà diverse dal tRNA^{Met} al 5', la base C non forma legami idrogeno con la base opposta A, inoltre, il tRNA^{Met} viene trasportato da IF2 per adattarsi al sito P invece che al sito A all'inizio della traduzione. Viceversa il tRNA^{Met} si adatta al sito A grazie a EF-Tu.

Termine della traduzione: la presenza di più codoni non senso, infine, stimola la comparsa dei fattori di rilascio **RF1, RF2 e RF3** che, in combinazione con **EFG**, promuovono la liberazione della catena polipeptidica dopo la rottura del legame col tRNA ad opera del centro peptidil-transferasico. Il fattore **RRF** (ribosome re leasing factor) dissocerà la subunità minore dalla maggiore. I ribosomi scorrono numerosi, l'uno dietro l'altro, sull'mRNA formando i **polisomi** o **poliribosomi**, al fine di sfruttare numerose volte la stessa molecola di mRNA che, generalmente, ha una vita media piuttosto breve. La breve vita degli mRNA garantisce che gli errori di trascrizione siano transitori e pertanto scarsamente dannosi.

Traduzione negli eucarioti

Numerose sono le differenze fra batteri ed eucarioti. Circa la fase di inizio, questa è regolata da numerosi fattori che presiedono al riconoscimento dell'mRNA da parte della subunità minore del ribosoma al trasporto del tRNA iniziatore e all'assemblaggio del ribosoma completo. L'amminoacido iniziatore è la metionina; ma anche per gli eucarioti esistono due tRNA, uno iniziatore e l'altro utilizzato per l'allungamento, ed entrambi legano la metionina. Si ricordi che l'mRNA inizia con il cap. dopo aver riconosciuto il cap (manca il meccanismo relativo alla presenza di Shine e Dalgarno), la subunità minore ribosoma comincia a scorrere lungo l'mRNA (scanning mechanism) fino a raggiungere il codone di inizio AUG. Di solito viene sempre impiegato il primo AUG che si presenta a partire dal CAP (**first AUG rule** regola del primo AUG). Qui si assemblano gli altri componenti per l'inizio della traduzione. Il tratto di

nucleotidi dal cap al primo AUG viene definito **leader**. La regione non tradotta al 5' dell'mRNA costituisce il tratto **5'UTR** (untranslated region) che è, appunto, la sequenza leader. Analogamente alla regione 5'UTR, negli mRNA si individua anche una regione **3'UTR**. Mancando la sequenza di Shine e Dalgarno, il codone di inizio degli mRNA eucariotici si trova spesso all'interno di una sequenza caratteristica, denominata **sequenza di Kozak: GCCGCCA/GCCAUGG**. Essa individua quindi la tripletta di inizio. Le caratteristiche più conservate di questa sequenza sono: la presenza di una G in posizione +4 (essendo +1 la A di AUG), e la presenza di A o G in posizione -3. Generalmente, più la sequenza che precede AUG è simile alla sequenza di Kozak, maggiore è l'efficienza della traduzione. Talvolta, codoni AUG successivi al primo possono trovarsi in buona posizione per essere considerati come segnali di inizio alternativi. Quindi, a seconda dei siti impiegati per l'inizio della traduzione, mRNA che possiedono la stessa sequenza potrebbero dare origine a catene polipeptidiche con differenti estremità amminiche. Bisogna rilevare che il cap può essere importante nell'evitare errori all'inizio della traduzione analogamente all'attività della sequenza di Shine e Dalgarno nei batteri e che in mitosi, dopo la metafase, alcuni mRNA sono tradotti in "a CAP independent manner" in questo caso esistono sequenze denominate IRES (internal ribosomes entry sites) che sono riconosciute dal ribosoma. Infine, gli mRNA eucariotici vengono definiti **monocistronici**, essendo il **cistrone** corrispondente ad un solo messaggio. Ciò li differenzia dagli mRNA batterici che sono invece **policistronici**, possedendo nella loro sequenza istruzioni valide alla produzione di più di una proteina. È estremamente importante conoscere le differenze fra i meccanismi della traduzione fra batteri ed eucarioti: è su queste differenze che si basa la "tossicità selettiva" degli **antibiotici** usati nella pratica clinica. È infatti fondamentale produrre farmaci che siano nocivi per i patogeni e non per gli individui che li ospitano. Così, sfruttando le differenze fra ribosomi batterici ed eucariotici, la *streptomicina* e la *neomicina*, ad esempio, possono agire selettivamente sulla cellula batterica.

VENTESIMA LEZIONE: MITOSI

Grazie alla mitosi la cellula si divide dando origine a due nuove cellule. Questo processo di divisione cellulare che si verifica nelle cellule somatiche, e in quelle indifferenziate della linea germinale, assicura alle cellule figlie un'assegnazione omogenea delle componenti cellulari, incluso il DNA che è organizzato nei cromosomi. Il significato fondamentale della mitosi consiste nel garantire la equa e corretta ripartizione dei cromosomi dalla cellula madre alle cellule figlie. La cellula madre si divide e ripartisce lo stesso contenuto genetico, lo stesso numero di cromosomi; ovviamente ciò è possibile perché la cellula che inizia la mitosi proviene da un periodo di interfase in cui il patrimonio genetico è stato duplicato (fase S del ciclo cellulare): infatti ciascun cromosoma all'inizio della divisione mitotica è costituito da due cromatidi identici perché frutto della replicazione semiconservativa del DNA durante la fase S di interfase. La mitosi è uno degli eventi più spettacolari del ciclo e si completa in un periodo relativamente breve con un procedere fluido senza interruzioni. Viene correntemente suddivisa in fasi: *-profase-prometafase-metafase-anafase-teofase-* che rappresentano i differenti episodi funzionali, ognuno dei quali comporta cambiamenti osservabili nell'organizzazione cellulare. Risulta quindi opportuno, in questo contesto, seguire quali comportamenti cellulari si verificano per ciascuno di tali episodi.

Profase

La profase ha inizio con il compattamento dei cromosomi ed è innescata da Cdk attraverso la fosforilazione delle **condensine**. Il compattamento dei cromosomi è fondamentale per facilitare e garantire la corretta distribuzione, meglio indicata come segregazione, degli stessi alle due cellule figlie. La segregazione non è altro che il *trasporto* dei cromosomi o meglio, dei cromatidi fratelli ai due poli opposti di una cellula. In una cellula alla mitosi, la quantità di materiale genetico è raddoppiata, poiché tutto il DNA è stato duplicato e ciascun cromosoma è costituito da due “cromosomi” identici, definiti **cromatidi fratelli**. Questi cromatidi rimangono uniti per la presenza di proteine “collanti” chiamate **coesine**. Le coesine saranno presenti solo a livello dei centromeri, attraverso i quali i cromatidi continueranno ad essere uniti nel passaggio tra la metafase e l'anafase la coesina sarà eliminata anche dai centromeri e si assisterà alla separazione ed al successivo trasporto dei cromatidi ai due poli della cellula. Durante la profase incomincia ad organizzarsi anche il **fuso mitotico**, una struttura formata principalmente da microtubuli, che ha lo scopo di fornire un'impalcatura ed una guida idonea al trasporto dei cromosomi ai due poli della cellula e permettere la separazione del citoplasma in due zone. Negli eucarioti esistono due tipi di mitosi: la mitosi aperta, caratterizzata dalla dissoluzione dell'involucro nucleare, e la mitosi chiusa (endomitosi), in cui l'involucro nucleare resta intatto. Ciò nonostante i principali eventi che saranno illustrati si presentano più o meno conservati nei due tipi di mitosi. La riorganizzazione del citoscheletro formato dai microtubuli è un evento fondamentale all'inizio del processo mitotico. Durante la fase S il **centrosoma** o **MTOC** era stato duplicato a formare due centrosomi. Con la profase i due centrosomi si separano per prepararsi ad organizzare i due poli del fuso mitotico. Questo movimento utilizza meccano enzimi, ATP ed i microtubuli stessi, analogamente a quasi tutti i movimenti intracellulari. Contemporaneamente la complessa struttura dei microtubuli della cellula in interfase collapsa a seguito di un cambiamento nella stabilità degli stessi microtubuli che trae origine da molte modificazioni, quali fosforilazioni innescate dall'attivazione di Cdk1, sia a carico della tubulina, che di alcune MAP. L'attività della tubulina per formare nuovi microtubuli a partire dai due MTOC in fase di allontanamento a questo punto diventa frenetica ed aumenta di molto rispetto alla stessa attività osservabile in interfase. La profase prosegue con alcuni eventi che, nel continuum della divisione, sono di transizione con la successiva fase di metafase, ed è per questo che si preferisce ormai classificarli come prometafase.

Prometafase

L'avvio della prometafase si fa coincidere con la frammentazione in piccole vescicole dell'involucro nucleare, che è la conseguenza della depolimerizzazione delle proteine della lamina avviata dalla loro fosforilazione da parte di Cdk1. Contemporaneamente s'incomincia a delineare il fuso mitotico nella sua organizzazione finale, mentre nel citoplasma sono ora disponibili i cromatidi fratelli. Il fuso mitotico è formato da diversi tipi di microtubuli suddivisi in base al tipo di rapporti che instaurano ed alle funzioni che svolgono nel corso della mitosi:

- 1) **Fibre del cinetocore** interagiscono con i cromosomi legandosi al centromero e sono importanti per il trasporto dei cromosomi ai poli opposti della cellula. I microtubuli non interagiscono direttamente con il centromero, ma con una placca formata da varie proteine denominata cinetocore. Ogni cromatidio fratello ha un cinetocore, le due strutture sono disposte sulle facce opposte dei cromosomi; in questo modo solo un cinetocore alla volta è orientato verso un polo del fuso. Cromosomi senza centromeri non hanno il cinetocore, non interagiscono con il fuso, e vengono persi durante la mitosi. Circa l'80% dei microtubuli del fuso sono legati al cinetocore.

- 2) **Fibre astrali** si dirigono a partire da un polo del fuso verso il cortex cellulare e la membrana plasmatica, sono coinvolte nell'allungamento del fuso mitotico durante le fasi successive alla metafase. Esse vengono utilizzate per trascinare il fuso ed i cromosomi ad esso associati verso la periferia della cellula
- 3) **Fibra interpolari** partono da un polo del fuso e si dirigono verso il polo opposto, per terminare nella zona equatoriale dove si sovrappongono ad un'altra fibra proveniente dal polo opposto. Sono fondamentali per allungare il fuso ed allontanare i due poli contribuendo così al movimento dei cromosomi verso la periferia.

Metafase

La caratteristica principale della metafase è l'allineamento dei cromosomi in posizione mediana rispetto ai due poli del fuso, in quella struttura che è conosciuta come piastra metafasica. Durante la prometafase è avvenuta l'interazione tra microtubuli e cromosomi, e quando i cromosomi si trovano equidistanti dai due poli nella zona equatoriale del fuso formano appunto la **piastra metafasica**. Anche quando sono allineati nella zona equatoriale, equidistante tra i due poli, i cromosomi sono ininterrottamente soggetti a forze che tenderebbero a trascinarli verso i due poli del fuso. Le coesine che tengono uniti i cromatidi fratelli impediscono che ciò accada. Durante questa fase agisce il checkpoint mitotico, che verifica il completamento dell'allineamento dei cromosomi nella piastra metafasica e la formazione del fuso mitotico. L'efficienza di questo checkpoint rende molto remota la possibilità di perdere dei cromosomi durante la mitosi; nel lievito ogni 100.000 mitosi si può perdere un cromosoma. È questo checkpoint deciderà, attraverso l'utilizzo di una nuova attività chinasica, quando e se attivare un complesso multi proteico denominato **APC (anaphase promoting complex)**.

Anafase

Con l'anafase si rompono i legami che tengono uniti i cromatidi fratelli e ciascuno di essi migra velocemente verso il polo del fuso al quale è legato tramite le fibre del cinetocore. Questa migrazione consente che il patrimonio cromosomico sia ripartito in modo identico tra i due poli della cellula. La migrazione è permessa dall'eliminazione delle coesine. Responsabile della transazione da metafase a anafase è della degradazione delle coesine è il sopracitato complesso multi proteico APC (tale acronimo assume molti altri significati sempre in ambito biologico) un importante evento che controlla il passaggio dalla metafase all'anafase è il rapido spegnimento dell'attività chinasica di Cdk1 in seguito dell'indirizzamento della ciclina B al proteo soma e la sua degradazione. La reazione enzimatica che trasferisce l'ubiquitina alla ciclina B è innescata da alcune componenti di APC; il complesso multi proteico APC, infatti, contiene anche una E3 ligasi che permette la degradazione della ciclina. APC controlla non solo il processo mento della ciclina, ma anche quello di altre proteine necessarie per l'entrata in anafase, quali la securina, che riveste un ruolo basilare in tale fase. La securina è l'inibitore della separasi, la proteasi responsabile della degradazione delle coesine che uniscono i centromeri dei cromatidi fratelli. APC in questo modo controlla anche lo svincolarsi dei cromatidi fratelli. In realtà i rapporti tra APC e Cdk1-ciclina sono ancora più stretti poichè l'attivazione di APC innescata all'interfaccia con l'anafase necessita di una serie di eventi, che trovano la loro prima origine nell'attivazione di Cdk. In un certo senso, al momento stesso dell'attivazione del complesso Cdk-ciclina B viene anche programmato il suo spegnimento, grazie a segnali innescati dall'attività chinasica di Cdk che invariabilmente provocheranno, attraverso il coinvolgimento di APC, la degradazione della ciclina. L'anafase

rappresenta il momento funzionale in cui si attua il trasporto dei cromosomi, infatti, allorché i cromatidi fratelli saranno liberati si osserverà la loro corsa verso i due poli del fuso. Si tratta in ogni caso di eventi dinamici che si svolgono in maniera coordinata e che sono indistinguibili nella sequenza temporale.

Le fibre del cinetocore Il movimento dei cromosomi verso i poli e quindi verso le estremità negative dei microtubuli è permesso da due accadimenti:

- 1) L'accorciamento delle fibre del del cinetocore ad opera di una sua proteina, la **catastrofina**, che promuove il rilascio, consumando ATP, di etero dimeri di α/β tubulina dall'estremità positiva dei microtubuli
- 2) Il movimento di meccanoenzimi della famiglia delle chinesine, presenti nel cinetocore dove legano il DNA centromerico con consumo di ATP, verso le estremità negative dei microtubuli quindi verso i poli del fuso. Questo processo è anche definito **ANAFASE A**

Le fibre interpolari Un altro fattore che contribuisce all'allontanamento dei cromatidi fratelli è rappresentato dall'allungamento del fuso mitotico. Il fuso si allunga per mezzo di due diverse azioni: la prima prevede la polimerizzazione delle fibre interpolari per aggiunta di eterodimeri di tubulina alle loro estremità positive; la seconda consiste nell'attività di meccanoenzimi che agiscono in prossimità delle aree di sovrapposizione dei microtubuli polari provenienti dagli opposti poli. Ciò fa in modo che sia garantita una spinta continua con il procedere dell'anafase. Inoltre, l'allungamento delle fibre stesse, causato dalla polimerizzazione dei microtubuli interpolari provoca l'allungamento del fuso nel suo complesso.

Le fibre astrali Queste fibre e le attività meccano enzimatiche associate contribuiscono anch'esse ad allontanare tra di loro i poli del fuso e di conseguenza ad allontanare i cromatidi fratelli verso le due regioni opposte della cellula. Le fibre astrali che si di partono dai poli e raggiungono il cortex cellulare in cui vi sono dei meccanoenzimi, le **dineine citoplasmatiche**, con cui interagiscono. Le dineine citoplasmatiche tenderebbero a muoversi verso le estremità negative, ma il loro movimento è impedito, probabilmente dall'interazione con strutture insolubili del cortex, e quindi si evidenzia un'azione di trascinamento dei microtubuli verso il cortex cellulare. In un certo senso si comportano come dei pescatori che tirano sulla barca una rete da pesca. Questi due processi definiscono l'**ANAFASE B**.

Telofase

All'inizio della telofase ogni cromatidio fratello è già stato trasportato alle due opposte regioni della cellula, in prossimità dei due poli del fuso mitotico. Nel corso di questa fase si riforma l'involucro nucleare a partire da vescicole che si associano con i cromosomi. La lamina nucleare viene defosforilata, e ri-polimerizzata, mentre i pori nucleari si riassemblano ed i cromosomi cominciano gradualmente a decompattarsi. Gli organelli citoplasmatici, molti dei quali si erano frammentati in piccole vescicole, per garantire un'equa ripartizione tra le cellule figlie, incominciano a riorganizzarsi nella loro struttura caratteristica di una cellula in interfase.

Citochinesi

Durante il progredire della telofase le cellule acquistano nuovamente un'identità interfase ma, perché la mitosi si possa concludere, è ancora necessaria la separazione del citoplasma. Tale

processo che permette la separazione del citoplasma viene appunto chiamato citodieresi, o citochinesi. La citochinesi è controllata dal fuso mitotico, difatti, il primo segno della separazione del citoplasma è rappresentato da una piccola introflessione della membrana plasmatica che si sviluppa perpendicolarmente all'asse che separa i due poli del fuso. Questa invaginazione si evidenzia fino a formare un solco. Nella maggior parte dei casi il fuso mitotico ha una distribuzione centrale e quindi anche il solco di divisione si troverà in posizione centrale, equidistante rispetto ai due estremi della cellula, che ricordiamo essere generalmente durante la mitosi di forma arrotondata. In questo modo la separazione produrrà due cellule particolarmente simili per i contenuti citoplasmatici. In altri casi è possibile che il fuso mitotico si formi in una posizione eccentrica ed allora il solco di separazione avrà anch'esso una posizione asimmetrica generando due cellule di dimensioni radicalmente diverse; è questo il caso della mitosi asimmetrica che produce cellule figlie che differiscono tra loro per caratteristiche proliferative e differenziative. Il sistema dei microfilamenti, rappresentato **dall'actina** e dai meccanoenzimi **miosine**, è fondamentale per la citochinesi. Al di sotto dell'invaginazione della membrana plasmatica si accumulano i filamenti di actina e miosina di tipo II a formare una struttura denominata **anello contrattile**; questo si trova nel cortex cellulare ed in questa localizzazione le teste delle miosine interagiscono con i filamenti di actina in una situazione non troppo diversa da quella osservabile nei sarcomeri nel muscolo striato. L'organizzazione dei filamenti di actina e miosina in una struttura sarcomero-simile permette di sviluppare un'azione contrattile, analoga all'azione di un muscolo sfintere, che causa la contrazione del citoplasma sottostante nella zona equatoriale e la separazione finale in due della cellula. I meccanismi molecolari alla base della formazione dell'anello contrattile non sono ancora del tutto compresi. Non di meno è ben documentato il ruolo dei sistemi acto-miosinici; infatti, vari tipi di esperimenti atti a interferire con la miosina II o con la formazione dell'anello contrattile portano alla degenerazione di cellule multinucleate, conformando il ruolo fondamentale di queste strutture nella citochinesi.

Medicina

VENTICINQUESIMA LEZIONE: MEIOSI

La riproduzione sessuale aumenta la variabilità genetica nelle generazioni successive. Negli organismi eucariotici, che si riproducono sessualmente, i gameti devono contenere una sola copia del corredo cromosomico. In questo modo, al momento della fecondazione, a seguito della fusione tra gamete maschile e femminile con formazione dello zigote, si ricostituisce un patrimonio cromosomico doppio (diploide). La divisione cellulare detta **meiosi** interessa le cellule della linea germinale ed entra in gioco proprio durante la gametogenesi. Grazie a due divisioni successive, senza nuova sintesi di DNA, la meiosi permette la riduzione del numero di cromosomi da diploide ad aploide. Il dimezzamento prevede che ciascun gamete contenga un rappresentante di ciascuna coppia di omologhi presente nella cellula diploide che è entrata in meiosi. La meiosi consta di due processi di divisione successivi, distinguibili **il prima divisione meiotica, o meiosi I, e seconda divisione meiotica o meiosi II**, precedute da una sola duplicazione del DNA. a differenza della

mitosi, i tempi di divisione della meiosi si espandono notevolmente: nella specie umana la meiosi dura 24 giorni nel maschio e addirittura decenni nella femmina; in quest'ultima infatti le cellule destinate a divenire cellule uovo iniziano la meiosi prima della nascita, durante lo sviluppo del feto e si arrestano precocemente per poi riprendere il loro cammino di divisione molti anni più tardi con la pubertà.

Meiosi I

Analogamente alla mitosi, la meiosi I è preceduta dalla fase di sintesi del DNA, quindi una cellula entra in meiosi con un patrimonio genetico duplicato dove, come si è detto, i cromosomi sono formati da cromatidi fratelli uniti, oltre che dal centromero, anche dalla coesina. La meiosi I si contraddistingue per una profase I molto allungata, tanto che viene distinta in diverse sotto fasi denominate *leptotene zigotene pachitene diplotene diacinesi*. Per alcuni aspetti la profase della meiosi ricorda quella della mitosi, perché i cromosomi si compattano, l'involucro nucleare si frammenta e seguono altri caratteristici eventi della profase (**leptotene**); ciò nonostante si rilevano profonde differenze tra la profase mitotica e meiotica I. In proposito, per apprezzare compiutamente il ruolo di questa divisione è opportuno richiamare cosa si intende per **cromosomi omologhi**. Nelle cellule diploidi, infatti, ogni cromosoma è presente in due versioni parentali. Le sequenze dei loci genici sono quali del tutto identiche, ma le loro informazioni possono essere diverse perché le sequenze nucleotidiche possono differire tra un individuo ed un altro. Ogni gene è presente in due coppie, dette **alleli** (uno materno ed uno paterno) che occupano la stessa posizione (**locus**) su due cromosomi omologhi. Sappiamo, che dopo la replicazione le due copie, ad esempio del cromosoma 1 paterno sono unite tra loro grazie alla coesina come lo sono le due copie del cromosoma 1 materno. Durante la mitosi le due coppie del cromosoma 1 sia paterno sia materno non entravano mai in nessun rapporto tra loro. Nella meiosi invece, dovendosi produrre cellule con un corredo aploide completo è necessario che le due copie del cromosoma 1 materno e del cromosoma 1 paterno entrino in rapporto tra loro e si appaiano in maniera stretta; questo si verificherà per tutti i cromosomi presenti sulla cellula. Nella profase della meiosi I si stabiliscono quindi le interazioni che uniscono tutte le coppie di cromosomi omologhi. Poiché ogni cromosoma è costituito da due cromatidi fratelli, al momento dell'appaiamento si formano le **tetradi**. Tutto ciò avviene nella sottofase definita **zigotene**. La formazione di tetradi si osserva per tutti i cromosomi autosomici che si appaiano compiutamente, mentre per quanto riguarda i cromosomi sessuali bisognerà distinguere le modalità di appaiamento a seconda se si verificano nel corso dell'oogenesi (i cromosomi X si appaiano quasi come gli autosomici) o nella spermatogenesi (X e Y si appaiano parzialmente). Per certi aspetti è ancora un mistero come i cromosomi omologhi riescano a trovarsi ed appaiarsi. In alcuni organismi quali lieviti e *Drosophila*, a differenza dell'uomo, i cromosomi omologhi sono appaiati anche al di fuori della meiosi. Alcune ipotesi suggeriscono che determinate proteine promuovono la formazione di brevi sequenze di DNA a singolo filamento che, come un codice a barre, riconoscono delle sequenze complementari sul cromosoma omologo. Un'altra peculiarità nella meiosi I è sicuramente l'organizzazione del **complesso sinaptonemico o sinaptonemale** tra i cromosomi omologhi. Questo complesso che non è stato completamente caratterizzato fino ad oggi, risulta basilare per garantire un corretto appaiamento tra gli omologhi e proprio per questo è fondamentale nel favorire il fenomeno del **crossing over**, cioè lo scambio tra tratti omologhi di cromosomi omologhi (materni e paterni) in conseguenza del quale si determina la **ricombinazione**; al termine del crossing over , durante il **pachitene**, ciascun cromosoma avrà cromatidi che presentano nuove combinazioni di alleli perché sono stati scambiati segmenti di origine paterna con tratti di origine materna, praticamente i cromatidi si sono ricombinati. Del complesso sinaptonemale fanno parte proteine strutturali, che regolano la spaziatura tra filamenti di DNA, altre proteine che coordinano l'organizzarsi del DNA in anse regolari ecc.... il crossing over è uno dei momenti caratterizzanti e di maggior rilievo della meiosi in quanto produce variabilità genetica. La doppia

elica di DNA si interrompe e poi si risalda con un processo regolato accuratamente che richiede l'intervento di diversi gruppi di enzimi, alcuni dei quali coinvolti anche nella riparazione del DNA. La meiosi genererà dei gameti che saranno diversi fra loro; la meiosi e la riproduzione sessuale, infatti, costituiscono una rilevante sorgente di variazioni dell'assortimento genico e quindi una notevole potenzialità. Il complesso sinaptonemale scompare nella fase detta **diplotene** ed i cromosomi omologhi, sebbene tendano a separarsi, restano uniti solo in zone limitate in alcuni punti detti **chiasmi** (dalla caratteristica forma di incrocio a X). I chiasmi sono l'espressione morfologica dei punti in cui si è verificato il crossing over. Su una tetrad si possono osservare più chiasmi a sottolineare più eventi di scambio. Nella specie umana se ne possono osservare in media 2-3 per ogni tetrad. Successivamente i chiasmi saranno risolti e tra la metafase e l'anafase I si osserverà una separazione degli omologhi, ovvero un elemento della coppia, costituito ancora da due cromatidi fratelli, sarà trasportato ad un polo e l'altro elemento al polo opposto. Il momento della **diacinesi** conclude la profase e rappresenta il passaggio verso la metafase I, nel corso di questa fase i cromosomi si compattano ulteriormente, i nucleoli scompaiono, si conclude l'organizzazione del fuso, analogamente a quanto avviene nella profase mitotica. Durante le fasi successive della meiosi I, la cellula segue un percorso simile a quello descritto precedentemente per la mitosi; sebbene molti aspetti siano praticamente identici alla mitosi, vi sono comunque alcune differenze significative che è utile evidenziare. Una prima peculiarità è che i quattro cromatidi, che costituiscono i due cromosomi omologhi, sono uniti attraverso chiasmi e questi punti di unione sono basilari per garantire il successivo allineamento in metafase degli omologhi. Una seconda differenza è che non tutti i centromeri legano i microtubuli delle fibre del cinetocore, ma solo uno per ogni cromatidio fratello, al contrario di quanto avviene durante la mitosi dove tutti i centromeri stabiliscono rapporti con le fibre del cinetocore. Un terzo rilevante aspetto è che le coesine, le quali tengono uniti i cromatidi fratelli a livello del centromero, non vengono degradate durante le fasi successive della meiosi I. queste tre peculiarità fanno in modo che nell'anafase e nella telofase successive si abbia la separazione dei cromosomi omologhi. Le cellule che si ottengono alla fine della meiosi conterranno un set, una singola coppia di omologhi, ma ciascuno di essi sarà ancora costituito da due cromatidi fratelli, entrambi di origine materna o paterna. Un'altra considerazione riguarda i chiasmi, infatti queste strutture svolgono un ruolo fondamentale nel processo di distribuzione dei cromosomi nelle fasi successive alla profase, dunque sono espressione della ricombinazione che alla fine, promuove il procedere della meiosi. Vedendo le cose da un punto di vista opposto potremmo dire che in assenza di eventi ricombinativi, viene sfavorita la prosecuzione della meiosi. Questo non è sempre vero, infatti, nel maschio di *Drosophila*, durante la spermatogenesi, non avviene il crossing over e tutta via la produzione di spermatozoi non viene interrotta.

Meiosi II

Con la seconda divisione meiotica, a partire dalle due cellule che sono aploidi (per il contenuto informativo) con cromosomi dicromatidici poiché non ha sintesi di DNA, si formano quattro cellule aploidi con corredo cromosomico dimezzato e cromosomi monocromatidi. Questa seconda divisione è molto simile alla mitosi. Le cellule, una volta terminata la meiosi I dopo la citodieresi, riorganizzano transitoriamente l'involucro nucleare, e ricominciano a formare un fuso di divisione. Come nella mitosi, e a differenza della meiosi I, tutti i centromeri entrano in rapporto con le fibre del cinetocore in modo che i due cromatidi fratelli possano venire segregati ai due poli opposti del fuso. La coesina, che non è stata eliminata nel corso della meiosi I ed unisce a livello dei centromeri i cromatidi fratelli, è degradata nell'anafase della meiosi II. I processi sono temporalmente simili a quelli descritti per la mitosi con l'avvicinarsi della telofase e la successiva citodieresi.

Abbiamo visto che la meiosi è un meccanismo importante per creare diversità attraverso il rimescolamento dei geni. Questo è permesso da due eventi importanti:

- I) Il crossing over (che avviene durante il pachitene)
- II) L'orientamento causale degli omologhi rispetto ai poli del fuso, durante l'allineamento in piastra metafase alla metafase della meiosi I. Poiché questo è un processo casuale si verifica che alcune tetradi rivolgano gli omologhi materni verso un polo del fuso e quindi interagiscono con le fibre del fuso che provengono da quel polo, ma che un'altra tetrade abbia gli omologhi paterni orientati verso lo stesso polo.

Solo questa semplice distribuzione casuale degli omologhi rispetto i poli del fuso produce nella specie umana, caratterizzata da 23 cromosomi, circa 8.400.000 diverse combinazioni di distribuzione dei diversi cromosomi materni e paterni nei gameti; due le possibilità di orientamento perché due sono i poli del fuso, il tutto elevato al numero aploide dei cromosomi.

SIGNIFICATO ESSENZIALE DEI PROCESSI DI DIVISIONE CELLULARE

Al termine di questi discorsi appare opportuno richiamare e stigmatizzare alcuni semplici ma fondamentali concetti che derivano dalle osservazioni sperimentali sulla divisione cellulare la cui dinamica e i relativi meccanismi funzionali sono stati fin qui illustrati. La riproduzione cellulare deve assicurare un'omogenea assegnazione dei componenti cellulari, incluso il DNA, alle cellule figlie. Negli organismi unicellulari la divisione cellulare corrisponde alla riproduzione dell'intero organismo, mentre negli organismi pluricellulari la divisione cellulare è prerogativa per la determinazione, l'accrescimento e l'omeostasi dei diversi tessuti. Negli organismi eucariotici diploidi le cellule somatiche si dividono tramite la mitosi, mentre i gameti vengono generati grazie alla meiosi. La mitosi produce cellule figlie "copie" della cellula madre, in quanto i cromosomi, duplicati nella fase S, e tutti gli altri componenti cellulari sono equamente distribuiti ai due poli opposti del fuso. La separazione fisica che si attua con la citodieresi/citocinesi sancisce la nascita delle due nuove cellule. Tali cambiamenti sono regolati da due macchinari enzimatici: il complesso Cdk-ciclina ed il complesso APC. La riproduzione sessuale esige cellule con un corredo cromosomico dimezzato (aploide). Per soddisfare tale richiesta entra in gioco la meiosi che permette, attraverso due divisioni successive, con un singolo evento di duplicazione del DNA, il passaggio da un genoma diploide ad uno aploide. La profase della prima divisione meiotica è molto lunga e complessa ed è suddivisa in varie sottofasi: leptotene, zigotene, pachitene, diplotene e diacinesi. Nel corso di questa lunga profase si ha l'appaiamento dei cromosomi omologhi, con la formazione delle tetradi e la sintesi del complesso sinaptonemale, due momenti fondamentali sia per permettere la ricombinazione genetica, sia per assicurare la corretta futura ripartizione dei cromosomi omologhi. La meiosi quindi non solo dimezza il corredo cromosomico, ma lo riarrangia generando variabilità genetica; il ruolo fondamentale in questo rimescolamento genetico è esercitato dal crossing over in profase e dall'assortimento casuale dei cromosomi omologhi rispetto ai poli del fuso durante l'allineamento in piastra metafase della meiosi I.

VENTISETTESIMA LEZIONE: TRASPORTO TRANSMEMBRANA

Una delle funzioni fondamentali delle membrane è la regolazione del flusso di ioni e molecole tra l'interno e l'esterno delle cellule e viceversa. Metaboliti quali zuccheri, grassi ed altre materie prime entrano nelle cellule dallo spazio extracellulare, mentre i prodotti del catabolismo cellulare e i prodotti di secrezione attraversano il doppio strato fosfolipidico in senso opposto. Il flusso continuo di ioni e di molecole di acqua in tutti i compartimenti cellulari, assicura che le concentrazioni di queste sostanze siano mantenute entro valori compatibili con la vita e con le funzioni cellulari. La maggior parte delle molecole biologiche non riesce a passare attraverso la membrana a causa della sua composizione chimica. Il doppio strato permette infatti il libero passaggio di acqua gas e di piccole molecole liposolubili per esempio ammoniaca ed urea. La membrana plasmatica rappresenta quindi una vera e propria barriera tra il citoplasma e l'ambiente extra cellulare. Essa quindi risulta selettivamente impermeabile. Esistono infatti, tre principali differenti modalità di trasporto grazie alle quali la cellula mantiene costante la composizione intracellulare ed il pH, che sono la *diffusione semplice*, la *diffusione facilitata* ed il *trasporto attivo*. I primi due meccanismi non necessitano di alcun apporto energetico (trasporto passivo) mentre il trasporto attivo si attua anche contro gradiente di concentrazione iniziale e richiede energia libera che viene ricavata dall'idrolisi di ATP.

Diffusione semplice

La diffusione semplice attraverso la componente lipidica della membrana viene prodotta dal movimento casuale delle molecole. Il flusso netto delle sostanze si svolge dal compartimento a più alta concentrazione verso quello a concentrazione più bassa, avviene senza consumo di energia sotto forma di ATP e prosegue fino a quando non sia stata raggiunta ai due lati della membrana una uguale concentrazione di molecole in questione. La diffusione semplice è influenzata dalle dimensioni e dalla lipofilia della molecola, come anche dalla temperatura del sistema. Il passaggio delle molecole attraverso il doppio strato lipidico avvenga attraverso gli spazi intermolecolari tra le catene degli acidi grassi dei fosfolipidi; la formazione di questi spazi è favorita dalla presenza di punti di insaturazione che causano la piegatura nella catena dell'acido grasso. L'ossigeno attraversa rapidamente il doppio strato, ciò permette agli eritrociti di catturarlo nei polmoni dove è presente ad elevate concentrazioni e pressione parziale, per poi rilasciarlo nei tessuti periferici dove invece la sua concentrazione è poi bassa. Un percorso esattamente inverso viene invece effettuato dall'anidride carbonica, che attraversa comunque le pareti membranose per diffusione semplice.

Osmosi: la diffusione dell'acqua attraverso le membrane

Si tratta di un particolare tipo di diffusione che si verifica quando due soluzioni acquose contenenti quantità diverse di soluto sono separate da una membrana semipermeabile che permette il passaggio del solvente ma non quello del soluto. L'acqua comincia a passare dalla soluzione più diluita verso quella meno diluita finché ai due versanti della membrana non si raggiunge la stessa concentrazione. La diffusione non è influenzata dal tipo di sostanza disciolta, ma dalla sua concentrazione. Come mai? Le molecole del soluto rompono la geometria ordinata che regola l'associazione delle molecole d'acqua tra di loro e quindi determinano un aumento del disordine ed una conseguente diminuzione dell'energia libera della soluzione; l'acqua si sposterà dalla soluzione dove la sua energia libera è più alta da dove è più bassa. Quando l'energia libera tra i due compartimenti sarà la stessa, la diffusione dell'acqua si arresterà e le due soluzioni saranno definite isotoniche. L'osmosi è un fenomeno essenziale per la vita della cellula: infatti se una cellula si trova a contatto con una soluzione salina più concentrata del suo citosol (soluzione ipertonica), l'acqua passerà dalla cellula verso l'esterno e quindi la cellula tenderà a rimpicciolirsi, a raggrinzirsi. Se invece una cellula viene a contatto con una soluzione meno concentrata del suo citoplasma (soluzione ipotonica) l'acqua passerà dall'esterno all'interno della cellula e questa tenderà a rigonfiarsi in qualche caso arrivando fino a scoppiare. Per evitare queste catastrofiche conseguenze, la cellula ha la necessità di

trovarsi in condizioni isotoniche rispetto all'ambiente che la circonda. Dovrà quindi in qualche modo regolare finemente la concentrazione delle sostanze ai due lati della membrana. Le cellule animali utilizzano una pompa in prevalenza, la pompa Na^+/K^+ per trasportare continuamente ioni sodio all'esterno, riducendo l'osmolarità intracellulare e regolando così il volume cellulare.

Diffusione facilitata

I processi di diffusione semplice e di osmosi riguardano poche sostanze e non sono sufficienti a garantire tutti gli scambi con l'ambiente esterno. Infatti il doppio strato lipidico, è impermeabile a molecole di grandi dimensioni, alle molecole polari e agli ioni. Molte di queste devono avere la possibilità di attraversare la membrana; per queste molecole, il processo è esoergonico, si attua un trasporto detto di diffusione facilitata che comporta l'utilizzo di particolari proteine trasportatrici (*carrier o permeasi*) o *canali ionici*.

Le proteine trasportatrici sono proteine inglobate nella membrana cellulare che si combinano temporaneamente con le particelle da trasportare accelerandone il movimento attraverso il doppio strato fosfolipidico. Il flusso netto delle molecole si verifica secondo gradiente di concentrazione della sostanza, cioè dalla zona in cui la concentrazione è più alta a dove la concentrazione è più bassa. Allorquando si devono svolgere particolari funzioni, come per esempio nei tubuli renali, anche alcune molecole liposolubili, come l'urea, si avvalgono del trasporto mediato dalle proteine con lo scopo di potenziarne il passaggio. Le permeasi infatti una volta legata la molecola da traghettare, subiscono generalmente un cambiamento conformazionale che rende possibile il transito attraverso il bilayer lipidico. Allo scopo di illustrare il comportamento di queste proteine e il loro particolare meccanismo di trasporto si ritiene opportuno considerare qualche esempio in ambito biomedico. Un modello particolarmente significativo è rappresentato dal trasportatore del glucosio dei globuli rossi, anche detto GLUT1. Dati biochimici ottenuti valutando le capacità di questo carrier di legare, sui due lati della membrana, molecole di glucosio modificate con un gruppo propilico, hanno permesso di proporre un modello sperimentale di struttura e funzionamento di GLUT1. Questa molecola presenta dei siti di legame per il glucosio, su entrambi i lati della membrana cellulare, e media il trasporto del glucosio seguendo le fasi qui schematizzate:

1. Il glucosio si lega alla proteina sul lato esterno della membrana
2. Si verifica un cambiamento conformazionale della proteina trasportatrice
3. Il glucosio sul versante intracellulare si dissocia dalla proteina vettore
4. Il ciclo di trasporto è ora completo con il ritorno di GLUT1 alla sua conformazione iniziale

Questo ciclo di trasporto può verificarsi in entrambe le direzioni in dipendenza dalle concentrazioni relative, intracellulari ed extracellulari, di glucosio. Analisi della sequenza del cDNA hanno evidenziato che GLUT1, così come altri trasportatori di membrana, presenta una struttura con 12 regioni idrofobiche ad alfa-elica che attraversano interamente il doppio strato lipidico creando una cavità centrale attraverso la quale passa il glucosio. Nei mammiferi la maggior parte delle cellule sono esposte a concentrazioni extracellulari di glucosio di circa sette volte superiori a quelle intracellulari. Questa differenza di concentrazione è mantenuta grazie ad un meccanismo biochimico che modifica il glucosio: questo, appena entrato, viene velocemente fosforilato a glucosio-6-fosfato in modo che non possa ri-uscire dalla cellula in quanto la molecola fosforilata non viene riconosciuta da GLUT1. Nell'uomo sono state identificate 5 isoforme della famiglia dei trasportatori del glucosio GLUT.

I canali ionici si trovano nelle membrane di quasi tutti i tipi di cellule, hanno un ruolo essenziale per l'esistenza degli organismi viventi e sono sofisticate macchine molecolari in grado di condurre ioni con

specifica selettività. I canali ionici sono alla base di processi di fondamentale importanza biologica come la trasmissione degli stimoli nervosi, la trasduzione del segnale e la regolazione della pressione osmotica. I canali (al contrario dei carrier) possono trasportare solo ioni; essi sono altamente selettivi. Si ritiene che la selettività dipenda principalmente dall'interazione tra gli ioni e le pareti dei pori. A canali differenti corrispondono selettività diverse; la selettività è espressa di solito tramite la permeabilità dei differenti ioni. Ioni più piccoli hanno permeabilità maggiore, ma ciò non accade sempre perché solitamente si è in presenza di ioni idrati per cui l'alone di idratazione ne aumenta il raggio. I residui amminoacidici che costituiscono la parete dei canali presentano anche gruppi carichi che creano forze elettrostatiche capaci di influenzare la permeabilità di ogni ione nel canale. Queste cariche generalmente sono di segno opposto a quello degli ioni verso i quali il canale è selettivo. Nella maggior parte dei casi i canali ionici sono "controllati", posseggono cioè un meccanismo di apertura-chiusura (gating) che permette la regolazione del passaggio di ioni. L'apertura dei canali può essere regolata da degli ioni. L'apertura dei canali può essere regolata da recettori, secondi messaggeri, dal potenziale elettrico della membrana o da stimoli meccanici, cosicché il passaggio può essere finemente ma rapidamente modulato. Per quanto riguarda i canali ionici del potassio, il meccanismo di gating è stato svelato nel 2003. In questo canale ionico, denominato KcsA, una piccola porzione costituita da due strutture ad alfa-elica quasi parallele, mostra proprietà selettive e per questo è detta filtro di selezione. Gli ioni potassio interagiscono elettrostaticamente con le pareti del filtro, che quindi costituiscono una sorta di tubo molecolare. Variando il potenziale esterno si modifica la distribuzione di carica lungo le eliche, determinando così lo strozzamento o l'apertura del canale per un effetto di polarizzazione: se ad esempio una carica positiva elevata si concentra in una zona delle eliche, queste tendono a respingersi e si aprono, quando invece la carica è piccola, a causa di altre interazioni le eliche si avvicinano. In questo modo le due eliche si comportano come un cancello che si apre e si chiude a seconda della distribuzione di cariche su di esse. Ancora nella regione del filtro selettivo di tutti i canali per il potassio è presente un penta peptide altamente conservato nelle varie specie studiate. È stato dimostrato che mutazioni a carico di tali residui amminoacidici, che costituiscono pertanto una sorta di firma apocripa, alterano la capacità del canale di discriminare tra sodio e potassio. Gli atomi di ossigeno che sporgono dallo scheletro carbonioso del penta peptide determinano una strozzatura avente un diametro di circa 0.3nm che è la dimensione richiesta per alloggiare un atomo di K^+ privo del guscio di idratazione. La struttura che ne risulta è stabile a differenza di quanto accade per gli ioni più piccoli, come il sodio, che si trovano a maggior distanza dagli atomi di ossigeno e non possono superare la barriera energetica richiesta per passare attraverso il canale.

Caratteristiche della diffusione facilitata

La *specificità* dipende sia dalla natura del sito di legame, che dalle cariche in gioco che su tale sito, interagiscono con una porzione specifica del substrato. I legami che si formano sono generalmente di tipo debole, in modo da consentire al soluto di staccarsi non appena ha attraversato la membrana. La velocità con cui avviene il trasporto facilitato può essere influenzata da altri soluti coinvolti nel sistema. Questi possono anche determinare *inibizione* o partecipare, con effetto *cooperativo* a stimolare il trasporto. Sebbene la velocità di trasporto aumenti con l'aumentare della differenza di concentrazione del substrato ai lati della membrana, esiste una velocità massima del processo di trasferimento che è dovuta al numero di molecole carrier presenti (*saturabilità*). Questa caratteristica è molto simile a ciò che si verifica nelle reazioni enzimatiche dove la velocità di catalisi è correlata al numero di molecole di enzima presenti nella soluzione di reazione. I canali, invece, possono saturarsi se sono stretti o se è presente un "gate" regolato. L'effetto *trans* solo per i carrier, al contrario, dipende dalla capacità che hanno altri soluti presenti sul lato

trans della membrana (lato verso cui è diretto il passaggio di molecole) di modulare il passaggio di sostanze attraverso il carrier.

Trasporto attivo

L'ambiente intracellulare e quello extracellulare sono caratterizzati da una distribuzione ineguale di specie ioniche quali Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , e H^+ . In particolare il Na è presente con una concentrazione considerevolmente più elevata all'esterno rispetto che all'interno; invece il K è più presente all'interno che all'esterno. Questa diversa distribuzione di carica è garantita e mantenuta da un tipo di trasporto di membrana che, diversamente da quelli finora illustrati, consente il movimento di ioni e molecole contro gradiente di concentrazione: per questo è definito trasporto attivo. Il trasporto attivo è mediato da proteine intrinseche di membrana che sono in grado di legare in maniera selettiva un particolare soluto e quindi di trasportarlo attraverso la membrana in seguito a modifiche conformazionali. La caratteristica peculiare di queste proteine è quella di idrolizzare ATP; ciò significa che il trasporto dei soluti contro gradiente elettrochimico richiede dispendio di energia da parte della cellula. Le proteine che effettuano questo tipo di trasporto vengono definite **pompe ATP-dipendenti, o ATPasi**. Il trasporto mediato dalle pompe ATP-dipendenti è definito trasporto attivo diretto o primario, in quanto l'energia che deriva dall'idrolisi di ATP viene immediatamente utilizzata dalla pompa per il trasporto dei soluti che, in questo caso, sono sempre ioni con carica positiva. Negli eucarioti, inoltre, si attua un altro tipo di trasporto attivo, chiamato indiretto, o secondario; in questo caso l'energia necessaria al trasporto di un soluto contro il suo gradiente di concentrazione non è fornita direttamente dall'idrolisi di ATP, ma dall'esistenza di un gradiente elettrochimico prodotto da un trasporto attivo primario. Generalmente nel trasporto attivo secondario, attraverso un meccanismo di co-trasporto, viene utilizzata l'energia del gradiente elettrochimico degli ioni Na^+ e H^+ per favorire il movimento contro gradiente di concentrazione di molecole di varia natura.

Trasporto attivo diretto mediato da pompe ATP-dipendenti

Il trasporto attivo diretto dipende da quattro tipi di ATPasi dette: ATPasi di tipo P, V, F, e ABC. Le ATPasi di tipo P, V e F sono capaci di trasportare esclusivamente ioni, mentre le ATPasi di tipo ABC sono responsabili del trasporto sia di ioni che di molecole di piccola dimensione.

Pompe ATP-asi di tipo P – costituite da una subunità catalitica α e una β con probabile funzione modulatoria, sono nella maggior parte strutturate in tetrameri $\alpha_2\beta_2$. La subunità α è in grado di legare l'ATP che viene idrolizzato, in presenza di ioni Mg^{2+} , in ADP e fosfato inorganico; quest'ultimo è poi trasferito su uno specifico residuo di acido aspartico da cui la denominazione, per queste ATPasi, di pompe P (phosphorylated). L'idrolisi di ATP e la successiva fosforilazione della subunità α inducono in queste proteine dei cambiamenti conformazionali; tali transizioni di conformazione determinano l'esposizione di siti di legame ad alta o bassa affinità per gli ioni specifici. La **pompa Na^+/K^+ ATP-asi** fa parte della famiglia delle pompe P. È costituita da un tetramero $\alpha_2\beta_2$ espresso sulla membrana di quasi tutte le cellule animali. La subunità α responsabile sia dell'idrolisi di ATP che del trasporto di ioni, la subunità β , localizzato sul versante esterno della membrana, non sembra essere direttamente coinvolto nel trasporto di ioni, ma piuttosto per il corretto ripiegamento della subunità α . Il trasporto mediato da questa pompa ionica prevede il trasferimento di tre ioni Na all'esterno della cellula e due ioni K all'interno, per ogni molecola di ATP idrolizzata. In questo modo la Na/K ATP-asi contribuisce in modo diretto alla diversa distribuzione di cariche tra i due lati della membrana plasmatica ed è per questo motivo che è definita **pompa elettrogenica**. La conformazione della proteina è caratterizzata dall'esposizione sul versante interno della cellula di tre siti di legame ad alta affinità per gli ioni sodio; questo consente alla ATPasi di legare tre ioni

Na, sebbene la concentrazione intracellulare di questa molecola sia molto bassa; il legame tra la pompa e gli ioni sodio induce il legame dell'ATP alla subunità α , la sua idrolisi ed il successivo trasferimento del fosfato inorganico su un residuo di acido aspartico. La fosforilazione della subunità α determina la trasizione della conformazione della proteina. La nuova conformazione è caratterizzata dall'esposizione nel versante extracellulare di siti a bassa affinità per il sodio, cosicchè gli ioni precedentemente legati vengano rilasciati. Il rilascio degli ioni Na consente l'esposizione di due siti di legame per K, che quindi si legherà facilmente alla pompa, sebbene la sua concentrazione esterna sia esigua. Il legame degli ioni K induce la defosforilazione del residuo di acido aspartico che comporta il ritorno della proteina dalla conformazione 2 alla conformazione 1. La pompa, a questo punto, espone sul versante citosolico della cellula due siti a bassa affinità per il potassio, per cui tali ioni vengono rilasciati. La pompa ionica si ritrova quindi nella fase iniziale in cui espone siti di legame ad alta affinità per ioni sodio. I ruoli funzionali della pompa Na/K sono molteplici: è determinante nel mantenere la differenza nella distribuzione delle cariche elettriche tra i due versanti della membrana plasmatica, costituisce il fondamento essenziale per la generazione dell'impulso nervoso nei neuroni e nelle cellule muscolari. In oltre l'attività di questa pompa è indispensabile per il mantenimento dell'equilibrio osmotico nelle cellule animali. Infatti è stato dimostrato che l'inibizione di questa pompa determina in mole cellule animali lisi osmotica dovuta all'ingresso di acqua in seguito all'aumento eccessivo della concentrazione citosolica di ioni sodio. In fine, il gradiente elettrochimico degli ioni sodio generato dalla pompa sodio/potassio ATP-dipendente viene utilizzato nelle cellule animali come fonte di energia nel trasporto attivo secondario di zuccheri ed amminoacidi.

Pompa ATP-asi del tipo V ed F – Le pompe ATP-asi di tipo V trasportano ioni H dal citoplasma al lume di lisosomi, endosomi e vacuoli delle cellule vegetali. Il movimento contro gradiente di concentrazione di questi ioni determina un abbassamento di pH interno di tali organuli e contribuisce a mantenere neutro il pH del citoplasma. Le pompe ATP-asi di tipo V sono strutture complesse costituite da due domini, uno citoplasmatico V1 ed uno trans membrana V0. Il dominio v1, responsabile del legame e dell'idrolisi di ATP, è costituito da almeno otto subunità (A-H) di cui le subunità A e B sono presenti in tre copie; il dominio v0, responsabile della traslocazione degli ioni H contiene almeno 4 diverse subunità. In particolare, 6 subunità c del dominio v0 si dispongono a formare una struttura a barile che costituisce il canale per i protoni. Le pompe di tipo V utilizzano l'energia derivata dall'idrolisi di ATP senza formare un intermedio fosforilato; queste pompe per ogni molecola di ATP idrolizzata, trasportano 2 ioni H contro gradiente elettrochimico. Pompe di tipo V sono state identificate anche sulla membrana plasmatica di diversi tipi cellulari, quali gli osteoclasti, i neutrofili, gli spermatozoi e le cellule intercalari del rene. Gli osteoclasti sono cellule multinucleate di origine emopoietica, responsabili della degradazione e del riassorbimento dell'osso, che insieme agli osteoblasti, regolano il naturale turnover del tessuto osseo; in queste cellule, l'attività della pompa ATP-asi di tipo V consente l'acidificazione ed il conseguente dissolvimento della matrice mineralizzata del tessuto osseo. Negli spermatozoi invece la pompa è localizzata a livello dell'acrosoma, dove la formazione di un pH acido è fondamentale per l'attivazione di specifiche proteasi coinvolte nel processo di fecondazione. Sia il dominio v1 che nel dominio v0 è stata osservata la presenza di subunità tessuto-specifiche le cui mutazioni sono associate ad alcune patologie: nel dominio v1, per esempio, la forma mutata dell'isoforma b1, espressa nelle cellule intercalari del rene, determina l'insorgenza dell'acidosi tubulare renale, mentre a livello del dominio v0, mutazioni dell'isoforma a3 specifica degli osteoclasti sono associate all'osteoporosi infantile maligna. Dal punto di vista strutturale le pompe ATP-asi di tipo v sono strettamente omologhe alla pompa f0f1 dei batteri, cloroplasti e mitocondri. La presenza di questi trasportatori di analoghe regioni membrana rie e citoplasmatiche, indica la loro probabile derivazione da un unico tipo ancestrale. Tuttavia il ruolo funzionale di queste pompe è differente: infatti,

mentre le pompe di tipo V utilizzano ATP per pompare H contro gradiente, le pompe F₀F₁ utilizzano il gradiente di H come fonte di sintesi di ATP a partire da adp e fosfato.

Pompe ATP-asi di tipo ABC – Le pompe ATP-asi di tipo ABC (ATP binding cassette) costituiscono un'ampia superfamiglia di proteine responsabili del trasporto contro gradiente di concentrazioni di vari ioni e tipi di molecole, compresi glucidi ed amminoacidi. Le proteine ABC hanno 4 domini: 2 transmembrana T e due citoplasmatici leganti ATP A, che accoppiano l'idrolisi di ATP al trasporto del soluto. Alla superfamiglia dei trasportatori ABC appartengono le permeasi batteriche, che consentono il trasporto di nutrienti dall'ambiente extracellulare all'interno della cellula. Queste permeasi consentono ai batteri di sopravvivere anche in ambienti ostili e scarsi di nutrienti poiché operando un trasporto contro gradiente di concentrazione rendono possibile l'accumulo a livello cellulare di sostanze nutritive. Le permeasi batteriche sono proteine inducibili, cioè il loro livello di espressione è regolato sia dalla concentrazione di nutrienti sia dalle necessità metaboliche della cellula batterica. La prima pompa ABC identificata negli eucarioti è una proteina in grado di trasportare, in seguito all'idrolisi di ATP, una vasta gamma di sostanze dal citoplasma all'ambiente extracellulare; essa è stata denominata **multidrug-resistance MDR o P-glicoproteina** a seguito di risultati sperimentali che hanno dimostrato che cellule tumorali, in cui si osserva l'aumento di espressione di tale pompa, acquistano un fenotipo di resistenza ai chemioterapici, ciò a causa della loro capacità di espellere farmaci antitumorali. Un'altra ATP-asi ABC eucariotica particolarmente studiata è una proteina canale per lo ione cloruro, regolata dall'AMP ciclico, espressa sulla membrana plasmatica apicale delle cellule epiteliali di diversi tessuti. Mutazioni a carico del gene che codifica questa proteina sono responsabili della fibrosi cistica, una delle malattie ereditarie a trasmissione autosomica recessiva più diffuse nella popolazione caucasica; come conseguenza di tali mutazioni i soggetti affetti da tale patologia esprimono una proteina canale per lo ione cloruro denominata CFTR (regolatore della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica), funzionalmente alterata. La mutazione più frequente nei soggetti affetti da FC è dovuta alla delezione di una tripletta che codifica fenilalanina in posizione 508 di uno dei domini di affinità per i nucleotidi. È stato dimostrato che le proteine con tale mutazione non raggiungono la membrana plasmatica delle cellule epiteliali perché non correttamente processate a livello del RE. Nei soggetti omozigoti per l'allele con questa mutazione, si manifesta una forma grave di FC poiché la proteina canale CFTR non viene espressa. Altre mutazioni, invece, causano forme meno gravi della malattia perché determinano l'espressione di una ATP-asi ABC con una conduttanza per lo ione cloruro più bassa della norma, che comporta, come una delle maggiori conseguenze, la diminuzione dell'efflusso di acqua e quindi la formazione di un muco molto denso e difficile da rimuovere che causa gravi alterazioni funzionali in vari organi ed apparati, tra cui pancreas, intestino, organi riproduttivi e vie respiratorie.

Trasporto attivo indiretto

Il trasporto attivo indiretto di zuccheri, amminoacidi e di altre molecole organiche contro gradiente di concentrazione è spesso associato ad un cotrasporto con ioni sodio. Le proteine che mediano questo tipo di trasporto, detto secondario, o indiretto, non utilizzano energia che deriva direttamente dal consumo di ATP, ma piuttosto quella accumulata nel gradiente elettrochimico generato dalle pompe ATP-asi. Un tipo di trasporto attivo secondario è quello che permette il movimento contro gradiente di concentrazione di glucosio dal lume intestinale verso l'interno dell'enterocita, attraverso un meccanismo di simporto con lo ione sodio mantenuto dall'azione della pompa sodio/potassio. Il glucosio che penetra nell'enterocita, con il meccanismo di trasporto attivo indiretto appena descritto, successivamente passa al sangue per diffusione facilitata mediata dalla proteina carrier GLUT2.

VENTOTTESIMA LEZIONE. TRASDUZIONE DEL SEGNALE

I meccanismi di segnalazione cellulare – ligandi, recettori e trasduzione del segnale recettoriale

Negli organismi multicellulari le cellule non sono entità isolate, ma hanno un comportamento sociale, cioè comunicano tra loro con un processo definito **segnalazione cellulare** che è indispensabile all'interno degli organi per controllarne il funzionamento. La segnalazione cellulare è un processo complesso che consiste nella produzione e nel rilascio di segnali chimici ed elettrici che vengono veicolati sulle cellule bersaglio, permettendo lo scambio di informazioni. Come esempio paradigmatico, si può sottolineare come il continuo passaggio di stimoli tra i neuroni sia alla base del funzionamento del sistema nervoso così come la capacità di ogni singola cellula di sopravvivere all'interno di un tessuto, proliferare, differenziare o alterare il suo metabolismo dipenda da segnali esterni provenienti da altre cellule o dall'organismo. Gli eventi di riconoscimento e contatto tra le due cellule dipendono dalla liberazione nell'ambiente di peptidi e segnali solubili denominati fattori di accoppiamento.

La natura delle molecole segnale e la segnalazione paracrina, autocrina, endocrina – Le principali responsabili dello scambio di informazione tra le cellule sono fattori solubili, quali i neurotrasmettitori, gli ormoni, i fattori di crescita o le citochine, la cui struttura chimica può essere molto varia. Alcuni neurotrasmettitori, sono di natura amminoacidica (glutammato, glicina) mentre la maggior parte degli ormoni, citochine, e fattori di crescita sono di natura proteica (insulina, ormone della crescita, interferone) e lipidica. Tra questi vi sono ormoni derivati da modificazioni chimiche della molecola del cortisolo, come il testosterone o l'estradiolo (ormoni steroidei), ed alcuni importanti mediatori cellulari, come le prostaglandine e l'acido arachidonico. Una particolarità è rappresentata dall'ossido di azoto, un gas prodotto per deaminazione dell'arginina, che controlla importanti processi come lo stato contrattile della muscolatura liscia dei vasi, e quindi la pressione sanguigna. A seconda del raggio d'azione dei fattori solubili che possono diffondere nello spazio pericellulare oppure essere rilasciati nel circolo sanguigno o linfatico, la segnalazione si distingue in paracrina, autocrina e endocrina. L'ossido di azoto ad esempio agisce nelle vicinanze del sito di produzione cioè con un raggio d'azione ridotto che è anche caratteristico di molte citochine e fattori di crescita, che possono intervenire nell'attivazione delle cellule del sistema immunitario e nelle risposte infiammatorie localizzate. Questo tipo di comunicazione a breve raggio tra le cellule diverse è indicato come **segnalazione paracrina**. In modo simile i neurotrasmettitori prodotti dalle cellule nervose hanno un raggio d'azione molto ridotto, dovuto anche alle limitazioni spaziali imposte dalle sinapsi, le specifiche strutture di contatto interneuronali. Un caso di segnalazione paracrina particolare è rappresentato dalla **comunicazione autocrina**, in cui la molecola segnale solubile, rilasciata nel mezzo extracellulare agisce sulla stessa cellula che l'ha prodotta. Questo tipo di segnalazione caratterizza molti fattori di crescita che controllano la proliferazione cellulare. La **segnalazione endocrina** consiste nel rilascio di fattori solubili nel flusso circolatorio e caratterizza la maggior parte degli ormoni; la diffusione attraverso il sistema vascolare, permette di raggiungere cellule bersaglio anche molto distanti dalla sede di sintesi, come nel caso degli ormoni FSH e LH. Che, prodotti dall'ipofisi agiscono sulle gonadi. Esistono anche casi di comunicazione tra le cellule che sono mediate dal contatto tra singole cellule o tra cellule e le strutture della matrice extracellulare. Questi tipi di segnale, che possono essere definiti *di posizione*, forniscono importanti informazioni alla cellula sulla sua localizzazione all'interno di un tessuto. Tali meccanismi di comunicazione sono rilevati durante sia lo sviluppo embrionale, quando le cellule devono organizzarsi ancora in tessuti, che nell'individuo adulto in varie situazioni specifiche.

I recettori – Il segnale necessario per la comunicazione intercellulare, sia esso un ormone o una molecola della matrice extracellulare, una volta giunto sulla cellula bersaglio esercita la propria azione attraverso specifici recettori cellulari. I **recettori** sono proteine che a seguito dell'interazione con la molecola segnale, denominata ligando, funzionano come interruttori molecolari, determinando l'accensione di particolari vie metaboliche che possono modificare le funzioni cellulari. Esiste una selettiva specificità tra proteine recettrici ed i rispettivi ligandi, per cui ne consegue che la capacità di una cellula di rispondere a determinati stimoli è definita dal corredo di recettori presenti. Nel caso della comunicazione endocrina, i fattori solubili, che diffondono nel torrente circolatorio, raggiungono tutte le cellule dell'organismo, ma di fatto modificano il funzionamento solo di un particolare tipo di cellule bersaglio; tale specificità di azione è resa possibile dalla presenza di recettori per quel particolare segnale solo sulle cellule destinate ad esserne bersaglio. L'unica eccezione alla regola è rappresentata dalla segnalazione mediata dall'ossido d'azoto che non richiede recettori specifici sulla cellula bersaglio, ma modifica direttamente l'attività di un enzima intracellulare, la GMP ciclastasi. Le caratteristiche fondamentali che i recettori devono avere nei confronti dei loro ligandi sono due: specificità e affinità di legame. Il recettore ed il suo ligando si riconoscono attraverso una specificità sterica, la specificità di interazione è assicurata dalla presenza nella struttura tridimensionale del legando di una singola regione complementare alla molecola del recettore definita sito di legame. La complementarità tra il ligando ed il recettore è assicurata dalla possibilità di formare in modo spontaneo e reversibile legami deboli in condizioni compatibili con la vita cellulare. L'affinità di legame definisce le concentrazioni di ligando necessarie per formare il complesso ligando-recettore. Più elevato è il numero di legami che si stabiliscono tra recettore e ligando, maggiore sarà l'affinità. Un'elevata affinità tra ligando e recettore permette la formazione del complesso anche a basse concentrazioni di ligandi o di recettori. La maggior parte dei fattori di segnalazione non è in grado di passare direttamente attraverso le membrane cellulari, data la loro natura idrofilia ed il peso molecolare elevato. Queste molecole, pertanto, devono trasdurre i segnali all'interno del citoplasma senza penetrare all'interno della cellula, ma riconoscendo e legando specifici recettori localizzati sulla membrana cellulare. Questi **recettori di membrana** costituiscono la maggior parte del sistema di comunicazione della cellula, sono in pratica proteine transmembrana, multi o monopassaggio. Sulla base di questa struttura, le molecole segnale idrofili che restano al di fuori della cellula, legano il dominio esterno del recettore che a sua volta si accende, come un interruttore a tempo e attiva una cascata di segnali all'interno della cellula tramite la porzione esposta sul versante citoplasmatico della membrana. Esistono però particolari classi di molecole segnale di natura lipidica, come gli ormoni steroidei. Queste molecole, di natura idrofobica, hanno una struttura planare simile a quella del colesterolo e durante il trasporto attraverso il torrente circolatorio sono associate a trasportatori proteici; una volta raggiunto il bersaglio, queste sostanze sono in grado di attraversare il doppio strato lipidico delle membrane in modo spontaneo (diffusione semplice) proprio grazie alla loro idrofobicità, e, giunte nel citoplasma, legano recettori proteici intracellulari. Il fatto che la loro azione richieda l'intervento di un recettore permette un'azione mirata degli ormoni steroidei solo nelle cellule che presentano il recettore corrispondente. Anche in questo caso quindi, l'ormone, pur penetrando nel citoplasma, non agisce direttamente ma tramite l'interazione con il proprio recettore specifico, determinando la specificità di azione sulle cellule bersaglio. I **recettori intracellulari** sono costituiti da tre regioni funzionalmente distinte: una che attiva la trascrizione, una seconda che lega il DNA in sequenze specifiche ed una terza che lega l'ormone. In condizioni di riposo il recettore si trova legato ad una molecola inibitrice, che maschera il sito legante il DNA. Quando l'ormone si lega, la molecola recettore cambia di conformazione rilasciando la proteina e smascherando il sito legante il DNA. In questo modo il complesso ormone/recettore può interagire con le sequenze del promotore del gene bersaglio regolandone la trascrizione.

I recettori trasducono un segnale all'interno della cellula – i recettori agiscono da interruttori molecolari in grado di attivare la produzione di segnali chimici che modificano svariate funzioni cellulari quali l'attività metabolica, la motilità, l'espressione genica, la proliferazione o il differenziamento. Questi eventi avvengono grazie alla modificazione di una o più funzioni enzimatiche. Perché la segnalazione possa svolgersi, è necessario che si verifichi la stretta interazione tra ligando e recettore. Nel caso della motilità cellulare, la cellula potrà modificare il suo movimento alterando gli enzimi che controllano la polimerizzazione dell'actina oppure l'attività enzimatica della miosina. Altre risposte si ottengono favorendo l'attivazione di fattori di trascrizione che costituiscono complessi attivi sul DNA o modificando l'attività delle RNA polimerasi. La regolazione delle attività enzimatiche si attua tramite la modifica della struttura terziaria dell'enzima stesso in modo reversibile. Esistono differenti modi per alterare la struttura terziaria di una proteina, ma il metodo più comune, in risposta alle molecole segnale, consiste nell'aggiunta di un gruppo fosfato su specifici residui amminoacidi. Questo processo si chiama fosforilazione e gli amminoacidi fosforilabili sono quelli che hanno un residuo ossidrilico disponibile per il legame al gruppo fosfato, cioè solo la serina, la treonina o la tirosina. Il legame covalente di un gruppo fosfato introduce nella proteina un gruppo a forte carica negativa con un elevato ingombro tridimensionale. L'aggiunta di questo gruppo causa, quindi, una riorganizzazione dei legami che controllano la struttura terziaria della proteina e porta, così, ad una transizione funzionale. È importante sottolineare che la fosforilazione e la conseguente modificazione della struttura terziaria di un enzima possono portare all'attivazione dell'enzima stesso. Esistono comunque numerosi esempi in cui la fosforilazione porta ad un'inibizione dell'attività enzimatica. La fosforilazione di una proteina è un evento transitorio che viene terminato dall'azione di enzimi in grado di staccare il gruppo fosfato dalla proteina e quindi di spegnere la risposta. Comunque, l'aggiunta di un gruppo fosfato su una proteina è una modificazione covalente che richiede energia fornita dalle molecole di ATP, il cui fosfato in posizione gamma è trasferito sulla proteina. La formazione di un legame covalente richiede l'intervento di un enzima che operi la fosforilazione. Gli enzimi che sono in grado di fosforilare proteine o altri substrati sono chiamati **chinasi**. Il ritorno di un enzima allo stato basale richiede ovviamente la **defosforilazione**, per cui il gruppo fosfato viene idrolizzato dai residui di serina, treonina o tirosina delle proteine grazie ad un enzima specifico che appartiene alla categoria delle **fosfatasi**. Chinasi e fosfatasi sono quindi due classi di enzimi chiave nella regolazione delle attività cellulari. È altrettanto importante sottolineare che chinasi e fosfatasi essendo essi stessi enzimi, sono soggetti a regolazione funzionale da parte dei recettori nel processo della segnalazione. Volendo schematizzare il meccanismo di azione delle molecole segnale e dei loro recettori possiamo stabilire la seguente gerarchia: ligando → recettore → formazione del complesso LR → regolazione di chinasi e fosfatasi → regolazione enzima/i bersaglio → modificazione dell'attività cellulare. Esistono altre modalità di segnalazione cellulare. La prima è rappresentata dal cambiamento di concentrazione degli ioni calcio all'interno del citoplasma. La concentrazione degli ioni calcio nel citoplasma è mantenuta molto bassa da sistemi di trasporto come le pompe e i canali che accumulano il calcio in depositi intracellulari. Lo ione calcio definito anche messaggero secondario, riveste un ruolo regolatorio importante nella cellula in quanto si può legare ad alcune classi di proteine caratterizzate dalla presenza di residui di acido aspartico. L'interazione del catione bivalente con questi residui amminoacidici cambia la conformazione della struttura terziaria della proteina modificandone l'attività. Molte di queste proteine che hanno la capacità di legare il calcio, benché abbiano diverse funzioni tra di loro sono denominate **calmoduline**; esse, una volta complessate allo ione, possono legare un enzima bersaglio regolandone la funzione. Nel caso di complessi enzimatici, le calmoduline costituiscono le subunità regolatorie negative e quando legate allo ione calcio, si staccano dalle subunità catalitiche permettendone l'attivazione. Un classico esempio della funzione regolatoria giocata dallo ione calcio è rappresentato dal processo di contrazione del muscolo scheletrico. Nelle miofibrille muscolari il

calcio è immagazzinato nelle cisterne del reticolo sarcoplasmatico. In seguito ad uno stimolo nervoso di contrazione, il Ca^{2+} fuoriesce dai depositi sarcoplasmatici e si lega ad una particolare calmodulina, la **troponina C** che si associa ai filamenti di actina, modificandone la conformazione e rendendo possibile l'interazione dell'actina con la testa della miosina.

Meccanismi molecolari di trasduzione del segnale – per seguire quale sia il comportamento molecolare di trasduzione è opportuno illustrare i meccanismi di funzionamento dei recettori di membrana; infatti tra le classi di tali recettori possiamo identificare principalmente tre meccanismi di funzionamento:

- 1) I recettori che attivano le proteine G
- 2) I recettori collegati ad un enzima
- 3) I recettori che attivano canali ionici

Mentre le prime due classi rappresentano la stragrande maggioranza dei casi, i recettori che attivano canali ionici sono coinvolti soprattutto nella comunicazione tra le cellule nervose dove il segnale scambiato evoca risposte elettriche. Di questi ultimi tratteremo successivamente. Le prime due classi agiscono direttamente o indirettamente, tramite l'attivazione delle proteine G, sull'attività di chinasi e fosfatasi, per cui operano fosforilando substrati bersaglio. La maggior parte dei recettori collegati ad enzimi funziona come tirosina chinasi, cioè enzimi in grado di fosforilare il residuo amminoacido tirosina.

Recettori che attivano le proteine G – i recettori che attivano le proteine G sono proteine di membrana multipasso caratterizzate da sette domini transmembrana. Legano i ligandi idrofili all'esterno della cellula ed hanno un corto dominio intracellulare che non possiede attività enzimatica. Per trasdurre il segnale questi recettori si associano in modo transitorio con le proteine G, che costituiscono l'intermedio tra il recettore e le risposte enzimatiche intracellulari, che consistono soprattutto nell'attivazione delle chinasi PKA e PKC. Le proteine G sono così chiamate perché legano il nucleotide GTP e sono formate da tre subunità alfa beta e gamma. Le subunità beta e gamma ancorano il trimero al versante citoplasmatico della membrana plasmatica. Invece la subunità alfa rappresenta l'elemento cruciale del sistema e si presenta sotto due forme: legata al GDP in forma inattiva, legata al GTP in forma attiva. Inoltre è dotata di attività GTPasica cioè capace di idrolizzare il GTP a GDP ritornando spontaneamente alla configurazione inattiva. Nella conformazione inattiva, il trimero della proteina G si trova associato alla membrana grazie alle subunità beta/gamma, e la subunità alfa lega una molecola di GDP. Nel momento in cui è attivata dall'interazione con il recettore, la subunità alfa rilascia il GDP per legare il GTP. Questo nucleotide trifosfato è generalmente presente in concentrazioni elevate all'interno della cellula ed è pertanto disponibile senza limitazioni. Il legame con il GTP induce anche la dissociazione di alfa dalla parte beta/gamma e le permette di interagire fisicamente con due principi pali enzimi a valle, l'adenilato ciclasi e/o la fosfolipasi. Come già sottolineato la subunità alfa, grazie alla sua importante attività GTPasica è in grado di idrolizzare il GTP in GDP che ha legato, auto inattivandosi. In questo modo ritorna allo stato inattivo di partenza. Grazie a questa proprietà fondamentale le proteine G funzionano come interruttori molecolari a tempo. Possiamo paragonarle ad un interruttore elettrico temporizzato che dopo essere stato attivato, si spegne automaticamente dopo un tempo prefissato senza ulteriori interventi esterni. Questa è una proprietà unica delle proteine G.

Attivazione della proteina chinasi A (PKA) e i suoi substrati - Come si è già detto la fosforilazione è uno dei meccanismi più diffusi con cui i recettori di membrana attuano la regolazione delle attività enzimatiche intercellulari. I sistemi recettoriali meglio conosciuti sono quelli che portano all'attivazione delle due **chinasi PKA e PKC**. Queste, come qualsiasi enzima intracellulare, possono essere attivate da stimoli specifici

in particolare la PKA è attivata da AMPciclico (**cAMP**), un nucleotide ciclico, mentre la PKC è attivata dal diacil glicerolo in abbinamento con lo ione calcio. Il **cAMP** è prodotto dall'enzima adenilato ciclasi che utilizzando come substrato l'ATP, idrolizza due fosfati in posizione beta e gamma e ciclizza il fosfato in alfa legato al carbonio 5' del ribosio, impegnandolo in un secondo legame covalente con il carbonio 3' dello stesso ribosio. In questo modo il fosfato è legato sia in 5' che in 3' generando una struttura che è definita ciclica. Il cAMP si lega quindi con l'enzima PKA che è formato da quattro subunità, due delle quali hanno funzione regolatoria e sono capaci di legare il cAMP e due possiedono l'attività catalitica chinasi. L'ingresso del cAMP nelle subunità regolative causa un cambiamento di struttura e la dissociazione delle subunità catalitiche. Queste ultime sono ora attive ed in grado di fosforilare i substrati proteici. Quindi l'aumento dei livelli di cAMP provoca l'attivazione di PKA. La produzione di cAMP avviene ad opera della adenilato ciclasi, l'enzima che catalizza l'idrolisi dell'ATP e la formazione del legame ciclico. È chiaro quindi che l'aumento di cAMP richiede l'attivazione dell'adenilato ciclasi da parte del recettore; questo enzima tuttavia non è attivato direttamente dal recettore stesso, ma tramite l'attivazione di un composto intermedio, la proteina G. Nel caso specifico la subunità alfa coinvolta, si definisce Gs (stimolatoria); come vedremo successivamente, esistono altre proteine G associate a recettori diversi, capaci di regolare differenti proteine effettrici. Nella sequenza di reazioni che portano alla segnalazione recettoriale che attiva la PKA si verifica un evento indiziale all'esterno della cellula, che consiste nel legando al recettore. Quest'interazione provoca un cambiamento di struttura del recettore stesso ed in particolare nella porzione della molecola rivolta nel citoplasma che permette l'attivazione della proteina Gs. Questa lega GTP ed attiva l'adenilato ciclasi che produce il cAMP. Il cAMP a sua volta lega PKA attivandola. Uno dei sistemi di segnalazione più conosciuto che utilizza la via descritta precedentemente è quello dell'ormone peptidico glucagone, che è prodotto dalle cellule del pancreas in risposta ad un calo del glucosio ematico e raggiunge le cellule epatiche, via circolazione. Oltre che dal glucagone, il cAMP e la PKA sono attivate da altri ormoni, tra cui l'ormone luteinizzante LH e l'ormone adrenocorticotropo ACTH e l'ormone stimolante la tiroide TSH.

Regolazione dei livelli dello ione calcio ed attivazione della proteina chinasi C (PKC) – Oltre alla PKA un'altra chinasi coinvolta nelle risposte di segnalazione recettoriale è la PKC, un enzima complesso regolato contemporaneamente dal legame con ioni calcio e dall'interazione a livello della membrana plasmatica con una molecola di diacilglicerolo o DAG. La via di segnalazione recettoriale in questo caso segue uno schema del tutto analogo a quello descritto in precedenza per la PKA. Il recettore attiva una proteina G, che a sua volta attiva la fosfolipasi C beta che genera l'inositolo 1,4,5 trifosfato o IP3 ed il DAG; questi a loro volta inducono alti livelli di Ca nel citoplasma ed attivano PKC. La fosfolipasi C beta ha come substrato il fosfatidil inositolo, un fosfolipide di membrana il cui gruppo idrofilico legato al fosfato è costituito da inositolo, uno zucchero a sei atomi di carbonio. Il fosfatidilinositolo può essere fosforilato in due posizioni, 4 e 5, e si definisce quindi fosfatidil inositolo 4,5 bifosfato o PIP2. La fosfolipasi C beta taglia specificatamente il legame tra il fosfato ed il glicerolo nel PIP2 liberando così due molecole: il DAG e l'IP3. Esse hanno funzioni differenti all'interno della cellula: mentre l'IP3 induce liberazione di ioni calcio dai depositi, il DAG recluta la PKC alla membrana plasmatica e ne determina la sua attivazione. Il PKC è anch'essa un enzima formato da un dominio regolatorio ed uno catalitico con attività serina-treonina chinasi; le subunità regolatorie sono delle calmoduline che, come visto in precedenza, sono in grado di legare ioni calcio e di cambiare conformazione. Il distacco delle calmoduline permette alle subunità catalitiche della PKC di muoversi dal citoplasma e di localizzarsi sulla faccia interna della membrana plasmatica dove possono essere attivate dall'interazione con il DAG. La via di segnalazione di PKC e del Ca è presente in tutte le cellule e può essere attivata da diversi ormoni e neurotrasmettitori. Tra questi ricordiamo l'acetilcolina che stimola il rilascio di tripsinogeno nelle cellule esocrine del pancreas.

Amplificazione del segnale recettoriale da parte dei secondi messaggeri

Abbiamo appena descritto come le vie di segnalazione che portano all'attivazione di PKA e PKC sono regolate sia dalla produzione di diverse molecole diffusibili quali cAMP, IP3 e DAG, sia dalla concentrazione di ioni calcio. La produzione o il rilascio di queste molecole in risposta ad uno stimolo è massiccia sia grazie all'azione di enzimi specifici che all'apertura di canali ionici. Un'altra loro caratteristica consiste nella capacità di amplificare il segnale recettoriale tramite la diffusione libera nel citoplasma (cAMP, IP3, e ioni calcio) o nel piano della membrana DAG; proprio per queste proprietà sono stati definiti **secondi messaggeri** o **messaggeri intracellulari** per distinguerli dai messaggeri primari o extracellulari di cui fanno parte le molecole solubili di segnalazione intercellulare o le molecole insolubili che mediano i contatti cellula-cellula o cellula matrice extracellulare. Quindi la funzione di amplificazione del segnale svolta dai messaggeri secondari, può essere definita un processo a cascata in cui a partire da poche molecole di ligando e quindi poche molecole di recettore attivato, si determina ad ogni passaggio, ad un aumento di molecole segnale che attivano un gran numero di enzimi intracellulari e quindi una risposta cellulare efficace. Ogni molecola di recettore attivato può reclutare numerose proteine G in successione, almeno fino al momento in cui resta occupato dal ligando. Infatti una singola subunità alfa, una volta legato il GTP ed attivato l'enzima a valle, ritorna allo stato inattivo idrolizzando il GTP a GDP. A questo punto la alfa è di nuovo disponibile all'attivazione da parte del recettore, permettendo cicli successivi di attivazione di proteina G e dell'effettore a valle. L'attivazione della proteina G da parte del recettore, o dall'adenilato ciclasi da parte della proteina Gs necessita di un'interazione stechiometrica 1/1. L'amplificazione in questo caso è data solamente dal lasso di tempo in cui le proteine rimangono attive. Invece l'attivazione dell'adenilato ciclasi o della fosfolipasi C beta porta alla produzione di molti messaggeri intracellulari, che possono attivare diversi effettori a valle, come il cAMP, l'IP3 il DAG o gli ioni calcio. I messaggeri intracellulari sono cruciali nel meccanismo di amplificazione. Infatti tramite la loro azione le molecole di PKA o PKC attivabili sono molto più numerose rispetto a quelle attivabili da un meccanismo di interazione stechiometrica diretta con proteina effettrice a monte. Le chinasi PKA e PKC possono a loro volta fosforilare diverse molecole di enzimi bersaglio per amplificare ulteriormente il segnale. L'amplificazione del segnale recettoriale è particolarmente importante nel caso della liberazione del glucosio e acidi grassi in risposta all'ormone adrenalina, caso in cui si assiste ad una drastica modificazione del metabolismo. L'amplificazione è sicuramente meno importante nei casi in cui l'azione dell'ormone sia quella di regolare l'espressione di geni cellulari.

Recettori di membrana legati ad enzimi – I recettori associati alle proteine G non hanno attività enzimatiche specifiche, ma utilizzano le proteine G come immediati traduttori a valle e come primo elemento di collegamento per l'attivazione di specifici enzimi intracellulari. Un'altra classe di recettori di membrana, di particolare valenza, è rappresentata dai recettori collegati ad enzimi; tra questi, la classe più studiata e più rilevante dal punto di vista della biologia della cellula, è quella formata da recettori con attività tirosinica chinasi. La loro struttura è molto conservata: sono proteine integrali transmembrana monopasso, caratterizzate da un dominio extracellulare capace di legare il ligando, una regione idrofobica transmembrana ed un dominio citoplasmatico in cui è localizzata la regione responsabile dell'attività chinasi. A differenza della PKA e PKC, che fosforilano serina e treonina, le chinasi recettoriali fosforilano solo residui di tirosina. Fanno parte di questa categoria molte famiglie di recettori per diversi fattori di crescita e di differenziamento come il recettore per PDGF (platelet derived growth factor), per EGF (epidermal growth factor). Il dominio chinasi non è molto conservato tra le varie famiglie di recettori. L'attivazione delle chinasi avviene per cambiamento conformazionale in seguito al legame del ligando solubile con la porzione extracellulare del recettore. All'attivazione segue la fosforilazione in tirosina del

recettore stesso e di altre proteine substrato; in termini biochimici, per l'attivazione è richiesta la formazione di dimeri recettoriali, in modo tale che le regioni china siche dei due recettori siano sufficientemente vicine da potersi fosforilare a vicenda. Quindi ogni recettore non fosforila le proprie tirosine, ma quelle presenti sull'altra molecola di recettore presente nel dimero. Per favorire la dimezzazione alcuni dei ligandi di questi recettori come ad esempio il PDGF presentano due siti di legame per il recettore; in questo modo una singola molecola di ligando si associa a due molecole di recettore avvicinandole tra loro sul piano della membrana. Lo schema generale di funzionamento dei recettori di membrana è quindi molto simile; gli elementi comuni sono l'attivazione di una proteina G che agisce da interruttore molecolare a tempo che a sua volta porta all'attivazione di una chinasi PKA, PKC, che agisce su bersagli proteici caratteristici di volta in volta e di cellula in cellula. Le differenze riguardano le modalità di attivazione di questi due elementi chiave della cascata. Nel primo caso esiste un'interazione diretta del recettore con le proteine G che porta alla loro attivazione. Nel caso di recettori ad attività tirosina chinasi, l'interazione e l'attivazione delle proteine G dipendono dalla fosforilazione del recettore stesso e sono mediate da proteine. Anche la modalità di attivazione delle chinasi è differente nei due sistemi recettoriali: infatti nel primo caso le chinasi sono attivate da mediatori intracellulari (cAMP DAG/ioni calcio), mentre nel secondo caso l'attivazione non prevede messaggeri intracellulari ed è mediata da una via diretta.

Recettori che attivano canali ionici - nell'ambito della trasmissione degli impulsi elettrici tra cellule nervose e i loro bersagli cellulari, è opportuno illustrare un altro meccanismo attuato da una classe particolare di recettori di membrana che attivano canali ionici alternando la polarità di membrana. In proposito un esempio canonico è rappresentato dal recettore nicotinico dell'acetilcolina presente sulle cellule muscolari e responsabile della contrazione muscolare in risposta agli stimoli dei neuroni motori. Il legame dell'acetilcolina induce un cambiamento conformazionale nel recettore tale da indurre l'apertura del canale e quindi l'ingresso di ioni sodio. Si determina così la depolarizzazione elettrica della membrana muscolare che a sua volta induce l'apertura di un altro tipo di canali del sodio, e quindi la propagazione del segnale elettrico sulla membrana della cellula muscolare fino a raggiungere i tubuli a T. questi sono strutture della membrana plasmatica specifiche delle cellule muscolari che si insinuano all'interno della cellula in stretta prossimità con le cisterne del reticolo sarcoplasmatico: un organulo intracellulare per l'immagazzinamento di ioni calcio. L'arrivo dell'onda elettrica sulla membrana del tubulo T induce l'apertura dei canali del calcio presenti sulla membrana del reticolo sarcoplasmatico muscolare e quindi il rilascio di Ca nel citoplasma: il primo evento del processo di contrazione muscolare.

Spegnimento della risposta – la risposta recettoriale non è temporalmente indefinita, infatti una volta innescata ed attuata raggiungerà un momento in cui viene spenta. Una caratteristica costante dei segnali intracellulari indotti dai recettori è proprio quella di essere dei fenomeni transitori che si esauriscono in pochi minuti. Ciò non vuol dire che l'effetto dell'ormone sulla cellula non possa essere duraturo; in particolare quando l'azione dell'ormone porta ad un'alterazione dell'espressione genica, l'azione può durare anche parecchie ore, o anche essere permanente. L'importanza però di fenomeni di natura transitoria è evidenziata dal fatto che uno degli elementi della cascata intracellulare è costituito da una proteina G. Questa molecola funziona da interruttore a tempo capace di disinnescare automaticamente idrolizzando il GTP in GDP. Se invece il recettore è ancora occupato dal ligando inizia un secondo ciclo di attivazione. Questo comportamento permette di interrompere la risposta cellulare in modo automatico non appena cessa il segnale ormonale. Una siffatta proprietà non è posseduta da altre molecole della cascata come per esempio la PKA che è attivata dal cAMP e non è in grado di inattivarsi. Autonomamente a meno che i livelli di cAMP ritornino allo stato basale. Affinché questo succeda non è sufficiente

interrompere la stimolazione dell'adenilato ciclasa, ma è necessario anche demolire il cAMP prodotto. La degradazione del cAMP è mediata da un enzima specifico che è la cAMP fosfodiesterasi che idrolizza il cAMP ad AMP. Allo stesso modo, una volta che la PKA ha fosforilato la glicogeno fosforilasi chinasi GFC, attivandola, la successiva inattivazione della stessa richiede la sua defosforilazione ad opera di una fosfatasi specifica. La risposta cellulare ad un determinato stimolo è quindi il risultato di una risposta bilanciata di azioni attivatorie ed inibitorie su una particolare via di segnalazione. Questo permette un corretto dosaggio delle risposte a stimoli differenti che possono arrivare alla cellula contemporaneamente. Esiste poi un altro meccanismo per arrestare la risposta ad uno stimolo recettoriale: la temporanea desensibilizzazione della cellula successivamente ad uno stimolo prolungato o particolarmente intenso. Questo meccanismo si attua con modalità differenti. Tra queste assistiamo ad un primo meccanismo di internalizzazione del recettore cioè, dopo che il ligando ha legato il recettore questo viene internalizzato con un processo di endocitosi. Il complesso recettore-ligando è così rimosso dalla superficie cellulare ed è inserito in vescicole che sono portate all'interno del citoplasma dove possono andare incontro a vari destini. In alcuni casi, il complesso recettore ligando è degradato, in altri casi è dissociato all'interno della vescicola ed il recettore ed il ligando seguono due destini differenti: il primo è riciclato e riesposto sulla membrana, mentre il secondo è catabolizzato dai lisosomi. La desensibilizzazione può anche essere dovuta all'intervento di una proteina inibitrice che, legando il dominio citoplasmatico del recettore interrompe il segnale. Ancora, l'interruzione della trasduzione del segnale può avvenire più a valle con il legame di una proteina inibitrice ad una proteina di segnalazione, oppure grazie all'effetto di una proteina di segnalazione che attiva una proteina inibitrice. La chinasi del recettore GRK, per esempio, è in grado di fosforilare la porzione citoplasmatica del recettore beta adrenergico in un sito che ne impedisce il legame con la proteina G. In questo modo la catena di segnalazione viene interrotta nelle prime fasi.

VENTINOVESIMA LEZIONE: GENETICA FORMALE, INTRODUZIONE E CONCETTI DI GENOMA

Interpretare una trasmissione vuol dire seguire come quel complesso di proprietà somatiche e funzionali di un individuo viene trasmesso in eredità ai propri discendenti in modo efficiente e duraturo. La genetica è la scienza dell'ereditarietà in altre parole, studia la trasmissione delle caratteristiche ereditarie che distinguono un soggetto dall'altro. La genetica nasce tra la fine dell'800 e i primi del '900 ed inizia a svilupparsi proprio all'inizio del secolo scorso, avendo come base gli studi del monaco naturalista Gregor Mendel, condotti per anni nell'orto del monastero di Brno, e le sempre crescenti conoscenze citologiche e molecolari. Negli ultimi decenni che hanno visto un galoppante incremento delle conoscenze sugli organismi, la genetica si colloca certamente come una scienza fondamentale per la nostra società. I caratteri studiati da Mendel altro non sono che il risultato dell'espressione dei geni, cioè tratti di DNA presenti nel genoma in duplice copia.

Il metodo e le prove sperimentali di Mendel

La genetica ha avuto in Mendel il padre scientifico, non solo per la genialità delle sue prove sperimentali, ma anche per l'estremo rigore metodologico con cui le esperienze furono condotte ed i risultati interpretati. Il metodo e le riflessioni di questo monaco boemo, che si compiono su un substrato socio culturale e una tradizione locale particolarmente vivaci e stimolanti, sono supportati dalla conoscenza personale delle tecniche dei selezionatori di animali e vegetali, ma soprattutto sono intrise da molti principi appresi da Mendel durante gli studi formativi presso l'università di Vienna. La scelta di Mendel della procedura sperimentale, dei materiali da utilizzare si rivelarono ideali, predittivi e gli permisero di ottenere

risultati ripetibili e statisticamente significativi. Proprio nel secolo appena trascorso si sono manifestate e sviluppate enormemente le conoscenze e le applicazioni della genetica che, avendo iniziato il suo lungo cammino con Mendel, ha assunto velocemente, praticamente dalla metà del '900 le caratteristiche di una vera scienza di grande valenza ed impatto. Egli comprese, dopo molte prove, che negli organismo doveva trovarsi un qualcosa, sotto forma di singole unità, capace di determinare caratteristiche ereditabili; ritenne quindi essenziale seguire i singoli caratteri, preparando prove di incrocio dai cui risultati dedurre leggi più generali. Per questo reputò necessario iniziare le esperienze seguendo caratteri che presentavano possibili due possibili alternative (diremmo oggi fenotipo alternativo). Mendel scelse per i suoi studi una fanerogama a riproduzione annuale, il **pisum sativum**, che mostrava caratteri facilmente distinguibili e discriminabili, era una pianta semplice da coltivare, poteva riprodursi anche per autofecondazione, e quindi rappresentava un ottimo e semplice modello sperimentale. Egli scrisse di aver valutato esperimenti effettuali su piante ornamentali per ottenere nuove varietà di colori grazie ad esperienze di fecondazione artificiale. Mendel formulò deduzioni di incontestabile rilievo basate sull'osservazione della regolarità della trasmissione dei caratteri ad ogni incrocio; inoltre tali dati, interpretati in chiave di leggi matematico-statistiche generali, gli permisero di ricavare informazioni sul meccanismo di trasmissione dei caratteri ereditari. Per condurre efficacemente le sue prove, Mendel selezionò le cosiddette **linee pure**, cioè popolazioni di soggetti che opportunamente incrociati tra loro, molte volte, mostravano sempre lo stesso carattere. Si trattava quindi di popolazioni omogenee per i caratteri analizzati. Le piccole variazioni che Mendel osservava in queste popolazioni pure furono interpretate come dovute alle capacità dell'ambiente di incidere o modulare la manifestazione dei caratteri. Egli evidenziò che all'interno di tali popolazioni, casualmente e sporadicamente si producevano delle variazioni capaci di affermarsi e diffondersi. Osservo anche che le caratteristiche del soma degli individui non hanno rilievo nella trasmissione ereditaria, mentre risulta fondamentale la natura e la qualità degli elementi. Ciò significa che se ad un individuo vegetale o animale che sia si amputa una parte del corpo questo non vuol dire che la prole sarà mancante di tale parte; mentre si può osservare che nel corso delle generazioni alcuni caratteri si manifestano con regolarità ed altrettanto frequentemente possono scomparire per poi riapparire in precise proporzioni. Con il suo operato sperimentale Mendel, senza rendersene conto, propose una delle più importanti teorie biologiche: i caratteri sono determinati da unità ereditarie che egli definì fattori o determinanti, portati dalle cellule germinali: un fattore dal granulo di polline, ed uno dalla cellula uovo. I fattori di Mendel, nel 1909 saranno denominati "geni" da Johanssen e successivamente per la loro valenza genetica "alleli". I determinanti costituiscono il **genotipo**, cioè la struttura genetica dell'organismo, mentre l'aspetto, cioè la manifestazione dei caratteri, costituiscono il **fenotipo**. Si tratta quindi della manifestazione dello stesso genotipo che risulta condizionata dall'ambiente, infatti, il fenotipo costituisce il prodotto di genotipo e fattori ambientali.

Caratteri singoli e la segregazione

Come si è detto, valorizzando il lavoro di Mendel, si giunse alla codifica delle ormai famose tre leggi che portano il suo nome e rappresentano la sintesi logica e scientifica delle numerose prove sperimentali cui si è fatto riferimento. Mendel denominava carattere quella condizione somatica osservata nella pianta e che oggi, è detta fenotipo; non sfugge infatti che il carattere che stiamo per seguire nella sua modalità di trasmissione, è uno soltanto: il carattere colore del fiore, nelle sue forme fenotipiche alternative, porpora e bianco. L'incrocio di *pisum sativum*, che differivano per il colore del fiore, cioè i parents, erano uno a fiore porpora ed uno a fiore bianco. Da tale incrocio indifferentemente se il polline utilizzato era della pianta con il fiore porpora o viceversa, Mendel ottenne dei sei semi, e quindi delle piante dette di prima generazione F1, filiale 1, tutte con il fiore porpora, cioè con uno soltanto dei caratteri dei parents. In pratica, nella prima generazione un carattere "domina" sull'altro, specificamente il colore porpora domina sul bianco, che non

compare perché rimane nascosto in tutti gli individui di F1. Mendel indicò il carattere fiore bianco come **recessivo**. Il fatto che il carattere bianco sia ritirato in questa generazione non vuol dire che sia stato eliminato, anche perché la F1 è costituita con certezza soggetti bastardi, cioè ibridi, perché derivano da individui entrambi puri ma con caratteri antagonisti. Infatti il 100% della F1 pur non manifestando il carattere bianco, non può non contenere in relativo “determinante”. In pratica le osservazioni mostravano che alcuni caratteri erano maggiormente rappresentati e si manifestavano con maggiore frequenza, e li chiamò **dominanti**. Per verificare ulteriormente la condizione di dominanza e soprattutto di recessività. Mendel incrociò gli individui della F1 tramite autofecondazione (per evitare possibili inquinamenti). La generazione così ottenuta, la filiale 2, F2, presentava piante con entrambi i caratteri, fiore porpora e fiore bianco presenti in rapporto statistico di $\frac{3}{4}$ ed $\frac{1}{4}$ (3:1), cioè il 75% della progenie mostrava il fenotipo dominante, mentre il 25% quello recessivo. Mendel proseguì le sue esperienze incrociando per autofecondazione ciascuno degli individui di F2 e dai risultati ottenuti (generazione F3) dedusse che:

- a) Tutte le piante con il carattere recessivo fiore bianco erano pure (se incrociate tra loro davano ancora fiori bianchi)
- b) $\frac{1}{3}$ delle piante con il fiore porpora, praticamente $\frac{1}{4}$ di tutti gli individui di F2, erano anch'esse pure.
- c) I rimanenti $\frac{2}{3}$, ovvero i $\frac{2}{4}$, cioè $\frac{1}{2}$ del totale di F2, non erano puri, tanto che, in seguito ad autofecondazione, producevano piante a fiore porpora e fiore bianco con il canonico rapporto di 3:1.

Caratteri ed assortimento indipendente

Oltre alle regole già illustrate, Mendel ne scoprì altre che, grazie ad incroci tra piante che differivano per due coppie di caratteri antagonisti condotti allo scopo di verificare se un carattere potesse influenzare o meno la manifestazione dell'altro. Tra questi incroci, possiamo per esempio, seguire la trasmissione dei caratteri, colore e forma del seme di *Pisum sativum*, incrociando due piante di linea pura, una con semi gialli e lisci, l'altra con semi verdi e rugosi. Mendel confermò la condizione del colore gialli su verde e della forma liscia su quella rugosa. Infatti, alla F1 egli ottenne 100% delle piante con semi gialli e lisci. Alla seconda generazione F2, derivante dall'incrocio di due individui di F1 ottenne piante attribuibili a quattro classi fenotipiche, indicando che i già noti fenotipi dei due caratteri considerati si distribuivano indipendentemente l'uno dall'altro. Così egli osservò: piante con semi gialli e lisci, gialli e rugosi, verdi e lisci, verdi e rugosi, che opportunamente valutate e quantizzate, mostravano un rapporto fenotipico rispettivamente di $\frac{9}{16}$, $\frac{3}{16}$, $\frac{3}{16}$, $\frac{1}{16}$, cioè 9:3:3:1. Ovviamente se valutato indipendentemente, il singolo carattere mostrava il canonico rapporto di $\frac{3}{4}$ a fenotipo dominante e $\frac{1}{4}$ a fenotipo recessivo. Mendel con grande intuito spiegò (in un periodo in cui non era stata neanche ipotizzata la meiosi) che i risultati ottenuti con riferimento a quei fattori dovevano essere regolati nei gameti e che, tramite essi, si trasmettono ad ogni generazione.

Esperienze mendeliane ieri ed oggi

Da diversi studi emerge un parallelismo tra il comportamento dei cromosomi e la trasmissione dei caratteri ereditari, facendo così nascere la supposizione che cromosomi e caratteri ereditari fossero tra loro correlati. Nel 1903 W.S. Sutton propose insieme a Boveri, la *teoria cromosomica dell'ereditarietà*. Secondo questa teoria ciascun carattere mendeliano ha una localizzazione fisica in un punto specifico di un cromosoma detto **locus**; nelle cellule degli organismi diploidi esistono due copie dei cromosomi

(cromosomi omologhi), una di origine materna ed una di origine paterna, che sono appunto caratterizzate dall'aver la stessa sequenza di loci genetici. Non vi è dubbio che organismi uni- o pluricellulari e le loro singole cellule trasmettono da una generazione alla successiva geni la cui natura molecolare è stata già precedentemente illustrata così come il loro funzionamento e la loro espressione. I meccanismi di base che consentono di trasferire i caratteri attraverso le generazioni sono insiti nei processi di divisione cellulare, ed ovviamente, in quelli della duplicazione del DNA, della trascrizione e della traduzione. Di non inferiore interesse per la trasmissione ereditaria sono i meccanismi delle mutazioni, eventi, questi che portano a diversificare le informazioni codificate nel genoma di ciascuna cellula, nonostante molteplici siano le strategie adottate per evitare che durante la trasmissione i messaggi vengano alterati. Per quanto attiene agli incroci effettuati da Mendel e precedentemente illustrati possiamo considerare che la linea (o ceppo) è un'espressione riferita ad un gruppo di soggetti con sottofondo genetico simile; un analogo gruppo di individui è definibile linea pura quando presentano tutti una stessa caratteristica fenotipica che si manifesta in maniera identica nella progenie in quanto hanno tutti una identica costituzione genetica. Nel singolo individuo poi, per ciascun carattere esistono due fattori mendeliani, oggi diciamo due copie di geni allelomorfi o più semplicemente **alleli**, che rappresentano le forme alternative di uno stesso gene. Ogni coppia di caratteri antagonisti è rappresentata da una coppia di alleli e ciascun individuo possiede due alleli che sono localizzati in loci corrispondenti dei cromosomi omologhi. Mendel, per descrivere l'ereditarietà dei caratteri, ne indicava i relativi fattori con una lettera dell'alfabeto; questo simbolo rimane oggi quello più utilizzato: infatti per motivi operativi, una lettera maiuscola rappresenta l'allele dominante, mentre la stessa lettera minuscola indica l'allele recessivo. Gli individui appartenenti alla linea pura con due copie uguali di alleli (AA o aa) sono detti **omozigoti** e producono una sola classe di gameti. Ovviamente si tratta di due linee, una costituita da soggetti con il fenotipo recessivo, quindi detta omozigote recessiva, ed un'altra costituita da soggetti con fenotipo dominante, detta omozigote dominante. Ancora, nell'incrocio detto **monoibrido** o **monofattoriale**, perché si realizzi tra soggetti in cui si segue un solo carattere con fenotipi antagonisti ed è dettato da una sola coppia di alleli, tutti i prodotti, cioè tutti gli individui di F₁, sono con genotipo **eterozigote** (Aa). Infatti i parents producono diverse classi di gameti che sono rispettivamente (A) e (a). Analogamente nell'incrocio tra soggetti che differiscono per due caratteri, ciascuno con due forme alternative, tutti gli individui della F₁ sono con genotipo doppio eterozigote (AaBb) in quanto derivano da linee pure entrambe doppie omozigote. Nel tempo, i genetisti hanno cercato di standardizzare la simbologia dei genotipi, infatti si preferisce, per esempio, scegliere tra le lettere dell'alfabeto quella della iniziale del fenotipo recessivo del carattere considerato. Inoltre si può aggiungere alla lettera iniziale del fenotipo recessivo il segno (+) o (-) per indicare rispettivamente l'allele per il fenotipo dominante o recessivo. Per i caratteri che fanno riferimento ad attività metaboliche, si usano spesso simboli che richiamano il valore del gene cui si aggiungono il segno + o - a seconda se il prodotto genico è presente o meno. Per calcolare le frequenze genotipiche attese da uno specifico incrocio, si può costruire il **quadrato di Punnett**, un semplice strumento di rappresentazione grafica delle possibili combinazioni degli alleli nei gameti; in pratica si tratta di una griglia dove sono inseriti i genotipi che derivano dall'incrocio in esame da cui è possibile dedurre i corrispondenti fenotipi.

Leggi di Mendel

Prima legge – **legge della dominanza** – tutti i soggetti di F₁, prodotti dall'incrocio di due individui parentali di linea pura, che differiscono per un carattere e mostrano cioè due fenotipi alternativi, presentano solo uno dei due caratteri (fenotipo) che viene detto dominante (sono tutti geneticamente ibridi). La forma alternativa che rimane latente è detta recessiva. In proposito, i termini dominante e recessivo si riferiscono

ai caratteri, cioè ai fenotipi, e non ai geni, anche se, nelle comuni espressioni, tali aggettivazioni sono riferite anche ad alleli.

Seconda legge – **legge della segregazione o della disgiunzione dei caratteri** – i soggetti della prima generazione F1 incrociati tra loro producono una progenie in cui compaiono entrambi i fenotipi parentali. La valutazione statistica di tali classi fenotipiche indica un rapporto costante di 3:1 per il dominante sul recessivo; mentre l'analisi attenta dimostra che la costituzione genetica corrisponde a tre classi di genotipi, nel rapporto di 1:2:1 rispettivamente relative ad individui con fenotipi: dominante puro, dominante ibrido e recessivo.

Terza legge – **legge della indipendenza o della segregazione indipendente dei caratteri** – nell'incrocio di due soggetti che differiscono per due caratteri (due coppie di fenotipi), ciascuno di essi viene trasmesso ed ereditato indipendentemente l'uno dall'altro. Nella progenie, infatti, i caratteri compaiono in tutte le possibili combinazioni in quanto le due coppie di alleli risiedono su due diverse coppie di cromosomi omologhi.

Durante la gametogenesi, la meiosi, che prevede la regolare ripartizione dei cromosomi omologhi, farà sì che con essi si separino gli alleli determinando la loro segregazione indipendente nei gameti. Le quattro classi fenotipiche ottenute dall'incrocio già illustrato appaiono nelle quantità indicate nel rapporto 9:3:3:1 in sedicesimi, perché ciascun soggetto di F1, doppio eterozigote, può produrre quattro classi di gameti, e tali gameti possono produrre 16 diverse combinazioni alleliche. Quando due o più eventi sono indipendenti la probabilità che entrambi si verifichino congiuntamente è pari al prodotto delle singole probabilità (probabilità combinata). Quando invece due o più eventi si escludono a vicenda, la probabilità che o l'uno o l'altro si verifichi è pari alla somma delle singole probabilità. Dunque nell'esempio della trasmissione dei caratteri colore e forma del seme di *Pisum sativum* i caratteristici rapporti fenotipici ottenuti nella F2 derivano dalle seguenti possibilità:

$$\frac{1}{16} GGLL + \frac{2}{16} GGLl + \frac{2}{16} GgLL + \frac{4}{16} Gg Ll = \frac{9}{16} \text{ semi gialli e lisci}$$

$$\frac{1}{16} GGll + \frac{2}{16} gg Ll = \frac{3}{16} \text{ semi verdi e rugosi}$$

$$\frac{1}{16} GGll + \frac{2}{16} Gg ll = \frac{3}{16} \text{ semi gialli e rugosi}$$

$$\frac{1}{16} gg ll = \frac{1}{16} \text{ semi verdi e rugosi}$$

Caratteri mendeliani e reincrocio

Regolarità e modalità di trasmissione annotate da Mendel sono state confermate in tutti gli organismi viventi evidenziandone il relativo valore, grazie ad un numero elevato di prove sperimentali condotte in diversi modelli, tra cui il granturco, tabacco, funghi, insetti e mammiferi. Ovviamente anche nella specie umana sono stati identificati molti caratteri a trasmissione mendeliana. Come esempio appare opportuno qui illustrare la trasmissione, anche nei mammiferi, di qualche carattere comune che, ovviamente, i ricercatori hanno scelto tra i più evidenti, lavorando su cavie che **possono** essere facilmente stabulate ed allevate oltre che osservate. Possiamo seguire il carattere colore del manto del topo che è distinguibile nei due fenotipi alternativi: grigio e bianco. L'incrocio fra parents di linea pura, uno con manto grigio ed uno con manto bianco, darà origine ad una F1 in cui il 100% degli individui sarà pigmentato, avrà cioè il colore del pelo grigio. Nella seconda generazione F2 si otterranno le due classi fenotipiche dei parents, manto grigio e manto bianco, nei classici rapporti mendeliani di 3:1. Il fenotipo manto bianco, comunque, ricompare alla F2 soltanto in quel 25% degli individui che sono omozigoti per l'allele corrispondente. Identico andamento si può evidenziare nel caso di analoghi caratteri posseduti da altri animali come, per esempio, la lunghezza del pelo nei roditori. Per quanto è stato illustrato, risulta sufficientemente semplice seguire la trasmissione di caratteri mendeliani nei vegetali, soprattutto dove è possibile attuare l'autofecondazione, ma non è possibile fare altrettanto nelle specie non auto fecondabili e negli animali. Per sempio, se si volesse indagare sulla natura genotipica dei soggetti a manto grigio della F2, procedendo con la metodologia di Mendel, che incrociava individui di F2 con il fenotipo dominante, avremmo certamente molti problemi per distinguere quali tra di essi sono omozigoti e quali eterozigoti, perché certamente dovremmo incrociare a caso i topi grigi e quindi avremmo vari tipi di possibili combinazioni e risultati fenotipici non uniformi. Pertanto, in questi casi, si utilizza un semplice test di analisi genetica detto *incrocio di prova* o più comunemente **reincrocio o test cross**. Tramite questa procedura infatti, sarà possibile identificare con certezza se un individuo con fenotipo dominante ha genotipo omozigote o eterozigote. L'analisi consiste nell'incrociare il soggetto da testare, cioè con fenotipo dominante, con uno a fenotipo recessivo (nell'esempio precedente topi con il manto grigio X topi albini). L'interesse e l'efficienza del reincrocio stanno proprio nel fatto che siamo certi che i topi albini produrranno soltanto una classe di gameti, in quanto omozigoti, e quindi l'eventuale contributo genetico fornito dal topo con fenotipo dominante sarà subito manifestato. Ne consegue che i risultati attesi possono essere di due tipi: se il topo grigio in esame è omozigote, produrrà una sola classe di gameti contenente l'allele dominante per il colore e dunque nasceranno tutti topi con il manto grigio e tutti saranno eterozigoti. Al contrario, se il topo con il manto grigio è eterozigote si otterranno sia topi con fenotipo dominante grigio che topi con fenotipo recessivo, rispettivamente eterozigoti ed omozigoti recessivi.

La genetica oltre Mendel

Mendel ricevette la dovuta attenzione soltanto molti anni dopo la sua morte, ma in seguito alla riscoperta del suo lavoro molti ricercatori verificarono i principi da lui affermati estendendo le ricerche a molti organismi. Non sempre i risultati sperimentali apparivano coerenti con principi mendeliani. Non tutti i caratteri ereditari, infatti, rientrano nel principio secondo cui un fenotipo è specificato da un solo fattore, un gene, di cui esistono due alleli: uno per il fenotipo dominante ed uno per il fenotipo recessivo. Esistono quadri ereditari più complessi; la maggior parte dei fenotipi riflette l'azione di più geni, il fenotipo può essere determinato da alleli che non consentono una completa dominanza, così come può risentire di influenze che derivano dall'ambiente. Certamente le modalità di trasmissione stigmatizzate nelle leggi di Mendel rappresentano la base nella meccanica della ereditarietà ed ormai si fondano su solidi dati e

principi della biologia cellulare e molecolare; però i fenomeni che regolano il comportamento dei geni e dei cromosomi risultano molto più complicati ed interconnessi di quanto non si potrebbe dedurre dai risultati degli incroci mendeliani. Per questo le eccezioni sono molto frequenti.

Dominanza incompleta

Si è già detto che nel classico incrocio mendeliano tra piante di pisello a fiori porpora e piante a fiori bianchi di linea pura, la generazione F1 è costituita da piante tutte con il fenotipo dominante fiori porpora, mentre alla generazione F2 il 75% delle piante ottenute mostra i fiori porpora ed il restante 25% fiori bianchi. Anche la comune pianta da giardino della bocca di leone, e la altrettanto diffusa *bella di notte* presentano fiori rossi e bianchi. Tuttavia se si incrociano piante di linea pura con i due fenotipi alternativi, cioè i fiori rossi X i fiori bianchi nella generazione si ottiene il 100% di piante con i fiori rosa. La presenza di fiori con una colorazione intermedia potrebbe dapprima far pensare ad una ereditarietà che produce una miscela di pigmenti; quando però si attua l'autofecondazione di tali individui, nella F2 ricompaiono per un 25% piante con fiori rossi, altro 25% con fiori bianchi e 50% con fiori rosa nei relativi rapporti genotipici 1:2:1. Questo significa che non vi è stata mescolanza, le informazioni rimangono separate e inalterate, ma comunque non viene confermata la completa dominanza e quindi la relativa legge di Mendel: a differenza di quanto affermato da Mendel il fenotipo degli eterozigoti non è uguale a quello degli omozigoti dominanti, risulta invece intermedio fra i fenotipi dei due omozigoti. Tale condizione è piuttosto diffusa anche in altre specie, come per esempio nei polli di razza andalusa, o nel caso del cavallo detto "palomino" che ha corpo giallo e dorato e criniera e coda bianche. Questi cavalli non sono linee pure, infatti, quando incrociati fra loro producono una progenie costituita per $\frac{1}{4}$ da "cremello"; $\frac{1}{2}$ di palomino, e $\frac{1}{4}$ con corpo castano chiaro. La legge della dominanza, quindi, appare non categorica in quanto la dominanza può essere più o meno completa, come nei casi appena citati, in cui i caratteri si dicono a **dominanza incompleta** e la loro modalità di trasmissione **eredità intermedia**; in questo caso, nell'ibrido, si esprime l'allele dominante determinando la colorazione intermedia che consente la netta distinzione tra eterozigoti ed omozigoti. Da tutto questo si deduce che non possiamo considerare come fondamentale e sempre valida la legge della dominanza, anche perché il fenotipo è frutto di modulazione della capacità espressiva del gene. È per questo che ormai si preferisce denominare la prima legge di Mendel come la **legge dell'uniformità degli ibridi** piuttosto che della dominanza.

Codominanza

Si è appena detto che non tutte le forme alleliche alternative esprimono un fenotipo pienamente dominante o pienamente recessivo. Un'ulteriore eccezione al principio della dominanza si verifica quando due alleli si esprimono in eguale misura, producendo un fenotipo rappresentativo di entrambi gli omozigoti; in questa situazione i due alleli, o meglio i loro prodotti, sono funzionalmente indipendenti l'uno dall'altro. Questa condizione è indicata con il termine di **codominanza** ed i due alleli sono detti **codominanti**. In questo caso è riconoscibile a livello fenotipico l'espressione di ciascun allele, che si verifica compiutamente e contemporaneamente. Tra gli esempi di codominanza possiamo citare il carattere screziatura nelle golie di trifoglio bianco come pure per alcuni caratteri ereditari umani, quali alcuni sistemi di gruppi sanguigni come ABO e MN. Per questa condizione di codominanza in genere nella rappresentazione formale dei genotipi, si preferisce utilizzare un particolare simbolismo che prevede una lettera dell'alfabeto maiuscola che indica il locus ed al suo apice un simbolo per specificare l'allele, per esempio R1 e R2, facendo riferimento ad un ipotetico locus R nelle due forme alleliche relative 1 e 2. Da un punto di vista molecolare, sia nel caso della dominanza completa che incompleta **l'allele recessivo non viene utilizzato**. L'unico prodotto sintetizzato è quindi quello codificato dall'allele dominante. Si produrrà, quindi, **metà della dose**

di questo prodotto genico rispetto a quella che si sarebbe prodotta nel caso di un omozigote dominante. Se questa dose è sufficiente per produrre macroscopicamente il carattere dell'omozigote dominante si parlerà di **dominanza completa, ed il gene sarà definito aplosufficiente**. Se invece la dose dimezzata non è in grado di mostrare macroscopicamente il fenotipo dell'omozigote dominante, si parlerà di **dominanza incompleta e di gene aploinsufficiente**.

TRENTADUESIMA LEZIONE: IL LINKAGE E L'ESPERIENZA DI MORGAN

Gli studi dei primi del '900 e la correlazione tra cromosomi e trasmissione dei caratteri determinarono difficoltà per alcuni genetisti seguaci di Mendel. Il numero esiguo di cromosomi presenti nelle cellule di specie diverse era in contrasto con la segregazione indipendente dei numerosi caratteri studiati. Ben presto, risultò evidente che ogni cromosoma dovesse contenere l'informazione per più caratteri o se vogliamo, dovesse contenere più loci genici. Questa ipotesi implica una concatenazione fisica di tutti i loci che si trovano sullo stesso cromosoma. Al contrario gli esperimenti di Mendel affermavano la segregazione indipendente dei caratteri ereditari. Per interpretare i risultati degli esperimenti di Mendel esistevano quindi due possibilità: i cromosomi si frammentavano durante la meiosi permettendo una segregazione indipendente di ciascun carattere oppure i geni dei caratteri presi in considerazione da Mendel si trovavano su coppie diverse di cromosomi. Sempre tra i primi del '900 era opinione comune che i cromosomi mantenessero la loro integrità strutturale durante i processi di divisione cellulare che nel frattempo venivano indagati ed interpretati. Ci si attendeva che gli alleli dei loci presenti sullo stesso cromosoma segregassero tutti insieme durante la meiosi, o come si dice comunemente, fossero associati (o **concatenati, in linkage**). Per stabilire se i caratteri specificati da loci che giacciono sullo stesso cromosoma segregano insieme fu necessario effettuare studi seguendo la metodologia mendeliana. Grazie al lavoro di Bateson e Punnett furono fatti molti esperimenti. I due ricercatori incrociarono linee pure di piante di pisello che differivano contemporaneamente per due caratteri: il colore dei fiori e la lunghezza dei grani di polline lunghi con piante con fiori bianchi e grani di polline corti. Nella generazione F_1 i ricercatori ottennero tutte piante a fiori rossi con grani di polline lunghi confermando che questi fenotipi erano dominanti; praticamente il 100% di questi individui erano doppi eterozigoti, e quindi per ciascuno dei caratteri la singola dose allelica per il fenotipo fiori rossi e grani di polline lunghi ne consente la manifestazione. Nella generazione F_2 ottenuta per autofecondazione dalle piante di F_1 ci saremmo aspettati le quattro classi fenotipiche le rapporto 9:3:3:1 come descritto da Mendel. Sorprendentemente i ricercatori ottennero sì quattro classi fenotipiche, ma non nei rapporti attesi in base alla legge della segregazione indipendente: i due fenotipi parentali sono più frequenti dell'atteso, mentre i fenotipi che risultano essere una ricombinazione di linee pure sono meno frequenti dell'atteso. Questo poteva avere due spiegazioni alternative: i genotipi relativi ai fenotipi ricombinati avevano una ridotta vitalità, oppure i due geni erano localizzati sullo stesso cromosoma e quindi gli alleli presenti su un omologo segregavano insieme durante la prima divisione meiotica. Studi successivi hanno confermato la validità della seconda ipotesi e cioè che questi due caratteri sono specificati da geni che si trovano sullo stesso cromosoma (sono associati) per questo motivo gli alleli che determinano il colore del fiore e la lunghezza del polline segregano insieme durante la meiosi. I caratteri ed i relativi alleli pertanto vengono detti associati, o in linkage o linked. Bisogna ancora notare che in questo esperimento oltre ai cromosomi parentali si otteneva un certo numero di cromosomi che per effetto del crossing over erano ricombinanti, proprio per questo si evidenziavano i corrispondenti fenotipi scambiati rispetto ai parentali, fenotipi meno frequenti che sono quindi dei ricombinanti (crossovers). Un impulso fondamentale a queste linee di ricerca venne dato dagli studi di T.H. Morgan, il quale, studiando il moscerino della frutta *D. Melanogaster*, riuscì a dimostrare l'esistenza dell'associazione ed identificare la localizzazione cromosomica di una serie di caratteri. La

Drosophila infatti ha rappresentato e rappresenta un ottimo materiale di studio per i genetisti. Essa possiede solo quattro coppie di cromosomi e sono state identificate e localizzate centinaia di alleli. Per i suoi esperimenti più significativi, Morgan utilizzò delle linee di Drosophila in cui variavano i caratteri dimensione delle ali e colore del corpo che sono specificati da due coppie di alleli. L'espressione di una di queste regola lo sviluppo delle ali, che potrebbero essere lunghe o vestigiali ali, mentre l'altra coppia allelica regola la pigmentazione del corpo che apparirà di colore grigio o nero. Nelle esperienze che divennero fondamentali per l'interpretazione della modalità di trasmissione dei caratteri associati, Morgan con abile scelta sperimentale, utilizzò soggetti di Drosophila che presentavano una particolare combinazione fenotipica: infatti incrociò parents di linea pure di Drosophila l'uno con il fenotipo ali vestigiali (mutante, allele v) e corpo grigio (selvatico, allele B) e l'altro con ali lunghe (selvatico, allele V) e corpo nero (mutante, allele b). alla prima generazione filiale ottenne tutti i moscerini con ali lunghe e corpo grigio, manifestavano cioè fenotipi dominanti per entrambi i caratteri ed ovviamente erano tutti eterozigoti, anzi doppi eterozigoti. Non vi è dubbio infatti, che essendo i parents delle linee pure, ciascuno di essi doveva essere doppio omozigote, ma per ciascuno di essi si trattava di omozigote dominante per un carattere e recessivo per l'altro. Questo risultato, pur evidenziando la qualità degli alleli e dei relativi fenotipi negli individui di F1, era insufficiente per dimostrare se essi risiedevano su coppie diverse di cromosomi omologhi o sulla stessa coppia (quindi capire se potevano andare incontro a segregazione indipendente nel primo caso o essere segregati insieme nel secondo). Per intraprendere quale fosse la reale condizione di trasmissibilità dei due caratteri Morgan decise di re-incrociare i soggetti della generazione F1 : realizzò cioè il saggio del re-incrocio (test cross) tra un moscerino di maschio di F1 ed una femmina con fenotipo recessivo per entrambi i caratteri, ali vestigiali e corpo nero, ovviamente doppio omozigote recessivo e in grado quindi di produrre una sola classe di gameti. Da questo incrocio, in base alla legge della segregazione indipendente ci saremmo aspettati la comparsa di quattro classi fenotipiche con la stessa frequenza $\frac{1}{4}$ di progenie con ali vestigiali e corpo grigio, $\frac{1}{4}$ di progenie con ali lunghe e corpo nero, e $\frac{1}{4}$ con ali lunghe e corpo grigio, e $\frac{1}{4}$ con ali vestigiali e corpo nero, le prime due classi fenotipiche parentali e le ultime due ricombinanti. Invece si ottennero esclusivamente le due classi fenotipiche parentali, cioè ali vestigiali, corpo grigio e ali lunghe corpo nero nel rapporto di 1:1. Questo risultato fu correttamente interpretato da Morgan come dimostrazione di una concatenazione fisica tra i geni responsabili dei due caratteri. Quindi il maschio aveva prodotto solo due classi di gameti con uguale frequenza Vb e vB. Indagando sulla trasmissione dei citati caratteri Morgan fece ulteriori esperimenti, in particolare effettuò un re-incrocio tra una Drosophila di F1 (doppio eterozigote), questa volta femmina, con un maschio ali vestigiali e corpo nero, ovviamente doppio omozigote recessivo, quindi in grado di produrre una sola classe di gameti vb. Da tale re-incrocio Morgan ottenne classi fenotipiche che sembrarono eccezioni all'associazione già descritta quando non capaci di mettere in crisi l'interpretazione dei risultati su riportati. Nella generazione filiale derivante dal re-incrocio su citato comparvero, infatti, oltre ai fenotipi parentali, anche due gruppi di individui con i caratteri ricombinati; le quattro classi fenotipiche però non comparivano con la stessa frequenza escludendo così la possibilità di assortimento indipendente. In particolare si ottennero: due fenotipi parentali, ali vestigiali e corpo grigio; e ali lunghe e corpo nero per il 41,5% per ciascuno, e due fenotipi ricombinanti, ali lunghe corpo grigio, ali vestigiali corpo nero per l'8,5% per ciascuno. Tali risultati si possono spiegare solo se si accetta l'ipotesi che i geni sono associati: le coppie di alleli risiedono su una stessa coppia di cromosomi omologhi e vengono segregati in linkage. Infatti si ottengono con elevata frequenza due classi fenotipiche che sono identiche ai progenitori, mentre le due classi con i fenotipi scambiati derivano da crossing over, sono cioè individui formati da gameti i cui cromosomi si sono ricombinati. Bisogna precisare che il crossing over, che in Drosophila porta allo scambio degli alleli che determinano i due caratteri lunghezza delle ali e colore del corpo è del tutto particolare: sembra che esso si determini regolarmente durante l'ovogenesi e

sia assente durante la spermatogenesi. Morgan, oltre a contribuire alla dimostrazione dell'associazione genica fu il primo a stabilire l'attribuzione cromosomica di un carattere; i suoi esperimenti iniziarono con l'individuazione di un mutante di *Drosophila* che presentava gli occhi di colore bianco anziché del normale colore rosso. Morgan osservò che incrociando femmine omozigoti con occhi rossi con maschi con occhi bianchi alla generazione F1 otteneva come atteso vista la dominanza dell'allele che specifica per gli occhi rossi, una progenie di maschi e femmine tutti con gli occhi rossi. Quando faceva incrociare tra loro gli individui della generazione F1 otteneva una F2 dove era comunque rispettato il rapporto fenotipico di 3:1, ma sorprendentemente tutte le femmine avevano occhi rossi, mentre la progenie maschile era per il 50% con occhi rossi ed il rimanente 50% era con occhi bianchi. Poi era già noto che il moscerino della frutta possiede tre coppie di autosomi ed una coppia di cromosomi sessuali, Morgan correttamente concluse che, considerata la differente trasmissione nei maschi e nelle femmine, l'allele che specificava la variante per il carattere colore degli occhi doveva trovarsi sul cromosoma X. Solo in questo modo si sarebbe spiegato il differente comportamento di questo carattere nei maschi e nelle femmine. Infatti, nella generazione F1 tutte le femmine sono eterozigoti w^+/w e manifestano il fenotipo dominante occhi rossi, mentre i maschi possiedono solo un cromosoma X ereditato dalla madre e quindi sono tutti wild type. Nella F2, invece, le femmine ereditano un cromosoma X dal padre e quindi quello che porta l'allele che determina gli occhi rossi mentre dalla madre possono ereditare per il 50% quello wild type e per il rimanente 50% quello che specifica per la variante occhi bianchi. Poiché il fenotipo occhi bianchi (w) è recessivo rispetto al fenotipo occhi rossi (w^+), nessuna femmina mostra il fenotipo occhi bianchi essendo esse o omozigoti wild type o eterozigoti. I maschi, invece, possedendo l'unico cromosoma X ereditato dalla madre, possono con una probabilità del 50% ereditare il wild type o quello mutato. Questo spiega perché la progenie è composta da individui con fenotipo occhi bianchi per un 50% e fenotipo occhi rossi per il rimanente 50%. Una ulteriore conferma venne dai risultati degli incroci reciproci. Morgan incrociò infatti femmine con occhi bianchi e maschi con occhi rossi. Se si fosse trattato di caratteri autosomici, si sarebbero dovuti avere gli stessi risultati dell'incrocio precedente. Al contrario, nelle F1 si ottenne una progenie composta da maschi con occhi bianchi e femmine con occhi rossi. Sfruttando queste differenze nella espressione dei caratteri specificati da geni localizzati sul cromosoma X, Morgan riuscì ad individuare un certo numero di caratteri definiti **associati al sesso**, fisicamente localizzati sul cromosoma X. Tutti i caratteri specificati da geni che si trovano sulle regioni non omologhe del cromosoma X hanno questa particolare modalità di espressione detta **diagnica**, cioè il carattere si trasmette tramite le femmine. Queste, se si tratta di alleli mutati, non manifestano il tipo recessivo corrispondente, e per questo sono dette portatrici, invece tale fenotipo si esprimerà nei figli maschi. Morgan realizzò un innumerevole quantità di incroci considerando altri mutanti di *Drosophila* per caratteri legati al sesso; tra questi, per esempio, oltre al gene che determina il colore dell'occhio identificò quello che determina la grandezza delle ali (m miniature, ali vestigiali). Morgan incrociò una femmina occhio bianco, ali vestigiali (wm/wm) con un maschio selvatico occhi rossi e ali selvatiche (WM/Y) analizzandone la progenie. Il numero di genotipi ricombinanti risultò inferiore rispetto a quanto atteso in base alla legge della segregazione indipendente dimostrando ancora l'esistenza di un linkage. Questo gruppo di geni ha costituito storicamente il primo gruppo di associazione (gruppo di geni che alla meiosi tendono a segregare insieme, poiché fisicamente vicini sullo stesso cromosoma) che è stato possibile individuare in *Drosophila*. Studi successivi hanno permesso di comprendere che in *Drosophila* i caratteri possono essere suddivisi in 4 differenti gruppi di associazione (tanti quante sono le coppie di cromosomi omologhi individuati mitologicamente).

TRENTATRESIMA LEZIONE: Spermatogenesi Ovogenesi, variabilità, mutazioni germinali o somatiche e mutazioni spontanee o indotte. Mutazioni puntiformi, cromosomiche, genomiche.

La riproduzione sessuata o gamica prevede la fusione di due cellule speciali: i **gameti**, uno maschile ed uno femminile. I gameti possono essere prodotti da due individui diversi (specie **gonocoriche**) o dallo stesso individuo (specie **ermafrodite**) ma devono essere necessariamente aploidi (n) in modo che con la fusione dei patrimoni genetici derivanti dai due genitori si possa restaurare il numero diploide ($2n$) di cromosomi che è tipico della specie di appartenenza. L'assortimento indipendente ed il crossing over garantiscono la variabilità. Con il termine **gametogenesi** si intende l'insieme dei processi che portano alla formazione dei gameti **spermatozoo e cellula uovo**. Le cellule interessate a questo processo sono quelle della linea germinale che sono responsabili della continuità della specie. Il momento cruciale della produzione dei gameti è quello in cui si verifica la riduzione del contenuto cromosomico: si passa cioè dalla condizione di diploidia a quella di aploidia. Definiamo: **diploide** ($2n$) una cellula che contiene coppie di cromosomi omologhi: un set di origine paterna ed uno di origine materna (i cromosomi omologhi contengono geni per gli stessi caratteri che possono esprimersi in modo diverso: alleli); **apolide** (n) una cellula che contiene un rappresentante di ciascuna coppia di omologhi. Nel caso di cellule umane il cariotipo è di 46 cromosomi, o 23 coppie di omologhi (22 coppie di autosomi ed una coppia di cromosomi sessuali XX o XY); nei gameti umani saranno quindi presenti 23 cromosomi dei quali 22 autosomi ed un cromosoma sessuale X o Y.

Tre sono i momenti fondamentali della produzione dei gameti:

- Formazione delle cellule germinali primordiali (PGC)
- Migrazione delle PGC nell'abbozzo delle gonadi
- Formazione dei gameti e controllo ormonale

Origine delle cellule della linea germinale

In alcuni organismi le cellule della linea germinale sono precocemente distinguibili da quelle della linea somatica ed i precursori dei gameti, le cellule germinali primordiali, non originano nelle gonadi, ma altrove e migrano nelle creste genitali che daranno origine alle gonadi. È quindi con la colonizzazione delle creste genitali da parte delle PGC che comincia il processo di gametogenesi.

Qual è l'evento che determina, durante lo sviluppo, la comparsa di cellule che saranno poi deputate alla formazione di gameti? La determinazione delle cellule germinali può essere dovuta a fattori interni alle cellule stesse, quindi determinanti citoplasmatici, oppure ad interazioni con cellule vicine. Nel primo caso, la futura cellula germinale conterrà il "plasma germinale" costituito da specifiche proteine e RNA messaggeri. Un'ipotesi, denominata del "genoma inerte" suggerisce che una cellula diventa germinale perché in qualche modo le viene impedito il differenziamento. Probabilmente quindi il ruolo del "plasma germinale" sarebbe quello di inibire il differenziamento. Nei mammiferi manca il plasma germinale, quindi la determinazione è dovuta ad interazioni con altre cellule. In particolare, nell'embrione di topo, sono le cellule dell'epiblasto che, opportunamente stimulate, diventano precursori delle cellule germinali. Cominciano a migrare 7,5 giorni post coitum verso le creste genitali destra e sinistra. Undici giorni dopo la fecondazione si osserva la colonizzazione delle creste da parte delle PGC che nel frattempo si sono moltiplicate. Sono stati identificati due geni, **fragilis** e **stella** che pare siano coinvolti nella determinazione delle cellule germinali. Il primo, **fragilis**, codifica una proteina transmembranaria, che però viene espressa anche in alcuni tipi di cellule somatiche; il secondo sembra invece specifico per le cellule germinali ma il ruolo svolto dalla proteina **stella**, che ha natura fortemente basica, non è ancora stato definito. Nei

mammiferi è stato identificato un altro gene la cui espressione varia con lo sviluppo. Si tratta del gene **otc4**, che codifica un fattore di trascrizione; questo inizialmente durante la segmentazione è espresso in tutti i blastomeri, ma la sua espressione si restringe a poche cellule, quelle che poi diverranno tutte germinali, durante la gastrulazione. La proliferazione delle PGC è indotta dal fattore delle cellule staminali, kit ligand, che è un fattore di crescita necessario anche per la proliferazione dei melanoblasti e dei precursori delle cellule emopoietiche. Esso è prodotto dalle cellule che costituiscono il sentiero di migrazione sul quale le PGC passeranno per raggiungere la loro destinazione finale. In mancanza del kit ligand o del suo recettore c-kit, non si formano cellule germinali così come verranno a mancare melanociti ed elementi del sangue.

Come fanno le cellule PGC a raggiungere la meta? Chi o cosa indica loro la via da seguire? Pare che il percorso da seguire sia indicato da fibronectina. Infatti PGC che non producono le integrine, che sono i recettori per la fibronectina, non sono in grado di migrare. Pare inoltre, che almeno nel topo, le creste genitali producano una sostanza in grado di attrarre le PGC, si tratta di una proteina simile al TGF (transforming growth factor). Nei mammiferi non esiste un vero e proprio plasma germinale, per cui la determinazione delle cellule germinali è indotta nell'embrione. In tempi recenti è stato possibile marcare con sostanze fluorescenti le PGC nel topo e seguire quindi il percorso che esse compiono. Nell'uomo le PGC, caratterizzate da una marcata positività alla fosfatasi alcalina all'inizio della terza settimana di sviluppo si trovano nell'endoderma del sacco vitellino, dove comincia un'intensa attività proliferativa. Intorno alla 5a settimana esse migrano verso le creste genitali. In questa sede le PGC si associano alle cellule mesodermiche che derivano dall'epitelio celomatico e formano i **cordoni sessuali** primitivi delle gonadi indifferenziate. Si parla di gonade indifferenziate anche se l'embrione ha già il suo sesso genetico determinato ed è impossibile controllarlo con la tipizzazione del cariotipo. Lo sviluppo delle gonadi merita un discorso a parte: si discosta, infatti molto da quello di tutti gli altri organi, potendo, a partire da una gonade indifferenziata, ottenersi un testicolo oppure un ovario indipendentemente dal sesso genetico.

Differenziamento delle gonadi

Nei maschi entro l'ottava settimana si verificano alcune modificazioni che porteranno alla formazione del testicolo. I cordoni sessuali si insinuano profondamente nel mesenchima in posizione centrale o midollare. Si osserva un'intensa attività proliferativa dei cordoni che poi si fondono a formare una rete di cordoni sessuali interni e all'estremità distale la **rete testis**, più sottile. Al termine del processo i cordoni perdono il contatto con l'epitelio esterno in seguito alla formazione di un sottile strato di matrice extracellulare, la **tonaca albuginea**. All'interno dei cordoni si trovano le cellule germinali che possono proliferare ma non possono cominciare la meiosi. Fino alla pubertà questi cordoni risultano pieni; con la pubertà si osserva la loro cavitazione. Si formano così i tubuli seminiferi e le cellule germinali cominciano a produrre gli spermatozoi. Gli spermatozoi, attraverso la rete testis, raggiungono i **dotti efferenti**, che confluiscono prima nell'**epididimo** e poi nel **dotto deferente**, raggiungendo quindi l'**uretra** ed infine l'esterno del corpo. Con lo sviluppo dello scomparto germinativo del testicolo, le cellule mesodermiche, che si erano associate alle PGC, si differenziano in **cellule del Leydig**. Queste cellule sono localizzate nello scompartimento interstiziale, il tessuto presente fra i tubuli, e producono il **testosterone**. Le cellule dei cordoni testicolari si differenziano in **cellule del Sertoli** che, secernendo l'ormone antimulleriano, favoriscono il riassorbimento del **dotto di Müller**. Nelle femmine, le cellule germinali si trovano posizionate verso la superficie esterna della gonade indifferenziata. Esse si organizzano in cordoni sessuali che restano però in tale posizione e per questo sono detti **cordoni sessuali corticali** mentre quelli presenti nella zona centrale degenerano. Le cellule germinali femminili entrano in contatto con cellule somatiche "accompagnatrici": le primitive cellule

follicolari. Con lo sviluppo del follicolo si formeranno da queste **cellule della granulosa** mentre le cellule mesenchimali dell'ovario diventeranno **cellule della teca**. Il follicolo ovarico risulta formato da cellule della teca e cellule della granulosa, che abbracceranno una singola cellula germinale la cui presenza è fondamentale perché si abbia il differenziamento del tessuto ovarico. Nelle femmine, dal dotto di Muller, che non regredisce come avviene invece nei maschi, si differenziano **le tube uterine, l'utero e la cervice, e la parte superiore della vagina**.

Spermatogenesi

La **spermatogenesi** è quel processo che porta alla formazione degli **spermatozoi (SPZ)** a partire dagli spermatogoni (SPG). Quella degli SPZ è una storia lunga, ma bisogna arrivare al 1824 prima che Prevost e Dumas sostenessero che gli SPZ erano i veri agenti della fecondazione. E fu quindi smentita l'ipotesi che gli spermatozoi fossero parassiti descrivendo la formazione in testicoli adulti. Nei maschi, le PGC si trovano incorporate nei cordoni sessuali, dove restano fino alla pubertà, momento in cui i cordoni subiscono la cavitazione e formano i tubuli seminiferi mentre l'epitelio dei tubuli si differenzia nelle cellule di Sertoli. La spermatogenesi avviene nel testicolo, organo, nella norma, pari e simmetrico. Il testicolo è costituito, alla nascita, da tubuli seminiferi, contenenti spermatogoni, separati dal tessuto interstiziale in cui si trovano i vasi sanguigni e linfatici, collagene, fibre elastiche, cellule di Leydig, mastociti. Durante la vita fetale e nella fase pre-puberale sia le cellule germinali che i precursori delle cellule del Sertoli si moltiplicano attivamente, dopo di che si osservano a carico degli **spermatogoni (SPG)** indifferenziati, una serie di modificazioni morfologiche che portano alla comparsa degli SPG di tipo A. Le cellule del Sertoli smettono di moltiplicarsi. Se si osserva una sezione di testicolo, si vede come le cellule germinali, che tappezzano le pareti del tubulo delimitate dalle cellule del Sertoli, progrediscono durante la spermatogenesi in senso centripeto, dalla periferia del tubulo verso il centro. In realtà, l'organizzazione della spermatogenesi varia da specie a specie; per esempio gli anfibi hanno una spermatogenesi cistica (laddove ogni cisti è costituita da una cellula del Sertoli che contiene cellule germinali allo stadio maturativo) nei mammiferi, il processo avviene lungo i tubuli seminiferi. I punti salienti del processo di spermatogenesi sono tre: *fase mitotica, fase meiotica, spermiostrogenesi*. Nei mammiferi, alla nascita, il numero di SPG è piuttosto basso. Verso i 10 anni di vita dell'uomo cominciano a moltiplicarsi attivamente anche se rimangono ancora indifferenziati. Questi SPG, che sono identificati come **SPG di tipo A1**, hanno piccole dimensioni, nucleo ovoidale, e sono addossati alla membrana basale con dei cordoni sessuali. Quando con la pubertà l'ipofisi comincia a lavorare, secernendo le gonadotropine, gli SPG A1 si moltiplicano producendo **SPG A2**, che possono avere un nucleo chiaro o scuro. Gli SPG A2 con nucleo chiaro sono quelli commissionati a progredire la spermatogenesi; quelli scuri sono quelli destinati a costituire lo stock di riserva di SPG. La differenza morfologica è dovuta alla cromatina che è diversamente compattata. Gli SPG con nucleo scuro presentano una cromatina granulare, mancano di nucleolo e sono da considerarsi vere e proprie cellule staminali primitive in grado, quindi, di moltiplicarsi continuamente per garantire nel tempo una continua sorgente SPG. Gli SPG A2 chiari sono provvisti di nucleolo e da essi originano gli **SPG di tipo B**. Queste cellule hanno un nucleo più piccolo, si dividono per mitosi ma le cellule figlie non si separano completamente essendo legate da ponti citoplasmatici. A questo punto gli SPG B subiscono un processo di accrescimento e differenziamento che va sotto il nome di **auxocitosi**, che porta alla formazione degli **spermatociti I (SPC I)**. La classificazione degli SPG come pure il numero di divisioni mitotiche varia da specie a specie ed è regolato in modo diverso. La fase meiotica interessa gli SPC I. Durante l'interfase pre-meiotica, nella fase S, c'è la duplicazione del DNA, e dopo la fase G2 comincia la prima profase meiotica. Va ricordato che i prodotti della meiosi I sono due cellule aploidi, ma ciascun cromosoma è costituito da due cromatidi fratelli. Il prodotto della meiosi I sono gli SPC II i quali subiscono la seconda meiosi che porta alla formazione degli

spermatidi SPT, cellule aploidi con cromosomi monocromatidici. A partire dagli SPC B le cellule restano sempre legate fra loro da ponti citoplasmatici fino allo stadio di SPT; questo significa che la citocinesi non è completa. Le cellule formano una sorta di sincizio in modo che possa esserci fra loro un attivo scambio di ioni e piccole molecole. Questo fa sì che tutte le cellule, pur essendo aploidi, lo siano solo fisicamente ma non funzionalmente perché i prodotti genici possono diffondere da una cellula all'altra. Con il progredire della spermatogenesi le cellule si allontanano sempre più dalla membrana basale fino a che gli SPZ maturi vengono rilasciate nel lume del tubulo. Il processo di spermiogenesi è un momento di cambiamenti morfologici drammatici. Infatti da cellule tonde ed immobili, gli spt, si formano gli SPZ che sono costituiti da testa collo e coda e che sono, normalmente, dotati di motilità. Possiamo sintetizzare il processo in tre punti:

a – formazione dell'acrosoma

b – condensazione del nucleo

c – formazione del flagello

a La parte apicale del nucleo è circondata dall'**acrosoma**, una vescicola di derivazione golgiana, che contiene enzimi litici come un grosso lisosoma. Il patrimonio enzimatico fa sì che lo SPZ superi le numerose barriere che proteggono la cellula uovo, siano esse strati di cellule, o rivestimenti. L'acrosoma si forma dalla fusione di vescicole che si staccano dall'apparato del Golgi nelle quali sono stati concentrati gli enzimi litici muniti del segnale di riconoscimento mannosio-6-fosfato. In presenza di un acrosoma malformato, lo SPZ non è in grado di fecondare la cellula uovo.

b Al di sotto dell'acrosoma è presente il nucleo, che contiene un corredo cromosomico aploide. Il DNA, nel passaggio SPT-SPZ, si compatta intorno a proteine più basiche degli istoni, le **protamine**. Ciò pare conferire alla testa dello SPZ una forma più idrodinamica che agevola la motilità. A questo proposito va detto che la percentuale di istoni sostituiti cambia a seconda della specie; nell'uomo l'80% di istoni è sostituito, nella trota il 100% mentre nella rana questo non succede, ed il motivo è ancora sconosciuto.

c Al di sotto del nucleo c'è una coppia di centrioli, quello prossimale e quello distale. Da quest'ultimo parte un flagello che è costituito da due proteine: **tubulina e dineina**. Nella sezione trasversale di un flagello si osserva la tipica struttura 9+2: nove coppie periferiche di microtubuli e una coppia centrale. Le coppie di microtubuli periferici sono costituite da un elemento completo, composto da 13 protofilamenti, ed uno incompleto, composto da 11 protofilamenti, originatisi dalla polimerizzazione di monomeri di tubulina α e β alternati. L'ultrastruttura del centriolo vede 9 triplette periferiche di microtubuli senza la coppia centrale. Si notano sulla superficie esterna dei microtubuli dei sottili bracci che sono costituiti da un'altra proteina, la dineina, che è responsabile del movimento del flagello. La dineina ha un'attività ATPasica; questo significa che dall'idrolisi di ATP si ricava l'energia necessaria per indurre lo scorrimento dei microtubuli gli uni su gli altri. È nota una patologia, la triade di Kartagener, legata alla mancanza di dineina. Gli individui che ne sono affetti, oltre a essere sterili perché hanno SPZ immobili, vanno incontro a frequenti infezioni bronchiali, perché anche le ciglia dell'epitelio bronchiale sono immobili, e nel 50% dei casi presentano il cuore a destra. Anche l'istone H1 è presente nel flagello e pare avere un ruolo importante nella stabilizzazione dei microtubuli evitando il disassemblaggio. Nei mammiferi, nel collo degli SPZ è presente uno strato di fibre dense che conferisce una certa rigidità alla struttura, forse per evitare bruschi ripiegamenti della testa. C'è poi una sorta di guaina costituita da mitocondri che occupa la parte iniziale del flagello. Circa il ruolo dei mitocondri nel determinare il movimento flagellare, la comunità scientifica è divisa, infatti ci sono molti dati che indicano nella glicolisi, piuttosto che nella respirazione cellulare, la fonte di ATP necessario al

movimento. Durante l'intero processo di dello SPZ si osserva la progressiva eliminazione del citoplasma. Le cellule del Sertoli, che hanno il compito di proteggere e nutrire le cellule germinali, mantenendo il microambiente interno del testicolo più adatto per una corretta spermatogenesi, si trovano addossate alla membrana basale dalla quale si estendono verso il lume del tubulo. Hanno una forma cilindrica irregolare, presentano un nucleo ovoidale provvisto di nucleolo, un citoplasma ricco di REL, citoscheletro e lisosomi. Questi ultimi sono attivamente impegnati nell'eliminazione del citoplasma che si ha nel passaggio da spermatide a spermatozoo. Le cellule del Sertoli hanno anche il compito di sintetizzare una proteina capace di legare gli androgeni (androgen binding protein ABP) che permette al testosterone di raggiungere i suoi bersagli. Attraverso le *aromatasi* le cellule del Sertoli presiedono, in alcuni casi, alla conversione del testosterone in estradiolo, anch'esso fondamentale per la fisiologia testicolare. Non bisogna quindi parlare di ormoni femminili e maschili avendo l'estradiolo un ruolo importante nella fisiologia del testicolo. Nell'uomo un intero ciclo spermatogenico dura circa 64 giorni; la spermatogenesi inizia con la pubertà, verso i 13-16 anni, e continua fino all'età senile, fino a che i tubuli seminiferi sono integri.

Espressione genica durante la spermatogenesi

La trascrizione genica avviene prevalentemente allo stadio di diplotene della meiosi I ed i geni che sono trascritti sono quelli necessari per la motilità dello spermatozoo e per il suo legame con la cellula uovo.

Regolazione della spermatogenesi

Esiste un meccanismo di controllo centrale che vede coinvolti l'ipotalamo e l'ipofisi. Il fattore di rilascio delle gonadotropine, **GnRH**, prodotto da specifici neuroni ipotalamici, raggiunge l'ipofisi via circolazione portale. A livello ipofisario sono presenti recettori specifici di membrana che riconoscono e legano il GnRH. Ciò induce una cascata di eventi che esita nella sintesi e nel rilascio delle gonadotropine, **l'ormone follicolo stimolante (FSH) e l'ormone luteinizzante (LH)**. Tramite il circolo generale, l'LH raggiunge le cellule di Leydig dove induce la sintesi del testosterone, necessario per lo sviluppo di caratteri sessuali secondari. Il testosterone può essere aromatizzato ad estradiolo sia nelle cellule del Sertoli, che a livello cerebrale. Questa reazione è molto importante per l'influenza che ha sul comportamento. Infatti in una finestra temporale ben precisa durante la vita fetale, l'estradiolo prodotto nel cervello dal testosterone induce il comportamento maschile (per esempio, nel topo, la monta). Il testosterone, con **feedback negativo** blocca la secrezione di LH e di GnRH quando supera determinate concentrazioni ematiche. L'ormone FSH agisce sulle cellule del Sertoli, che nell'adulto, producono ABP e diversi fattori di crescita, e soprattutto l'inibina, che inibisce il rilascio di FSH dall'ipofisi. I bioregolatori locali, devono quindi essere prodotti *in loco* via recettori specifici. Un esempio è rappresentato dal GnRH testicolare, che, prodotto dalle cellule del Sertoli, si è dimostrato capace di funzionare localmente stimolando la sintesi ed il rilascio di testosterone da parte di cellule di Leydig in numerosi modelli sperimentali. Sono molte le cause che possono inficiare la fertilità maschile: ciò non va confuso o sovrapposto al concetto di virilità. Un maschio sterile, che quindi non produce SPZ validi, può essere virile, cioè avere un normale fenotipo e comportamento maschili. Le cause ambientali come radiazioni ionizzanti, contaminazioni con sostanze del tipo "distruttori endocrini", la temperatura come pure gli stili di vita sbagliati possono indurre sterilità nei maschi, ma va ricordato che, nel testicolo, c'è sempre una quota di SPG staminali, in grado di ripopolarlo una volta che eventuali elementi nocivi siano stati rimossi o che le condizioni ambientali siano ritornate favorevoli. La spermatogenesi si arresta naturalmente quando la maggior parte dei tubuli seminiferi si atrofizza, e di conseguenza la produzione di SPZ viene drammaticamente ridotta.

Ovogenesi

Lo sviluppo dei gameti femminili avviene nell'**ovario**, organo in genere pari e simmetrico, che, come il testicolo, ha sia una funzione riproduttiva che una funzione endocrina. È evidente una notevole differenza tra spermatogenesi ed ovogenesi. Il gamete maschile maturo è una cellula dotata di motilità, il cui destino è quello di partecipare alla costituzione di un nuovo individuo fornendo un corredo cromosomico aploide. Il gamete femminile contiene, oltre al corredo aploide, tutto il materiale necessario per avviare e guidare le prime fasi dello sviluppo dell'uovo fecondato, lo zigote. Nel citoplasma della cellula uovo matura troviamo infatti riserve di RNA messaggero adeguatamente protette, RNA ribosomale, RNA di trasferimento, proteine, organuli citoplasmatici che serviranno allo sviluppo dello zigote. Lo SPZ infatti, dona durante la fecondazione solo il suo nucleo ed i centrioli. I meccanismi dell'ovogenesi sono diversi da una specie all'altra e riflettono l'esistenza di altri tipi diversi di riproduzione. Facendo riferimento alla specie umana, durante la vita embrionale si osserva la moltiplicazione degli **ovogoni**, che raggiungono numeri ragguardevoli dell'ordine di milioni; di questi, un certo numero subisce il processo di auxocitosi trasformandosi in **ovociti I** che cominciano la meiosi I bloccandosi, però, nella fase di diplotene (detta anche **dittiato**) della profase I. alla nascita quindi, le neonate avranno un patrimonio di ovociti I, bloccati al diplotene della meiosi I, compreso tra i 200.000 e i 400.000; di questi, all'incirca 400 sono destinati a maturare, gli altri a morire (**atresia**). Negli ovociti I, durante il diplotene si è osservato un processo di accrescimento della massa citoplasmatica molto evidente soprattutto nelle specie ovipare, i cui embrioni si sviluppano all'esterno del corpo materno. L'accrescimento è conseguenza del fenomeno dei **lampbrush o cromosomi a spazzola**, che corrisponde alla formazione di moltissime ansie di cromatina de condensata che sono sottoposte ad intensa trascrizione; sono prodotti anche numerosi precursori di rRNA e tRNA con la comparsa di numerosissimi nucleoli. Tutto ciò ha l'evidente significato di accumulare sostanze che saranno utilizzate in un secondo momento, quando avverrà l'incontro con il gamete maschile. Gli ovociti I restano bloccati fino al momento dello sviluppo, intorno ai 12-14 anni, quando, grazie all'intervento di alcuni ormoni, ciclicamente, un ovocita I è in grado di riattivare la prima meiosi, completarla, cominciare la seconda meiosi e bloccarsi nuovamente alla metafase II. I prodotti della meiosi I sono un **ovocita II** e un **globulo polare**, che altro non è che una cellula formata da un nucleo aploide con cromosomi dicromatidici, ed uno straterello sottile di citoplasma. Si tratta infatti di una divisione ineguale che pare essere influenzata dal prodotto del proto-oncogene *c-mos*. Con la seconda meiosi, che si completa dopo la fecondazione, si forma un **ootidio** ed un **secondo globulo polare**. La fase di ootidio è assolutamente virtuale, perché nel momento in cui c'è la fecondazione l'ovocita II completa rapidamente la meiosi II e si attiva per fondere il suo nucleo per con quello portato dallo spermatozoo. Normalmente i globuli polari degenerano.

Formazione e maturazione dei follicoli ovarici

La **follicolo genesi** rappresenta un meccanismo fisiologico dagli aspetti molteplici, non completamente conosciuti. Infatti, desta perplessità e stupore l'apparente antieconomicità di un processo naturale che prevede il coinvolgimento di un numero elevatissimo di follicoli primordiali che sono in gran parte destinati a morire. Ad arrestare lo sviluppo della maggior parte dei follicoli ovarici interviene, infatti, un meccanismo precoce ed altamente efficiente, chiamato **atresia follicolare**. Alcuni follicoli possono rimanere allo stato primordiale e non mostrare segni di crescita o atresia. Nella donna, alla nascita, è già presente il completo capitale follicolare: nessun nuovo follicolo si forma dopo la nascita, diversamente da quello che succede in

altri mammiferi. L'organizzazione del pool ovarico di follicoli primordiali, costituiti da un singolo ovocita circondato da un monostrato di cellule follicolari, alle quali è connesso da giunzioni gap, si realizza durante lo sviluppo embrionale. Questi follicoli primordiali rappresentano la riserva di cellule germinali, da cui si svilupperanno i follicoli destinati ad accrescersi. In generale, possiamo distinguere una follicolo genesi indipendente dalle gonadotropine, praticamente continua, ed una follicolo genesi gonadotropina-dipendente, intermittente. Il **follicolo primordiale** inizialmente si accresce insieme all'ovocita e a questo punto comincia a formarsi la **zona pellucida**. Questo è costituito da mucopolisaccaridi, che ricopre l'ovocita e che svolgerà un ruolo importante durante la fecondazione; alla sua formazione contribuiscono sia l'ovocita che le cellule follicolari (**follicolo primario**). Con la moltiplicazione delle cellule follicolari, che diventano pluristratificate e prendono il nome di granulosa, si forma il **follicolo secondario**. Questo presenta una membrana basale associata a **cellule della granulosa** all'esterno delle quali sono presenti le **cellule della teca**, di origine mesenchimale, che si differenziano in **teca interna e teca esterna**. All'interno del follicolo comincia a formarsi una cavità, l'**antro follicolare**, pieno del **liquor folliculi**, contenente proteine, ormoni, glicoproteine e mucopolisaccaridi, prodotti dalle cellule follicolari. In questo momento l'ovocita raggiunge le sue massime dimensioni, anche la zona pellucida raggiunge il suo massimo spessore e funge da filtro per la cellula uovo. Il **follicolo preovulatorio** maturo è caratterizzato dall'aumento delle dimensioni della cavità dell'antro e del volume del liquor e la contemporanea proliferazione delle cellule della granulosa, che spingono l'ovocita verso la periferia del follicolo, circondato da pochi strati di cellule follicolari. Le dimensioni di questo follicolo raggiungono i 25-30mm e l'ovocita risulta circondato da cellule dette del **cumulo ooforo**, mentre le cellule follicolari addossate all'ovocita prendono il nome di **corona radiata**. Può succedere che alcuni follicoli comincino a crescere prima della pubertà ma sono quelli destinati all'atresia piuttosto che alla maturazione. Con la pubertà, un certo numero di follicoli comincia a crescere, ma solo uno, nella donna, per ogni ciclo, riesce a completare la traduzione.

Perché viene scelto un follicolo piuttosto che un altro?

Il reclutamento del follicolo è un processo attraverso il quale un pool di follicoli comincia a maturare in un ambiente con sufficiente contenuto di gonadotropine. La selezione è il processo attraverso il quale un singolo follicolo reclutato, gradualmente diventa più grande degli altri ed acquisisce il potenziale ovulatorio. La dominanza è il mezzo attraverso cui il follicolo selezionato spinge i follicoli subordinati a regredire (atresia) e inibisce il reclutamento di nuovi pool di follicoli. Nel corso dello sviluppo, il follicolo destinato ad ovulare va incontro ad una specifica sequenza di modificazioni recettoriali che condizionano il graduale incremento di sensibilità agli stimoli da parte delle gonadotropine, con particolare riferimento all'FSH. In sintesi, il follicolo che ha più recettori potrà meglio rispondere alle gonadotropine e sarà quindi scelto per ovulare.

Cosa sblocca la prima meiosi?

È stato dimostrato che l'ovocita, separato dalle cellule follicolari che lo circondano, riprende spontaneamente la meiosi. Questo ha fatto ipotizzare che la chiusura delle gap junction sia responsabile di tale ripresa. In effetti si è visto che con la chiusura delle comunicazioni con le cellule circostanti si ha un decremento di cAMP e questo pare essere il segnale che l'ovocita aspetta per ricominciare la meiosi. Ma come fanno le gonadotropine ad interrompere le comunicazioni gap? Nelle cellule follicolari, in risposta all'LH si è osservato un aumento della fosforilazione della connessina 43. Questa modificazione indurrebbe alla diminuzione della concentrazione di cAMP; a ciò farebbe seguito una risposta tardiva che opererebbe inibendo la traduzione di connessina, con conseguente down-regulation della trascrizione del gene corrispondente ed eliminazione delle gap junctions.

Regolazione ormonale del ciclo ovarico e del ciclo uterino

A questo punto dobbiamo integrare gli eventi che vedono coinvolte le cellule germinali, i follicoli ed un terzo elemento, che è rappresentato dall'utero, cioè l'organo all'interno del quale avverrà l'annidamento della blastocisti ed il successivo sviluppo. Tutti li eventi sono finemente regolati da una pletora di ormoni che devono essere prodotti al momento giusto e nella giusta quantità. È importante sottolineare che nei mammiferi maturazione ed ovulazione seguono due modelli; in un caso l'ovulazione viene stimolata dal rapporto fisico: la stimolazione della cervice stimola l'ipofisi che risponde secernendo le gonadotropine che hanno il compito di sbloccare la meiosi I ed indurre il rilascio dell'ovocita, fermo in metafase II, dall'ovario. Questo sistema garantisce un successo riproduttivo enorme ed è infatti tipico di conigli topi e mustelidi. Nella maggior parte dei mammiferi, l'ovulazione è periodica, cioè la femmina ovula in momenti dell'anno ben precisi, chiamati estri, e solo in tali momenti la femmina accetta l'accoppiamento. Nella specie umana l'ovogenesi è periodica con la differenza che le donne hanno un'ovulazione ciclica per cui ogni 28 giorni circa c'è la maturazione di un ovocita che può più o meno incontrare uno SPZ. Gli ormoni dell'ipotalamo, dell'ipofisi e dell'ovario concorrono ad integrare diverse attività di ciclo ovarico, ciclo uterino e ciclo cervicale. Il ciclo viene diviso in due momenti: *fase follicolare, o proliferativa e fase luteinica o secretiva*, ciascuna della durata di circa 14 giorni. Si considera come primo giorno del ciclo il primo giorno di sanguinamento (mestruo), fenomeno che rappresenta l'eliminazione della mucosa uterina ipertrofica che era pronta ad accogliere una eventuale blastocisti. Il GnRH, prodotto dall'ipotalamo induce il rilascio delle gonadotropine da parte dell'ipofisi. Comincia così la **fase follicolare**. Si osserva un iniziale incremento di FSH ed i follicoli che hanno cominciato a crescere rispondono proliferando ulteriormente. L'FSH induce la produzione di estradiolo ed anche l'incremento dei recettori per l'LH sulle cellule della granulosa. Dopo poco l'ipofisi, in seguito al picco di estradiolo, comincia a secernere anche l'LH, il cui picco induce la ripresa della meiosi I con la formazione del primo globulo polare e l'inizio della meiosi II fino allo stadio di metafase. Il picco di LH induce l'ovulazione che avviene intorno al 14° giorno grazie all'intervento di alcune sostanze: la collagenasi, l'attivatore del plasminogeno e le prostaglandine. L'attivatore del plasminogeno, che è una proteasi molto potente, insieme alla collagenasi induce la digestione della parete del follicolo con la formazione di un foro attraverso il quale l'ovocita fuoriesce per essere catturato dalle tube di Falloppio. Le prostaglandine avrebbero un ruolo nell'indurre la contrazione delle cellule della muscolatura liscia. Nel citoplasma dell'ovocita è presente il messaggero per l'attivatore del plasminogeno ed il compito dell'LH sembra essere proprio quello di indurre la sua maturazione e traduzione. L'ovocita II, rilasciato nelle tube di Falloppio, fermo alla metafase II, è pronto per essere fecondato. Dopo l'ovulazione, comincia la **fase luteinica o secretiva** del ciclo. Per effetto dell'LH quello che resta del follicolo all'interno dell'ovario, si trasforma in **corpo luteo**, che secreta prevalentemente progesterone. Questo steroide è molto importante perché nell'utero si crea l'ambiente adatto all'impianto della blastocisti; esso agisce stimolando l'ipertrofia sia della parete che dei vasi sanguigni. Il progesterone ha anche un altro effetto che è quello di bloccare la produzione di FSH e quindi di inibire lo sviluppo di altri follicoli. Se l'ovocita non viene fecondato, il corpo luteo degenera, si esaurisce la secrezione del progesterone e la mucosa uterina si sfalda. Con il decremento del progesterone, l'ipofisi riceve lo stimolo a secernere di nuovo FSH ed il ciclo ricomincia. Se l'ovocita viene fecondato, il **trofoblasto** (le cui cellule formeranno il corion e la parte embrionale della placenta) comincia a

secernere la luteo tropina, un ormone che mantiene attivo il corpo luteo e quindi i livelli di progesterone elevati.

Differenze tra spermatogenesi ed ovogenesi

Differenza di resa numerica e tempistica Mentre la spermatogenesi è un processo continuo che comincia con la pubertà e continua fino a tarda età con la produzione di miliardi di spermatozoi, l'ovogenesi comincia durante lo sviluppo embrionale e dopo un blocco che dura fino alla pubertà continua dal menarca fino alla **menopausa** con produzione di un numero molto limitato di gameti maturi (circa 400). Durante la vita intrauterina si osserva la moltiplicazione degli ovogoni fino a 6-7 milioni; di questi, buona parte degenera, mentre gli altri 200.000-400.000 si trasformano in ovociti I. la meiosi però si blocca al diplotene della prima profase meiotica. Il fatto che la produzione dei gameti femminili cominci già durante la vita intrauterina rappresenta una sorta di handicap, infatti, le donne producono gameti sempre più vecchi ed è infatti legata all'età della madre tutta una serie di meccanismi di non disgiunzione meiotica, prima fra tutte la sindrome di Down.

I prodotti della meiosi sono numericamente e morfologicamente molto diversi Da uno SPC I otteniamo 4 spermatozoi, da un ovogonio solo una cellula uovo matura. I due gameti sono diversissimi per dimensione, forma e morfologia. L'ovocita è molto più grande, immobile, contiene tutto il necessario per dare inizio allo sviluppo del nuovo individuo. Lo spermatozoo è piccolo, dotato di flagello, quindi mobile, ha il compito di fecondare inserendo all'interno dell'ovocita il nucleo ed i centrioli. L'aumento del volume dell'ovocita è da imputare anche all'accumulo di materiale di riserva, definito anche *vitello*, o lecite, o deutero plasma, necessario per lo sviluppo dell'embrione. La quantità di vitello varia notevolmente tra i vertebrati ed è indicativa del tipo di segmentazioni a cui andrà incontro lo zigote.

Trascrizione e cromosomi a spazzola Negli ovociti I bloccati al diplotene della I profase si osserva un fenomeno curioso che è rappresentato dalla comparsa dei cromosomi a spazzola. Ci si aspetterebbe che i cromosomi si compattassero in vista della metafase ma questo non succede, anzi essi assumono un aspetto piumoso con formazione di anse che corrispondono a tratti di fibra cromatinica despiralizzata dove il DNA è in attiva trascrizione. I geni che vengono attivamente trascritti nel topo sono quelli che codificano le proteine presenti sulla zona pellucida e responsabili del riconoscimento uovo-SPZ. Questi geni sono esclusivamente trascritti negli ovociti e in nessun'altra cellula dell'organismo. Un'altra peculiarità dell'ovogenesi è l'amplificazione dei geni che codificano l'rRNA con conseguente aumento dei nucleoli.

TRENTAQUATTRESIMA LEZIONE: MUTAZIONI

La caratteristica di maggiore valenza della molecola di DNA è la sua capacità di duplicazione realizzata mediante la modalità semiconservativa. Tale semplice sistema permette una perfetta regolarità nella biosintesi di nuove molecole identiche alla molecola stampo. Il rilievo di tale modalità era stato genialmente intuito da Watson e Crick. Il meccanismo molecolare dell'ereditarietà è essenziale per interpretare come possa essere mantenuto integro e costante il materiale genetico degli organismi. Mantenere integra l'informazione quando viene trasmessa alla prole costituisce il presupposto che rende la molecola del DNA idonea per il ruolo di latore dell'informazione genetica. Nonostante tutti questi sistemi facciano in modo che il messaggio genetico sia conservato nonostante gli accorgimenti garantisti dell'integrità genica, è proprio lo stesso sistema molecolare che permette l'insorgere, casuale ed improvviso di variazioni, di modifiche nel materiale genetico, cioè di mutazioni. Ogni tipo di variazione del materiale genetico produce "novità". Gli organismi viventi mostrano un'ampia fantasia; infatti le casuali novità sono foriere di nuove potenzialità, di nuove possibilità di adattamento all'ambiente, in pratica di diverse possibilità di rispondere alle forze selettive e quindi migliorare le possibilità di sopravvivenza. Tutto questo viene indicato con il nome di **variabilità**. Esistono anche altri meccanismi necessari per amplificare e diffondere gli effetti delle mutazioni: la *ricombinazione genica*, la *segregazione degli alleli nei gameti* e i *fenomeni di sessualità*. Brevemente, la **ricombinazione** consiste in un riarrangiamento del materiale genetico che si verifica negli eucarioti a riproduzione sessuale, durante la prima profase meiotica quando le coppie di cromosomi omologhi si appaiano e si scambiano tratti omologhi di DNA (crossing-over). Il cromosoma di origine paterna scambierà i propri alleli con quello di origine materna e viceversa. Così ciascun cromosoma dopo il crossing over, avrà un diverso assortimento allelico e quindi differenti capacità informative. Durante la meiosi, c'è un altro evento che contribuisce a rimescolare le "carte": la **segregazione** indipendente degli alleli nei gameti. I cromosomi omologhi, infatti, già variamente ricombinati, si disporranno sulla piastra equatoriale in maniera assolutamente casuale e con l'inizio dell'anafase I si separeranno per andare ai poli opposti del fuso; con la seconda meiosi si separeranno i cromatidi fratelli. I gameti così prodotti avranno combinazioni alleliche diverse. Questo significa che ciascun gamete avrà la potenzialità di contribuire alla formazione dello zigote con un proprio e diverso apporto genico. Un nuovo organismo sarà prodotto dalla fusione di gameti di individui di sesso opposto. La **sessualità**, pertanto, contribuirà anch'essa ad incrementare la variabilità perché è fonte di incontri intraspecifici tra soggetti appartenenti a linee familiari diverse. Risulta ovvio che è necessario che si sviluppino meccanismi che limitino la frequenza di mutazione o la possibilità che questa esiti sempre in un effetto fenotipico; infatti, una frequenza di mutazione troppo alta favorirebbe cambiamenti che, selezionati negativamente dall'ambiente potrebbero portare all'estinzione. È comunque opportuno considerare che le mutazioni possono essere responsabili di gravi alterazioni funzionali (in questo caso denominate mutazioni patogeniche); infatti le mutazioni talvolta sono causa diretta dell'alterazione fenotipica, oppure alternativamente sono in grado di aumentare la suscettibilità ad una malattia. Si può affermare allora che il basso tasso di mutazioni di un organismo è frutto di un efficiente bilanciamento tra l'esigenza di proporre novità molecolari (necessarie per il processo evolutivo) e la determinazione di limitare altre mutazioni che invece causano malattie o morte tra i membri della stessa specie.

MUTAZIONI: TIPI E CLASSIFICAZIONE

Tutti gli esseri viventi sono soggetti a differenti tipi di variazioni ereditabili che globalmente vanno sotto il nome di mutazioni. Pertanto la **mutazione** è definibile come un evento casuale e stabile che produce un

cambiamento del patrimonio genetico ed è quindi ereditabile. Tale variazione, nella maggior parte dei casi è in scala nucleotidica, riguarda cioè la qualità, il numero, la sequenza dei nucleotidi del DNA, modificando il significato dell'informazione (**mutazioni geniche o puntiformi**), oppure può verificarsi alterando la struttura dei cromosomi (**mutazioni cromosomiche**) oppure ancora coinvolgere il numero dei cromosomi (**mutazioni genomiche**). Le mutazioni possono verificarsi autonomamente (**mutazioni spontanee**) oppure possono essere determinate da vari agenti mutageni (**mutazioni indotte**). Si può fare riferimento subito alle possibili conseguenze di una mutazione genica: si potrebbe avere la sintesi di un prodotto parzialmente o totalmente non funzionale perché poco o del tutto diverso da quello previsto, così come tale prodotto potrebbe non essere affatto sintetizzato. Una mutazione può essere trasmessa alle cellule figlie generando cloni di cellule mutate. Quindi, se la mutazione interesserà una cellula somatica, **mutazione somatica**, risulteranno mutate solamente le cellule derivanti da tale cellula; questa mutazione sarà ristretta all'individuo in cui è insorta e non sarà trasmessa alla progenie. Se invece la mutazione interesserà una cellula della linea germinale in organismi che si riproducono sessualmente, **mutazione germinale**, questa potrà essere trasmessa alla prole con la evidente conseguenza che tutte le cellule del nuovo organismo presenteranno la mutazione, e questa sarà comunque trasmessa tutte le successive generazioni.

VARIAZIONE DELLA STRUTTURA DEL DNA

L'alterazione della sequenza nucleotidica di un gene viene definita mutazione genica, ma considerato che la variazione può interessare anche regioni di DNA non codificanti, si suole denominarla **mutazione puntiforme** in modo da comprendere, con unico termine, il concetto di variazione in un punto all'interno del genoma codificante e non.

Mutazioni puntiformi

Una mutazione puntiforme può essere dovuta almeno a tre tipi di variazioni del materiale genetico: la **sostituzione di basi, l'inserzione, o la delezione** di nucleotidi. Ciascun tipo, modificando la sequenza del DNA, pur se in ambito spazialmente ristretto, avrà conseguenze fenotipiche ampiamente variabili, per entità e rilievo. Infatti l'evento mutazionale, che si determina in una singola catena di DNA, ben presto produrrà nella molecola di DNA una differente sequenza di nucleotidi o per l'assenza di una coppia di nucleotidi o per la presenza di una diversa coppia di nucleotidi.

Mutazioni per sostituzione di base

Fondamentalmente possono essere di due tipi, le *transizioni* e le *transversioni*. La transizione consiste nella sostituzione di una purina con un'altra purina (A-G) o di una pirimidina con un'altra pirimidina (T-C) in una singola elica di DNA; ne consegue che nella molecola di DNA troveremo una coppia purina-pirimidina sostituita da una diversa coppia purina-pirimidina. Praticamente una coppia AT in seguito a transizione, sarà sostituita da una coppia GC. Transizioni saranno quindi anche cambiamenti TA con CG, GC con AT e CG con TA. Definiamo invece **transversione** la sostituzione di una purina con una pirimidina e viceversa; infatti, una coppia AT, in seguito a transversione sarà sostituita da una CG, così come TA con GC, TA con AT, CG con GC. Queste mutazioni possono essere ulteriormente classificate in base agli effetti sul prodotto, cioè sul fenotipo. Per esempio una **mutazione è detta di senso (o missense di significato diverso)** quando la sostituzione avrà come conseguenza il cambiamento di un codone sul messaggero e quindi del suo significato, tanto che nella proteina in fase di sintesi verrà inserito un amminoacido diverso da quello nativo. Ovviamente l'effetto della mutazione, il suo rilievo funzionale e l'incidenza sulla attività dell'organismo dipenderanno dalle caratteristiche dell'amminoacido inserito e dalla sua posizione più o

meno strategia per la struttura e/o la funzione della stessa proteina, oltre che dal ruolo che questa riveste nell'economia cellulare. Ad esempio: nella specie umana, una forma variante della normale emoglobina HbA dell'adulto, detta HbS, è causata da una mutazione per sostituzione di base che produce una sostituzione amminoacidica. La denominazione dell'emoglobina S (S: sickle=falce), dovuta al fatto che nei soggetti che hanno il gene mutato, a causa della variazione delle proprietà chimico fisiche della molecola (HbA) si andrà incontro a falcizzazione degli eritrociti ed emolisi. L'HbS presenta una sostituzione del residuo amminoacidico in posizione 6 delle catene β , cioè al posto dell'acido glutammico c'è la valina. Questa variazione è causata dalla sostituzione di base nel sesto codone significativo del gene per la catena β , in particolare una timina viene sostituita con una adenina (CTC diventa CAC) per cui, dopo la trascrizione, sul messaggero la tripletta GAG diventa GUG codificante per la valina. La molecola di HbS, in conseguenza delle interazioni instaurate dal residuo apolare della valina, non sarà in grado di rispettare il corretto folding, avrà una mobilità elettroforetica diversa, ma sostanzialmente manifesterà una solubilità inferiore alla normale HbA. In altri casi la **mutazione è detta di non senso (non sense)** quando la sostituzione di base nel DNA determina sul messaggero, al posto di una tripletta codificante, la formazione di un CODONE DI STOP (UAA UGA UAG); ciò provoca la prematura terminazione della catena polipeptidica. Le conseguenze di un simile cambiamento sono spesso gravi perché il danno è più esteso rispetto ad una mutazione missense; certamente la gravità di tale mutazione è legata alla lunghezza del frammento di proteina sintetizzata che potrebbe essere sufficientemente lungo da garantire l'assunzione di una corretta, o quasi, struttura terziaria, e quindi lo svolgimento della corrispondente funzione, o al contrario troppo corto e quindi non funzionale. È possibile che una sostituzione di base provochi nel messaggero la sostituzione di una tripletta con un'altra che codifica per un amminoacido con le stesse caratteristiche chimico-fisiche di quello nativo. In questo caso la **mutazione viene definita neutra**, poiché la sostituzione non altera il corretto folding, verrà mantenuta la normale funzione. Infine, in altri casi, la sostituzione di base nel DNA provocherà sul messaggero la comparsa di un nuovo codone (con la sostituzione nella terza, e per alcuni anche nella seconda base) che però, grazie alla degenerazione del codice genetico, codifica sempre lo stesso amminoacido. Questo tipo di mutazione è detta **mutazione dello stesso senso, o samesense**, ma non producendo un fenotipo mutato, opportunamente, è stata definita anche **mutazione silente**.

Mutazioni per inserzione o delezione di nucleotidi

Le **mutazioni frameshift** o per **scivolamento della cornice di lettura** sono provocate dall'**inserzione o delezione di un nucleotide**, per cui avremo nella molecola di DNA coinvolta, a seguito di duplicazione, rispettivamente o una coppia di nucleotidi in più o una in meno. Queste mutazioni sono denominate frameshift perché al semplice inserimento o all'eliminazione di un nucleotide ne consegue, durante la traduzione sui ribosomi una lettura del messaggio **fuori fase**, a partire dal punto della mutazione in poi; questo perché il messaggero, mRNA, viene letto a triplette e continuativamente da un estremo all'altro. La ovvia conseguenza fenotipica potrà essere sia la sintesi di una catena polipeptidica non del tutto funzionale perché con differente struttura primaria, sia la produzione di un frammento peptidico tronco, se si forma un codone nonsense prematuro. In alcuni casi può accadere che due mutazioni, una inserzione ed una delezione, siano a carico dello stesso gene, oppure insorgano tre mutazioni dello stesso segno, in questi casi si avrà uno scivolamento della cornice di lettura ma sarà limitato al tratto compreso tra le mutazioni. Immediatamente dopo il messaggio torna nuovamente in fase, quindi, se lo scivolamento della cornice di lettura non ha interessato regioni essenziali della proteina, questa potrà conservare la sua funzionalità. In definitiva, mentre l'effetto della sostituzione di base dipenderà dall'amminoacido che viene inserito nella proteina una inserzione, o una delezione, in genere, produce un polipeptide non funzionale: la catena

polipeptidica avrà una struttura diversa a partire dal punto in cui si è verificata la mutazione: ovviamente più è precoce questo punto, maggiore sarà il danno.

Mutazioni nelle regioni non codificanti del gene

Se le maggiori conseguenze fenotipiche derivano per lo più da mutazioni a carico del 3% del DNA codificante, le mutazioni puntiformi che interessano il DNA non codificante di solito non hanno conseguenze evidenti a meno che esse non avvengano in regioni quali il promotore, le sequenze che regolano l'espressione genica o in quelle posizioni determinanti degli introni, come le sequenze consenso o di ramificazione dello splicing. In ogni caso il tasso di mutazione che si rileva in queste ultime porzioni di DNA risulta inferiore rispetto a quello che si verifica nelle regioni codificanti. Alcune **sequenze non codificanti intrageniche** sono necessarie per la corretta espressione del gene, per esempio i di nucleotidi GT al sito donatore 5' e AG al sito accettore 3' dell'introne che rappresentano sequenze altamente conservative riconosciute da complessi dello spliceosoma. Potremmo dire che si tratta di consolidate strategie evolutive atte a garantire l'efficienza della funzione genica; infatti è riconosciuta la correlazione tra patologia e mutazioni che coinvolgono lo splicing, o le sequenze 5'UTR e 3' UTR, o alcuni elementi del promotore, o siti di poliadenilazione con conseguente alterazione dell'efficienza della trascrizione o della traduzione. Le mutazioni che interessano i siti di splicing fondamentalmente possono portare a due conseguenze: o l'esclusione dal messaggero di interi esoni (**exon skipping, omissioni di esoni**) oppure il mantenimento di sequenze introni che (**intronic retention, ritenzione di introni**). Nel caso dell'omissione di esoni, la perdita di tratti codificanti ha come conseguenza la sintesi di un polipeptide che può non essere funzionale, perché si è perso un gruppo critico di amminoacidi, oppure il trascritto non è stabile. Nel caso della ritenzione degli introni, una mutazione nei siti di splicing determina il loro mancato riconoscimento da parte dei complessi degli spliceosomi per cui la sequenza intronica viene mantenuta nel messaggero maturo. La conseguenza è un polipeptide contenente un certo numero di amminoacidi addizionali. Un'altra possibilità è quella che vede uno scivolamento del modulo di lettura in seguito alla ritenzione di un introne, in questo caso è molto probabile che il polipeptide sintetizzato non sia funzionale. Ci sono ancora altri casi in cui lo splicing è alterato perché alcune mutazioni possono verificarsi in sequenze simili a quelle canoniche di splicing, ma che normalmente non sono coinvolte in questo processo (**siti criptici di splicing**). In seguito a mutazione, queste sequenze diventano veri e propri siti di splicing. I siti criptici, quindi, sono così denominati perché somigliano ai canonici siti di splicing, e casualmente, possono diventare uguali ad essi in seguito a mutazioni che ne alterano la sequenza; in conseguenza di ciò l'apparato di splicing li riconosce e li utilizza per il taglio e la saldatura degli esoni producendo così dei nuovi trascritti. I siti nascosti di splicing non sono difficili da riscontrare all'interno della sequenza di un gene; l'attivazione di uno di essi, nascosto all'interno di un introne, comporterà l'introduzione di nuovi amminoacidi nella sequenza polipeptidica. Da quanto descritto risulta chiaro che mutazioni apparentemente silenti possono avere delle conseguenze, tanto che la sostituzione di un singolo nucleotide, in un punto critico, può sconvolgere il meccanismo assai complesso e preciso della formazione dei trascritti.

Espansione delle ripetizioni di trinucleotidi

Distribuite in tutto il genoma umano si trovano delle sequenze di DNA ripetute in tandem, di lunghezza variabile: molto corte, di estensione media o tanto estese da includere interi geni. Può quindi accadere che in una regione di DNA codificante per un polipeptide si presentino delle ripetizioni in tandem di un piccolo numero di nucleotidi come, per esempio, trinucleotidi; la presenza di ripetizioni in tandem di un così piccolo numero di nucleotidi può provocare l'insorgenza di mutazioni in geni umani. La variazione del numero di copie di trinucleotidi presenti in un certo gene, è denominata **espansione di triplette**. In alcune patologie umane è stato evidenziato un numero di copie di triplette intrageniche inferiore alla norma; a causa di ciò il numero degli amminoacidi è inferiore, ma con conseguenze che sono variabili caso in caso. In altre condizioni patologiche, ove tale numero di triplette è aumentato, si rilevano sia **espansioni stabili**, che non mostrano ripercussioni, sia **espansioni instabili**, osservabili quando la ripetizione avviene in maniera marcata. In quest'ultimo caso si possono determinare alterazioni di alcuni domini fondamentali per la catena polipeptidica, tanto che quest'ultima può risultare destabilizzata. In estrema sintesi, l'espansione di tali triplette causa o la perdita della espressione genica o l'alterazione della funzionalità dei prodotti di tali geni. L'espansione riguarda, per lo più, triplette quali CAG o CCG, la cui ripetizione risulta contenuta entro certi limiti nella

popolazione generale, mentre tali limiti sono superati negli individui affetti da talune condizioni patologiche, a decorso progressivo, che causano degenerazione del sistema nervoso.

L'espansione è probabilmente frutto di due tipi di eventi:

- a) Durante la replicazione del DNA in presenza di semplici sequenze ripetute, a causa di appaiamenti sfalsati, si può verificare lo scivolamento del filamento di DNA stampo sul filamento in sintesi (o viceversa) e determinare quindi l'inserimento o la delezione di singole unità ripetute.
- b) Eventi di crossing over ineguali possono provocare a loro volta l'aumento o la diminuzione di grosse regioni contenenti ripetizioni da una generazione all'altra.

Queste mutazioni inoltre sono dette **dinamiche** perché nel corso delle diverse generazioni, si può osservare espansione così come riduzione del numero di triplette; proprio per questo si definiscono anche **mutazioni instabili**.

Esistono stadi intermedi di **pre-mutazione** in cui il livello di amplificazione delle triplette non è ancora tale da determinare la manifestazione della patologia; si tratta di stadi che rappresentano una predisposizione alla mutazione piena ed al superamento della soglia tra il normale ed il patologico nel passaggio alle generazioni successive. Si è osservata anche una relazione tra numero di ripetizioni presenti e gravità della malattia o età di esordio: più alto è il numero delle ripetizioni, più gravi saranno i sintomi. In tale contesto si osserva il fenomeno denominato **anticipazione**, per cui, nel passaggio da una generazione all'altra si abbassa l'età di insorgenza e/o aumenta la gravità della malattia. Praticamente genitori con la malattia in forma lieve hanno figli che iniziano precocemente a mostrare segni clinici della malattia, con sintomi più gravi. Con il proseguire delle generazioni, all'aumentare del numero delle ripetizioni, vi è una maggiore probabilità che queste regioni subiscano una ulteriore espansione; ciò si traduce nella tendenza a conferire segni clinici sempre più gravi con un esordio sempre più precoce. Per quel che riguarda la correlazione tra la espansione e i sintomi della malattia si è visto che in alcuni casi, come nella corea di Huntington, la tripletta espansa GAG si trova all'interno della sequenza codificante del gene, il cui prodotto, la huntingtina è una proteina inusuale perché presenta residui aggiuntivi di glutammina.

Mutazioni spontanee ed indotte. Agenti mutageni

Qualunque sia il numero, la sede e la tipologia delle variazioni del materiale genetico degli organismi, sembra di notevole interesse conoscerne sia l'origine che le motivazioni per cui, a volte, il ritmo mutazionale viene modificato. Le mutazioni possono manifestarsi senza alcuna causa apparente e sono in questo caso definite **spontanee**, oppure in seguito a sollecitazione ambientale o sperimentale, con agenti fisici o chimici, e sono definite **indotte**. Gli agenti responsabili della comparsa di mutazioni sono detti **agenti mutageni**. Non rilevando differenze nella qualità delle mutazioni spontanee o indotte e non apprezzando la causa diretta delle mutazioni spontanee, non rimane che considerarle come prodotte da agenti mutageni a noi sconosciuti, o forse a noi noti ma a cui per nostra carenza tecnica non riusciamo ad attribuire la responsabilità dell'evento mutageno. Nel valutare la probabile causa e dunque l'origine di una mutazione spontanea manca spesso la possibilità di identificare il rapporto di causa ed effetto. In proposito sembra che molte variazioni spontanee possano attribuirsi alla capacità dell'ambiente intracellulare di produrre azione mutagena piuttosto che ad eventuali composti mutageni, questo perché tali sostanze potrebbero essere il sottoprodotto metabolico di mutageni chimici ambientali. Oggi siamo in grado di interpretare come insorgono molte mutazioni spontanee: nella maggior parte dei casi si tratta di errori che si verificano durante la duplicazione del DNA e che sfuggono ai meccanismi conservatori di riparazione, i quali hanno il compito di controllare il buon andamento della polimerizzazione del DNA e, ove necessario, correggere le bozze: si tratta quindi di eventi casuali. La frequenza delle mutazioni naturali è comunque dipendente dalla costituzione genetica di ciascun individuo. Appare di grande rilievo per valutare le origini delle mutazioni spontanee, considerare che alcune parti del genoma hanno una certa capacità di movimento o di autonoma diversificazione; alcune sequenze nucleotidiche nel genoma possono essere excise ed inserite in posizioni differenti, altre possono subire crossing over ineguali oppure ancora alcuni dei frammenti scambiati possono andare perduti. Non tutti questi movimenti nel genoma sono apprezzati, molti sono a carico di sequenze di cui non conosciamo il significato, ma in ogni caso contribuiscono al rinnovamento del materiale genetico. Possiamo definire la **frequenza di mutazione** come il numero di volte in cui una certa mutazione si verifica in

una determinata popolazione di cellule o individui. Il **tasso di mutazione** è invece la probabilità che una particolare mutazione si verifichi nel tempo. Nell'uomo il tasso di mutazioni spontanee per geni singoli è compreso in un range che va da 10^{-4} a 10^{-6} /gene/generazione.

Errori durante la replicazione del DNA

La duplicazione del DNA è un momento molto delicato durante il quale l'apparato biosintetico non è solo impegnato nella polimerizzazione dei nucleotidi ma anche nel controllo qualitativo dell'intero processo. Se durante la sintesi si inseriscono nucleotidi che contengono basi azotate in **forma tautomerica**, l'errore è garantito. Infatti la cellula non è in grado di riparare un simile errore per il semplice fatto che non lo rileva. Ricordiamo brevemente che le basi possono esistere in due forme: una normale, che è in grado di formare legami idrogeno in **coppie canoniche**, ed un'altra, piuttosto rara, ma soprattutto transitoria, detta tautomerica. In questa forma rara le basi si comportano in modo strano perché formano coppie non canoniche; per esempio l'adenina, che comunemente forma una coppia canonica con la timina, quando è in forma tautomerica si appaia con la citosina. Una **guanina** in forma tautomerica, al momento della duplicazione non lega una citosina ma una timina, si comporta infatti come un'adenina. Una volta ritornata in forma normale si comporterà come una guanina ma nell'elica complementare era stata inserita una timina per cui, al terzo ciclo di replicazione si avranno tre molecole di DNA identiche a quello parentale ed una portatrice di una mutazione per transizione; infatti, la coppia GC del DNA è stata sostituita da una AT. Un altro meccanismo di insorgenza spontanea di una mutazione è dovuta alla protrusione dell'elica stampo. In questo caso lo stampo non è ben stirato, per cui la DNA polimerasi non legge una o più basi. La conseguenza è la mancanza dei nucleotidi complementari nell'elica di nuova sintesi. Tale delezione sarà riscontrabile quando questa elica sarà a sua volta duplicata. Altri meccanismi spontanei di insorgenza di mutazioni sono conseguenti a danneggiamenti del DNA quali la **depurinazione e la deamminazione** di alcune basi. Nella depurinazione, un nucleotide perde una guanina o una adenina, cioè si rompe il legame C-N glicosidico che lega la base azotata all'atomo di carbonio 1' dello zucchero. Questo danneggiamento, se non viene riparato, è fonte di mutazione perché, mancando la base azotata, in fase di replicazione nell'elica di nuova sintesi potrà essere incorporato un qualunque nucleotide. Anche la deamminazione è un danno che può avere conseguenze gravi per l'organismo, anzi forse irreparabili. Fintanto che la reazione produce, per esempio, un uracile dalla deamminazione della citosina, questo è visto come estraneo al DNA ed esistono sistemi che riparano il danno.

Mutazioni indotte

L'insorgere delle mutazioni, la nascita di un equilibrio fra il nuovo fenotipo e l'ambiente, la frequenza della variazione sembrano essere uno strano compromesso che l'evoluzione biologica avrebbe realizzato come politica comportamentale per l'affermazione dei viventi. Tale compromesso è comunque costantemente verificato e sottoposto nel tempo all'azione di forze selezionatrici. Le novità ad ogni costo risultano utili nel determinare le necessarie diversificazioni ma solo quelle che, una volta saggiate nelle loro potenzialità e poi scelte, sono stabilizzate a lungo termine. Tuttavia il tasso di mutazione viene significativamente incrementato qualora l'organismo venga sottoposto all'azione di agenti mutageni, siano essi chimici o fisici. Pertanto qualsiasi agente fisico o chimico in grado di fare aumentare significativamente la frequenza di mutazione oltre il tasso di mutazione spontanea, viene definito **mutageno**. I **mutageni chimici** conosciuti hanno un discreto grado di specificità, anche se non assoluta; alcuni però, avendo capacità di selezionare e modificare il bersaglio della loro azione, mostrano una elevata specificità che li rende utile strumento di identificazione della mutazione nel gene, ma anche mezzo per accedere al riconoscimento delle sequenze nucleotidiche. I meccanismi di azione dei mutageni sono un'interazione diretta con le molecole del DNA e favoriscono l'insorgenza di errori durante la replicazione, danneggiando e/o modificando la catena stampo. Il 5-bromouracile è un **analogo di base** in quanto derivato dalla timina per sostituzione del gruppo metile con il bromo. Quando è nello stato normale si comporta come una timina; quando è nello stato raro, si comporta come una citosina. L'aggiunta di 5-bromouracile alla miscela di reazione provoca il suo utilizzo come timina (nello stato normale). Nel momento in cui passa allo stato raro, si comporta da citosina legando una guanina. In definitiva, si osserva una transizione, che provocherà nella molecola di DNA la sostituzione della coppia TA (dello stato nativo) con la coppia CG. Gli **agenti alchilanti** sono un'altra categoria di sostanze in grado di indurre mutazioni in seguito a metilazione.

Modificando le basi presenti nel DNA nativo, gli agenti alchilanti fanno in modo che queste si comportino in modo diverso favorendo la formazione di coppie di basi non canoniche, con conseguenti mutazioni per transizione. Una guanina metilata si comporta come una adenina, una timina come una citosina. Gli **agenti intercalanti** sono composti capaci di inserirsi nella sequenza nucleotidica del DNA perché sono molecole costituite da tre anelli molto simili, nelle caratteristiche e nelle dimensioni, ad una coppia di basi purina-pirimidina; un esempio è rappresentato da alcuni coloranti acridinici oppure dalla proflavina. Il meccanismo di azione prevede l'inserimento di un agente intercalante in una molecola di DNA per cui, al momento della duplicazione, se tale agente rimane legato al filamento stampo, si induce l'inserzione oppure la delezione di un nucleotide a caso, quando è presente nell'elica di nuova sintesi, provocando quindi, una mutazione frameshift. In genere, se l'inserzione dell'agente intercalante avviene nell'elica nuova, durante la sintesi, quando quest'ultima si replicherà ancora, dopo aver perso l'agente intercalante subirà una delezione con conseguente mutazione frameshift. Altrettanto fortemente mutageni appaiono i **radicali liberi** che, essendo molecole o atomi contenenti un elettrone spaiato, sono sempre altamente reattivi; proprio a causa della loro proprietà di reagire con numerosissime molecole, producono danni irreversibili. Sono in grado di reagire anche con le basi azotate che verranno drasticamente modificate con conseguenti evidenti problemi. Per quanto riguarda **agenti mutageni fisici** va considerato che hanno sempre un ampio spettro d'azione, potendo agire direttamente o indirettamente sulle molecole del DNA. questi mutageni riescono a danneggiare, anche in maniera rilevante la struttura dei cromosomi e dell'apparato di divisione cellulare. Uno dei più potenti mutageni fisici è certamente la **luce ultravioletta (UV)**. La presenza di **dimeri di timina** viene rilevata come una distorsione della doppia elica e se possibile riparata. Laddove questo non avviene, la presenza del dimero impedisce la duplicazione del tratto di DNA in cui esso è contenuto. Questo accade perché le basi sono molto vicine fra loro e non si offrono come stampo. La capacità di protezione, comunque, è sempre relativa alle dosi subite, oltre che dimensionata alle condizioni ambientali; certamente gli esseri viventi non sono, perlomeno ancora sufficientemente selezionati per poter sopravvivere a disastri ambientali quali quelli di Hiroshima e Chernobyl. Le conseguenze degli agenti mutageni sia chimici che fisici, valutato che le azioni degli agenti fisici sono sempre particolarmente insidiose e diffuse, sia per soggetti esposti che per la progenie, quindi per la popolazione e la specie, si ritiene che sia più che opportuno prevenire eventuali irreparabili danni, realizzando ogni sistema atto a evitare la produzione e la generazione di mutageni oltre che all'esposizione agli stessi.

Medicina

SESSO E GENI

Determinazione del sesso nelle specie animali

Con l'espressione determinazione del sesso si intende la determinazione delle gonadi. Ciò non avviene in tutte le specie animali con un'unica modalità, né con lo stesso meccanismo. Anche se è ormai ben noto che alcuni cromosomi influenzano il sesso degli individui, è necessario specificare che questa è la condizione più diffusa, ma non l'unica perché nelle specie animali, che sviluppano un unico tipo di gonade, distinguiamo due grandi gruppi: quelle in cui il sesso è determinato geneticamente e quelle in cui non lo è. Negli uccelli e nei mammiferi l'assetto cromosomico che si determina al momento della fecondazione è responsabile del tipo di gonadi che si svilupperanno; in molte lucertole il differenziamento delle gonadi è funzione della temperatura ambientale a cui è sottoposto l'embrione nel trimestre centrale dello sviluppo. Questo meccanismo, noto come determinazione del sesso temperatura-dipendente, è ritenuto un precursore evolutivo della determinazione genotipica del sesso tipica di uccelli e mammiferi. In alcune specie di pesci la determinazione del sesso è reversibile così, al variare dei segnali ambientali e delle condizioni sociali gli animali possono cambiare di sesso. I pesci telostei, e qualche altro animale acquatico sviluppano sia gonadi maschili che femminili, sono quindi ermafroditi, ma ne adoperano solo una, almeno in un determinato periodo in seguito a segnali chimici oppure quando è necessario salvaguardare la sopravvivenza. Per quanto detto è allora opportuno fornire un quadro generale e sintetico delle più diffuse modalità di determinazione del sesso. Considereremo specie animali in cui il sesso è determinato geneticamente, in cui cioè i due sessi hanno differente corredo cromosomico. Il controllo di tale tipo di determinazione si attua attraverso due tipi di meccanismi: uno **dosaggio-dipendente (dosage dependent sex determination DSD)**, e l'altro dovuto alla presenza o meno di un **gene dominante (genetic sex determination GSD)**. Dovremo considerare il numero e la qualità dei gameti prodotti, i quali formeranno lo zigote dando l'avvio allo specifico differenziamento ed organogenesi. Infatti, negli animali in cui il sesso è determinato geneticamente (per esempio insetti, uccelli e mammiferi) esiste una coppia di cromosomi definiti **eterocromosomi o cromosomi sessuali (del sesso)** che è responsabile del differenziamento sessuale. Nel caso di **diagametia maschile** il maschio produce diverse classi gametiche, mentre nel caso di **diagametia femminile** sarà la femmina a produrre due diverse classi di gameti. È ovvio pertanto che nel primo caso è il maschio a determinare il sesso del nascituro, perché andrà a fecondare un solo tipo di ovocita (monogametico); nel secondo caso la prerogativa sarà della femmina. La diagametia maschile può essere realizzata con due diverse tipologie denominate:

- Tipo **lygaeus**, in cui il maschio ha cariotipo XY e quindi produrrà la metà dei gameti con il cromosoma Y e l'altra metà con il cromosoma X; la femmina avrà la condizione XX, omogametica. Questa condizione di diagametia è tipica dei mammiferi
- Tipo **protenor**, in cui il maschio ha cariotipo XO (manca cioè di uno degli eterocromosomi $2n-1$), mentre la femmina presenta la coppia XX ed è dunque omogametica. Questa situazione è caratteristica di grilli e cavallette.

La diagametia femminile è detta anche **Phragmatobia** prevede invece che i due eterocromosomi, indicati come cromosomi ZW, siano posseduti dalla femmina. Di conseguenza è la femmina che produce la metà dei gameti con il cromosoma Z e l'altra metà con W, mentre il maschio sarà omogametico ed avrà la coppia di cromosomi ZZ. Questa condizione è propria degli uccelli.

I cromosomi sessuali, X e Y nella maggior parte delle specie le femmine presentano due cromosomi X, mentre i maschi possiedono un cariotipo con la coppia XY. Dal punto di vista evolutivo si ritiene che i cromosomi sessuali X e Y si siano originati e differenziati da una coppia di autosomi. Sembra che il cromosoma Y si sia originato molto più tardivamente rispetto al cromosoma X. Questo naturalmente non significa che c'è stato un tempo in cui non esistevano maschi, ma piuttosto che il differenziamento gonadico in senso maschile non era determinato dalla presenza del cromosoma Y, ma piuttosto da qualcos'altro. Il sequenziamento del cromosoma Y ha chiarito che esso contiene numerose sequenze che sono simili a quelle oggi presenti sul cromosoma X e che nel cromosoma Y hanno perso la loro funzione originaria. Sul cromosoma X sono presenti circa 1100 geni; di questi, che originariamente erano presenti anche sul cromosoma Y, ne sono rimasti su quest'ultimo circa una settantina. Il cromosoma Y non è però soltanto un cromosoma X "degradato", infatti alcune mutazioni in alcuni geni presenti su di esso lo hanno fatto diventare fondamentale nel determinare il sesso maschile. Tutti gli studi hanno dimostrato che l'ovario non svolge un ruolo critico nel determinare il fenotipo femminile, questo infatti sarebbe il sesso già "predefinito" nello sviluppo degli organismi; ciò è confermato dal fatto che perché vi sia il corretto sviluppo dei caratteri sessuali maschili è necessaria la presenza del testicolo. Sarebbe che in epoca remota durante l'evoluzione del sesso, un frammento si sia staccato dal cromosoma X determinando da quel momento in poi un effetto di interazione negativa con gli altri cromosomi, un effetto tale da determinare un'espressione incompleta del fenotipo femminile: la creatura che chiamiamo maschio. È un dato inconfutabile che il sesso biologicamente forte è quello femminile, perché è bilanciato cromosomicamente. Il maschio è biologicamente più debole, tra l'altro va incontro con maggiore frequenza a mortalità perinatale. I cromosomi X e Y hanno morfologia e dimensioni profondamente diversa, e quindi hanno pochi geni in comune: soltanto quelli presenti nelle **regioni dette pseudoautosomali (PAR pseudo-autosomal region)** in cui è possibile il crossing over. Così questa coppia di cromosomi, pur essendo solo parzialmente omologa è comunque capace di appaiarsi regolarmente. Questa parziale omologia determinerà una peculiare modalità di trasmissione dei caratteri ereditari specificati da alleli che risiedono sui tratti differenziali dei cromosomi del sesso. Osservando il cariotipo di un maschio di Homo sapiens è evidente la differenza tra la dimensione dei cromosomi sessuali, che rispecchia quello che è il contenuto in nucleotidi del DNA: infatti il cromosoma X, sub metacentrico è costituito da circa 220 Mb, mentre Y acrocentrico da circa 55 Mb. Nei mammiferi la presenza del cromosoma Y (cariotipo XY) determina la formazione di testicoli, la sua assenza (cariotipo XX) induce il differenziamento della gonade primitiva in ovario. In Homo sapiens sono stati individuati alcuni soggetti di sesso maschile con cariotipo XX e corpo di Barr, portatori di una traslocazione che interessa la regione del braccio corto del cromosoma Y, così come si conoscono soggetti XY ma di sesso femminile perché il cromosoma Y presenta la delezione del braccio corto. Diverse mutazioni a carico di geni che nel cromosoma Y risiedono causano lo sviluppo di varianti fenotipiche (tutte le patologie che si manifestano come difetti nello sviluppo dei testicoli vengono denominate complessivamente "disgenesi gonadica"). Il **cromosoma Y**, nei mammiferi, è molto piccolo e presenta un braccio corto ed uno lungo; circa il 95% del cromosoma non contiene regioni di tipo PAR, quindi l'omologia con il cromosoma X è ridotta solo al 5%. Nel cromosoma Y vi sono circa 70 geni, alcuni codificanti per proteine necessarie per tutte le cellule, altre proteine funzionali soltanto nella gonade maschile; infatti le analisi hanno dimostrato che oltre alle regioni pseudoautosomali, localizzate alle estremità dei due bracci (una dozzina di geni), il cromosoma Y presenta una regione specifica dei maschi che viene definita **MSY (male specific Y region)**. Questa è un mosaico di regioni eterocromatiche e tre classi di regioni eucromatiche: regioni trasposte dal cromosoma X, regioni corrispondenti a sequenze del cromosoma C degenerate, sequenze satellite e regioni apiconiche. Queste ultime, originate da eventi di trasposizione di sequenze autosomiali, sono andate incontro ad eventi di duplicazione genica sino a costituire il 45% delle sequenze eucromatiche della regione MSY. All'interno di

queste regioni nel braccio corto, sono presenti geni espressi in maniera preferenziale nei testicoli, codificanti per proteine che saranno attive solo nella gonade. Tra queste proteine, nell'uomo, troviamo quella che è stata denominata fattore TDF (**testis determining factor**), più recentemente **proteina SRY** perché codificata dal gene SRY (**sex determining region of the Y chromosome**). Nei mammiferi la presenza del cromosoma Y, o meglio di una sua parte, è condizione necessaria ma non sufficiente per lo sviluppo di testicoli, infatti, SRY codifica per un fattore di trascrizione, appunto la proteina SRY, che organizza la gonade indifferenziata in testicolo funzionando, probabilmente, da interruttore molecolare capace di regolare l'espressione di altri geni, presenti sia sui cromosomi sessuali che sugli autosomi, coinvolti nel pathway della determinazione del sesso. Il gene SRY non presenta introni, la sequenza codificante, produce la proteina SRY. Questa contiene un dominio di legame per il DNA denominato HMG (**high mobility group**); tutte le proteine HMG, che sono state classificate come componenti non istoniche dei nucleosomi, presentano un dominio conservato per il legame con il DNA, che è stato denominato **HMG box**. La proteina SRY stabilisce un legame sito-specifico con il DNA proprio tramite tale dominio, interagisce, infatti, con il solco minore della doppia elica. Praticamente SRY si lega a regioni del DNA lineare correlate a geni essenziali per il differenziamento gonadico, inducendo un ripiegamento della molecola; ciò avvicinerebbe fattore di trascrizione legati a tratti di DNA distanti tra loro, determinando l'attivazione o la repressione della trascrizione di geni bersaglio. La sequenza HMG del gene sry è necessaria per la regolazione che consente che la gonade indifferenziata si differenzi in testicolo, ma non è sufficiente; infatti in tale processo sono coinvolti anche altri geni, sia autosomici che localizzati sul cromosoma X, tra cui una famiglia che contiene sempre la HMG box e per questo denominati geni **Sox (Sry-related HMG box containing genes)** in particolare sox9 e sox3 nel topo (nell'uomo SOX9 e SOX3). Si ritiene che SOX9 rivesta un ruolo centrale nella determinazione del sesso maschile dando inizio, una volta attivato da SRY, ad una cascata di eventi che induce la formazione del testicolo, a condizione però che nel tessuto gonadico sia normale il dosaggio della corrispondente proteina. Molte delle informazioni sullo sviluppo dei caratteri sessuali sono state desunte da studi di mutazioni, sia murine che umane, che hanno contribuito ad identificare eventuali altri geni coinvolti, più o meno direttamente, in tali processi differenziativi. Tra questi geni ne citiamo alcuni di maggiore interesse: il gruppo **Tda (testis determining autosomal loci)** il **DMT1 (DNA binding motif testis gene 1)**, espresso solo nel testicolo, l'**Amh**, che nell'embrione maschile produce l'ormone per la regressione dei dotti di Muller (**anti mullerian hormone**); i geni coinvolti nella spermatogenesi, tra cui **SF1**, che codifica per un recettore nucleare, il fattore steroidogenico 1 (SF1 steroidogenic factor 1). Per quanto poi attiene la perdita di funzioni ipotizzata per molti geni presenti sul cromosoma Y, probabilmente essa è dovuta all'impossibilità di attuare meccanismi di riparo che utilizzino il cromosoma omologo, vista la ridotta dimensione delle regioni di omologia tra X e Y. I geni espressi in maniera esclusiva nelle gonadi maschili, contrariamente a quelli che mostrano omologia con il cromosoma X, sono presenti in copie multiple sul cromosoma Y ed è stato dimostrato che questi geni possono andare incontro a meccanismi di conversione genica in grado di preservarli dall'accumulo di mutazioni deleterie. Inoltre, la pressione selettiva esercitata dall'ambiente dovrebbe rallentare il processo di degradazione del cromosoma Y. Il **cromosoma X** è stato identificato con questa lettera dell'alfabeto perché sconosciuto, e tale è rimasto per molti anni. È un cromosoma speciale che, nelle femmine di tutti i mammiferi, viene anche parzialmente inattivato; il cromosoma X ha infatti sviluppato un sistema di silenziamento per evitare che nelle femmine vi sia un'eccessiva espressione dei geni, e quindi un surplus di prodotto rispetto al maschio. Tale fenomeno è noto anche come **effetto di compensazione di dose**, ha una sua evidenza molecolare, ma anche citologica; infatti i nuclei interfascici di buona parte delle cellule somatiche delle femmine dei mammiferi mostrano una zolla di eterocromatina (di solito adesa alla membrana nucleare) denominata **corpo di Barr**, dal nome che per primo la identificò. Questa regione di cromatina corrisponde ad uno dei due cromosomi X che si è

eterocromatinizzato ed è dunque funzionalmente inattivo; in genere il numero dei corpi di Barr è pari al numero dei cromosomi X meno 1. Quindi se il cariotipo presenta tre X si osservano due corpi di Barr e un solo cromosoma X attivo; se si hanno quattro X si osserveranno 3 corpi di Barr e così via. Ovviamente, i corpi di Barr mancano nel maschio. Contestualmente a tale evidenza, in genere, si osserva circa il 5% dei leucociti polimorfonucleati con un lobo a struttura tipica detta **drumstick** (a mazza di tamburo). Ancora il cromosoma X inattivato durante l'interfase va incontro tardivamente a duplicazione. Precocemente durante lo sviluppo dell'embrione, che si avvicina allo sviluppo femminile, cioè con cellule che presentano la coppia di cromosomi XX le cellule "decidono" a caso quale cromosoma X inattivare. Tale inattivazione si verifica intorno al 16° giorno di vita fetale, in tutte le cellule degli embrioni femminili tranne in quelle che compongono le membrane extraembrionali, che formeranno amnios, placenta, e funicolo ombelicale; in questi tessuti infatti sarà inattivato per sempre il cromosoma X di origine paterna. La precoce e casuale scelta di inattivare uno dei cromosomi X in una determinata cellula risulta permanente e ne consegue che tutte le cellule derivante da tale cellula avranno sempre lo stesso cromosoma X inattivo. Questo fatto ha una ricaduta fondamentale sull'espressione di geni localizzati sul cromosoma X, perché l'inattivazione, infatti, produce cloni di cellule che sono in una condizione di **mosaicismo funzionale**, come è facilmente evidenziabile se si analizza l'espressione di caratteri specificati da alleli che sono localizzati sul cromosoma X. Le femmine possono per questo essere considerate dei **mosaici genetici** perché i tessuti esprimono contenuti genici differenti. Per esempio, se una donna è eterozigote per un gene mutato che determina una patologia legata al sesso, a fenotipo recessivo, quale può essere il favismo, l'allele normale, "selvatico", si esprimerà soltanto nelle cellule in cui sia stato silenziato il cromosoma X portatore dell'allele mutato. Di conseguenza la gravità della malattia dipenderà dalla percentuale di cellule nelle quali è espresso il gene normale. Numerosi studi hanno dato sufficiente giustificazione dei meccanismi molecolari che portano all'inattivazione di uno dei cromosomi X: essa è indotta dall'azione di un gene denominato **XIST (X inactivation specific transcript)** che controlla l'inizio e la propagazione dell'inattivazione. XIST è localizzato sul braccio lungo del cromosoma X, localizzato in una zona chiamata XIC, X inactivation centre. Perché tale inattivazione si possa realizzare sembra che vi sia la necessità che i due cromosomi X siano particolarmente vicini, in modo che le regioni coinvolte nel sistema di regolazione illustrato siano realmente in contatto fisico. Tale regolazione sembra anche essere correlata al livello basso di acetilazione e contestualmente alto di metilazione degli istoni dei tratti genici silenziati del cromosoma X. Da tanti studi di localizzazione dei geni sul cromosoma X deriva anche un dato curioso: sembrerebbe infatti che su di esso siano presenti molti geni che codificano proteine fondamentali per la funzionalità del cervello. A supporto di ciò è stato evidenziato che tra gli individui affetti da turbe mentali il numero dei maschi è maggiore di quello delle femmine; si potrebbe dire che il sesso forte, cioè la donna, ha una grave responsabilità: pur avendo spesso nel cromosoma X molti alleli mutati patologici, non si ammala, almeno per patologie legate al sesso, ma trasmette la malattia ai figli maschi! Questa condizione, come vedremo successivamente è conseguenza dello stato di emizigosi del maschio che quindi frequentemente manifesta gravi patologie ereditate dalla madre. Tra le centinaia di geni del cromosoma X, solo pochi hanno un'azione diretta sulla determinazione del sesso, e interagiscono con geni autosomici; tra di essi uno dei geni definibili "femminili", perché risulta fondamentale per la formazione dell'ovario, è l' **RSPO1 (R-spondina 1**, localizzato sul cromosoma 1) e che gli stessi ricercatori hanno definito *l'alter ego femminile del gene SRY*.

In definitiva, il sesso è un carattere ereditario, anzi un complesso di caratteri ereditari, alcuni dei quali, fondamentali, consentono la formazione delle gonadi: tali caratteri sono specificati da più geni che risiedono sui cromosomi sessuali e che comunque sono correlati in un'attività di regolazione con altri geni autosomici. Non è ancora del tutto chiaro come questi geni interagiscano, determinino e controllino lo sviluppo di tutti i caratteri sessuali.

VARIAZIONE DEL NUMERO DI CROMOSOMI

Il numero cromosomico caratteristico delle specie è rappresentato dal set **aploide** dei cromosomi, designato con n , presente nei gameti; più comunemente però si usa riferire alla specie il numero cromosomico $2n$, che corrisponde all'assetto **diploide**, cioè alla condizione presente nelle cellule somatiche, così come nei goni, cellule precursori della linea germinale che devono iniziare il processo meiotico. Un organismo si origina infatti dallo zigote, frutto dell'unione di due gameti che hanno fuso i due patrimoni cromosomici aploidi, quello materno e paterno, restaurando la diploidia. Gli individui di una specie che portano nelle proprie cellule un numero cromosomico differente da quello caratteristico vengono detto **eterodiploidi ed eteroploidia** è la variazione numerica. Tali assetti diversi, che sono la conseguenza di errori della distribuzione dei cromosomi durante le divisioni cellulari, sono riconducibili a due categorie: *euploidia* e *aneuploidia*. Il termine **euploidia** indica quella condizione in cui il numero cromosomico è variato per interi set aploidi. Per **aneuploidia** si intende la variazione del numero dei cromosomi con riferimento alla singola coppia o unità cromosomica; tale fenomeno è ristretto ad uno o pochi cromosomi. Gli individui e/o le cellule sono detti **monoploidi** quando presentano soltanto il numero n di cromosomi caratteristico della specie. La condizione di **poliploidia** invece, prevede la variazione di numero per interi multipli del set aploide. In questo caso gli individui, e/o le cellule mutate sono detti **poliploidi**, e possono essere indicati specificatamente come triploidi, tetraploidi, pentaploidi, rispettivamente $3n$, $4n$, $5n$. generalmente la poliploidia si origina allorché durante la divisione cellulare, alla cariocinesi non fa seguito la citocinesi. La **endomitosi** rappresenta un meccanismo capace di determinare poliploidia: accade infatti che durante la divisione cellulare non vi sia un regolare coinvolgimento dell'apparato mitotico, per cui l'involucro nucleare non si dissolve e quindi il processo di separazione dei cromatidi avviene dentro il nucleo. Per mancata formazione del fuso mitotico si ha la caratteristica condizione di **endoreduplicazione** per cui ad ogni divisione cellulare i cromosomi duplicati non si separano (**politenia**). In questo caso, i cromosomi appaiono particolarmente inspessiti perché in poche replicazioni riescono ad essere costituiti persino da un migliaio di filamenti cromatidici, visto che i cromatidi fratelli non migrano, ma rimangono trattenuti insieme dal centromero. La poliploidia non è una condizione molto diffusa nel regno animale, anche se la si può osservare in qualche specie di pesce del nord America, o in qualche vegetale. In ogni caso, se il numero di assetti cromosomici è un multiplo di due è possibile che i soggetti siano fertili, almeno parzialmente; se invece il numero di assetti cromosomici è dispari si ha una condizione di sterilità. Nella specie umana, la triploidia e la tetraploidia sono condizioni non compatibili con la vita. Comunque nel fegato rigenerato è possibile osservare cellule con assetto $4n$. abbiamo definito la variazione del numero dei cromosomi per singole unità come *aneuploidia*, pertanto si può avere un range piuttosto ampio di quadro cromosomici alternativi, che vanno dalla **nullisomia** (assenza di un'intera coppia di omologhi, $2n - 2$) alle **doppie tetrasomie** ($2n + 2 + 2$) ed oltre. Di solito una cellula aneuploide si origina durante la I o la II divisione meiotica, per anomalie nella distribuzione dei cromosomi o dei cromatidi ai poli del fuso, ma anche errori di ripartizione dei cromatidi mitotici produrranno analoghe conseguenze. Una aneuploidia può essere determinata, in anafase, da fenomeni di non disgiunzione, sia dei cromosomi appaiati in tetrade in cui non si verifica l'elisione dei chiasmi, sia per una mancata scissione del centromero e quindi della separazione dei cromatidi fratelli. Le cellule prodotte dalla divisione conterranno entrambi i componenti di una coppia di omologhi l'una, nessuno dei due cromosomi l'altra.

Variazione del numero di cromosomi nella specie umana

Gli studi citogenetici per la caratterizzazione del cariotipo umano hanno avuto grande impulso perché molte variazioni cromosomiche, producendo quadri clinici severi quasi sempre correlati a deficit neurologico, rivestono particolare significato etico - sociale. In questo paragrafo si tratta di trisomie le cui conseguenze fenotipiche sono fondamentalmente provocate dall'azione cumulativa di dosaggi genici anomali. È opportuno ricordare che le cellule somatiche degli individui della specie umana presentano 46 cromosomi, 22 coppie di autosomi ed una coppia di eterosomi, mentre le cellule gametiche, avranno il set aploide costituito da 23 cromosomi. Come è noto le femmine producono omogameti, cioè tutto con stesso cariotipo, 23,X; mentre i maschi sono etero gametici perché producono due classi di spermatozoi: 23,X e 23,Y. Numerose sono le condizioni di aneuploidia che sono identificate nella specie umana, tra queste le note monosomie e trisomie compatibili con la vita. Questi assetti cromosomici sbilanciati sono la conseguenza del contributo anomalo di una delle due cellule gametiche nella formazione dello zigote da cui si è sviluppato il soggetto mutato. Infatti, per esempio, un individuo con cariotipo a 47 cromosomi, è la conseguenza della fusione di gameti di cui uno porta un cromosoma in più. Analogamente, se la cellula dovesse avere un cariotipo di 45 cromosomi sarebbe frutto di due gameti di cui uno dei quali deficiava di un cromosoma. Quanto appena indicato, è sempre da correlare con le cause delle condizioni di aneuploidia che, come si è già detto, più frequentemente dipendono da errori di non disgiunzione meiotica a carico degli autosomi (**aneuploidie autosomiche**) o dei cromosomi sessuali (**aneuploidie sessuali**), con una notevole variazione durante le fasi dello sviluppo e comunque quasi sempre in relazione all'età materna.

Aneuploidie autosomiche A causa dell'alto dosaggio genico la maggior parte delle trisomie degli autosomi e la totalità delle monosomie sono così gravi da essere incompatibili con la vita. Queste anomalie del numero di autosomi, possono portare sia al mancato impianto dell'embrione, già a livello di blastocisti, sia all'aborto spontaneo, oppure alla formazione di embrioni con gravi difetti organo genetici, con presenza di ulteriori cromosomi soprannumerari, che determinano la morte del feto. Alcune trisomie degli autosomi sono compatibili con un completo sviluppo dell'embrione e con la vita, anche se i bambini nati hanno quasi sempre un fenotipo con gravi anomalie. Le più note condizioni di trisomia degli autosomi riguardano il cromosoma 21, sindrome di Down, il cromosoma 18, sindrome di Edwards, ed il cromosoma 13, sindrome di Patau.

Trisomia del cromosoma 21: Tra le aneuploidie autosomiche, e forse in assoluto, la trisomia del cromosoma 21 costituisce la più comune variazione del set cromosomico riscontrabile nella specie umana; essa da origine alla cosiddetta **sindrome di Down**. Tale condizione si manifesta con una notevole varietà di cariotipi; appare però largamente prevalente nella popolazione il cariotipo 47,XX +21 e 47,XY +21, detto **trisomia primaria del cromosoma 21** per distinguerlo dalla cosiddetta trisomia secondaria, una condizione frutto di una traslocazione robertsoniana. Comunemente la forma canonica di trisomia 21 è detta libera, mentre è detta associata alla traslocazione la forma di trisomia secondaria. In circa il 2% dei casi soggetti Down che mostrano linee cellulari somatiche a diverso cariotipo, sia normale che trisomico, costituendo un mosaico cromosomico e spesso un fenotipo lieve (46XX/ 47XX +21). Non appaiono del tutto chiarite le reali motivazioni che causano la trisomia del 21. Tale condizione si osserva però con una frequenza che varia in funzione dell'età delle madri. Queste, infatti, con elevata frequenza, generano figli trisomici in quanto avrebbero una maggiore possibilità di produrre ovociti anomali per errori di disgiunzione primaria (avvenuta in prima divisione meiotica). Sembra comunque che cambiamenti ormonali che hanno luogo durante la vita delle donne possano innalzare il rischio di anomalie cromosomiche. In particolare si è osservato che la frequenza di nati vivi con sindrome di Down pari a 1/1700 e 1/1400 rispettivamente per le

madri al di sotto di 20 anni e 20-30 anni, a 1/700 per le donne tra i 30-35 anni e a 1/100 oltre i 40 anni. Il rischio di generare un figlio con la sindrome di Down aumenta poi drammaticamente quando l'età della donna supera i 45 (1/15). Il quadro clinico dei soggetti Down è ben definito e l'espressione fenotipica molto conosciuta, ma nonostante sembri stereotipata, si mostra invece particolarmente variabile. Comunque anche se nei singoli individui i segni della sindrome possono essere numericamente molto diversi, alcuni di essi sono caratteristici e quindi sempre presenti; fra questi: brachicefalia, viso tondeggiante, obliquità della rima palpebrale, epicanto cioè una piccola plica cutanea dell'occhio che determina la caratteristica facies orientaleggiante (per cui la sindrome era chiamata *mongolismo*), sella nasale piatta, lingua larga (spesso protrusa), palato stretto, padiglioni auricolari piegati, ipotonia muscolare, mani piccole e dita brevi, dermatoglifi digitali, e palmari peculiari così come sotto il palmo delle mani, frequenti cardiopatie, modesta difesa immunitaria, di norma statura più bassa della media a causa della mancata maturazione dell'apparato scheletrico. In conseguenza delle molte irregolarità che si hanno durante lo sviluppo, che portano alla riduzione dei neuroni corticali, alla precoce degenerazione neuronale, all'insufficiente mielinizzazione dei nervi periferici, in maniera peculiare, tutti i soggetti di Down presentano un ritardo mentale più o meno grave (la sindrome di Down è da considerarsi la causa più frequente del ritardo mentale nella popolazione). Questo si accompagna a rilevanti deficit nelle capacità motorie e può portare ad uno stato di atrofia cerebrale, se i soggetti non vengono opportunamente assistiti sotto il profilo psicologico e riabilitativo; gli individui con sindrome di Down, per una serie di numerose alterazioni fenotipiche e per molte concause, hanno una aspettativa di vita inferiore rispetto alla popolazione non affetta, sebbene la mortalità di questi soggetti si sia oggi ridotta, grazie ad una più diffusa attenzione alla prevenzione di patologie correlate, alle aumentate possibilità di interventi e procedure mediche, tra cui, non ultima, la difesa farmacologica da infezioni. Nonostante l'età media sia di circa 27 anni, non è difficile trovare individui con trisomia 21 che vivono fino ad un'età compresa tra i 40 e i 50 anni. Per quanto riguarda l'aspetto sessuale, i maschi in genere, mostrano modesta attività sessuale, e difficilmente si riproducono, mentre non sono infrequenti casi di donne che generano figli. Tuttavia, a causa della non disgiunzione secondaria ci si attende che metà dei figli sia affetta dalla stessa sindrome: invece si osserva che solo il 20% dei nati da madri down ha la stessa trisomia del 21, mentre il restante 80% è costituito da figli perfettamente normali. Questo dato è riconducibile al fatto che gli embrioni con trisomia del 21 vengono, con alta frequenza, abortiti spontaneamente.

Trisomia del cromosoma 18: Fra le altre comuni trisomie autosomiche vi sono quelle che interessano i gruppi di cromosomi 13-15 e 17-18; particolarmente nota è la trisomia del 18 che provoca la cosiddetta **sindrome di Edwards**. La frequenza con cui si riscontrano individui affetti da questa patologia è di 1/6500 nati vivi; mentre tra i sessi si osserva un rapporto di 4 maschi/1 femmina. Anche nel caso della sindrome di Edwards si rileva una maggiore incidenza della trisomia del 18 con l'aumento dell'età della madre. La sindrome, caratterizzata da un complesso di malformazioni rilevanti e diffuse nell'organismo, con gravi condizioni di ritardo mentale e motorio, è a prognosi infausta e sopravvivenza intorno ai 3 mesi per i maschi e circa 9 mesi per le femmine, soprattutto a causa delle marcate condizioni di grave cardiopatia ed encefalopatia. I soggetti con sindrome di Edwards presentano microcefalia, cranio allungato, orecchie malformate, e con un basso punto di inserzione, mandibola e cavità orale più piccole della norma, ed altre malformazioni somatiche. Gli studi citogenetici hanno evidenziato: che la disgiunzione, causa della trisomia 18, può essere meiotica e mitotica; che i genitori di soggetti con tale sindrome hanno un'età media tra i 32 e i 34 anni con cariotipo normale; che la disparità tra i sessi potrebbe essere determinata da una selezione gametica a vantaggio degli spermatozoi 24,X +18; che tale aneuploidia è spesso associata ad altre che interessano soprattutto i cromosomi sessuali (48XXX +18; 48XXY +18; 49XXXY +18).

Trisomia del cromosoma 13: Anche questa trisomia libera (47, XX, +13; 47,XY +13), che provoca il quadro clinico detto **sindrome di Patau**, ed ha una frequenza di circa 1/10.000 nati vivi si manifesta con delle gravi malformazioni congenite, evidente ritardo psicomotorio, con aspettativa di vita di circa 3-4 mesi sebbene alla nascita si assista ad una crescita all'apparenza normale. Si riscontra ancora una volta l'aumento dell'incidenza in rapporto all'età avanzata della madre, mentre maschi e femmine hanno la stessa probabilità di esserne interessati. Gli individui con trisomia 13 presentano il cranio e gli occhi più piccoli della norma, le orecchie malformate, labio-palato-schisi (labro leporino con fessurazione del palato), dita malformate e polidattilia, separazione degli emisferi cerebrali incompleta o assente, irregolarità nello sviluppo delle strutture scheletriche, molto frequentemente difetti intestinali, cardiaci, renali, e sordità. La sindrome di Patau, in circa il 12% dei casi, può essere determinata da una traslocazione robertsoniana.

Aneuploidie sessuali queste variazioni del numero dei cromosomi sessuali, a differenza di quelle autosomiche, sono molto meglio tollerate dall'organismo umano, tanto che i relativi difetti fenotipici sono meno drammatici rispetto ad equivalenti variazioni di numero degli autosomi. In genere, infatti, producono alterazioni del fenotipo sessuale ed infertilità, modificando alcune caratteristiche ormonali e somatiche connesse al regolare accrescimento dei soggetti, quasi sempre non sono letali anche se, per la sopravvivenza è necessaria la presenza nelle cellule di almeno un cromosoma X. Ciò nonostante, il quadro generale fenotipico, somatico e clinico, pur essendo ormai noto risulta complesso ed i soggetti con tali anomalie in alcuni casi, ormai limitati, possono avere rapporti sociali e vita di relazione problematica, spesso con l'altro sesso. La differenza nella gravità degli effetti fenotipici tra aneuploidie autosomiche e sessuali sembra sia da correlare a due principali motivi: a) il modesto dosaggio genetico del cromosoma Y (pochi geni, generalmente quelli relativi alla mascolinità), b) l'effetto di compensazione di dose genica che si ha tramite la eterocromatinizzazione di uno dei cromosomi X. Le femmine, ad esempio con la trisomia dell'X hanno un fenotipo praticamente normale, con irregolarità nel numero di cicli mestruali ed insorgenza precoce di menopausa; sono quindi fertili ma il concepimento risulta spesso difficile. Si tratta di una aneuploidia, con frequenza di circa 1/1200 femmine, che, nonostante sia senza significative conseguenze negative, occasionalmente determina lieve ritardo mentale.

Trisomia XXY: Una delle più frequenti aneuploidie dei cromosomi sessuali è rappresentata dalla trisomia 47, XXY, detta **sindrome di Klinefelter**, che infatti ha una incidenza di circa 1 su 1000 maschi nati. La facies caratteristica ed il relativo quadro clinico sono evidenziabili in epoca successiva alla pubertà e sono praticamente riconducibili a difetti dello sviluppo sessuale. I soggetti sono di sesso maschile, in quanto presentano gonadi maschili, i testicoli, anche se di ridotte dimensioni e spesso vincolati all'addome o addirittura in cavità; sono comunque sterili per il mancato sviluppo dei testicoli che non consente la spermatogenesi (azoospermia da difetti strutturali dei tessuti dei tubuli seminiferi). Gli individui Klinefelter sono longilinei, di alta statura con ossa lunghe di rilevanti dimensioni, mostrano evidente ginecomastia, disposizione del tessuto adiposo dei peli nel corpo e tono della voce simili a quelli femminili, normale sviluppo del pene, carenza di ormoni maschili. Frequentemente questi soggetti hanno lievi deficit neurologici, ma comunque tali da determinare spesso un quoziente intellettuale ridotto. Nonostante i citati limiti, in genere i soggetti affetti da sindrome di Klinefelter hanno una vita di relazione che può essere considerata normale. Ancora una volta l'errore che porta alla trisomia sembra sia da correlare all'età della madre. La maggior parte dei Klinefelter sarebbero generati da uno spermatozoo normale e da un ovocita 24XX. Non è comunque da escludere la formazione di zigoti trisomici per fusione di spermatozoi 24 XY con un uovo 23X. In questo ultimo caso l'errore si realizzerebbe alla prima divisione meiotica. La sindrome di Klinefelter può manifestarsi a causa di molte varianti nel set cromosomico sbilanciato, sono infatti note le condizioni di tetra o pentasomia 48XXXY, 48XXYY, 49XXXXY.

Trisomia XYY: Questa anomalia del numero dei cromosomi sessuali si manifesta con condizioni somatiche alterate di lieve entità, il più delle volte senza conseguenze cliniche. I soggetti sono di sesso maschile, presentano un secondo cromosoma Y, quindi cariotipo 47 XYY; in genere sono caratterizzati da un'altezza superiore alla media, senza sintomi fisici apprezzabili. L'incidenza tra i neonati è di circa 1/950 maschi.

Monosomia del cromosoma X: Si tratta di una aneuploidia tra le più ricorrenti, definita **sindrome di Turner** ed è dovuta alla monosomia 45X0. Negli adulti appare con una frequenza di 3/10.000 cioè con una prevalenza ridotta, se comparata ad altre anomalie di numero dei cromosomi sessuali, il che può essere correlato ad una condizione subletale rilevabile dalla evidenza che nella maggior parte degli aborti spontanei si osserva monosomia 45X0; questo nonostante non vi sia alcuna spiegazione plausibile per tale fenomeno di elevata letalità prenatale. Gli individui con sindrome di Turner sono fenotipicamente femmine, perché presentano le gonadi femminili anche se ipoplastiche, o più frequentemente, costituite soltanto da strisce di stroma connettivale; sono quindi sterili, con amenorrea primaria, hanno utero ipoplastico ma normali genitali esterni femminili. Si tratta di soggetti che presentano aspetti somatici caratteristici: bassa statura, collo taurino con pterigio, rime palpebrali rivolte verso il basso, irregolarità scheletriche, costrizione aortica, capezzoli rivolti lateralmente, tono della voce cupo e mascolino ed in genere modesto sviluppo dei caratteri sessuali secondari anche perché, non essendovi gonadi ben sviluppate, sono mancanti i relativi ormoni. Non sono evidenziabili condizioni di ritardo mentale significative, a parte alcuni casi controversi. Circa la causa di questa aneuploidia si ritiene che la maggior parte dei casi derivi da contributo di spermatozoi privi di cromosoma sessuale; spesso è stato infatti evidenziato che l'unico cromosoma sia proprio di origine materna. Pertanto l'errore di non disgiunzione avverrebbe durante la spermatogenesi.

Mosaicismo cromosomico e poliploidia

Nell'illustrare le variazioni di numero dell'assetto cromosomico appare opportuno fare riferimento anche alle condizioni di mosaicismo cromosomico, conseguenti ad errori di non disgiunzione che si verificano durante le prime divisioni mitotiche post-zigotiche. In questo caso, il soma dell'organismo presenterà linee cellulari diverse per assetto cromosomico; difatti, in conseguenza di una non disgiunzione alla prima divisione dello zigote, i primi due blastomeri e tutte le cellule derivate da ciascuno di essi, conterranno 47 cromosomi l'uno e 45 l'altro ($2n + 1/2n - 1$). I soggetti con mosaicismi presentano spesso situazioni cliniche più lievi rispetto a quelle osservabili in individui con la singola situazione di aneuploidia; in ogni caso la gravità di queste forme è direttamente correlata al numero delle diverse linee cellulari mutate ed eventualmente, a quelle con assetto cromosomico normale. Il rilevamento delle condizioni di mosaicismo, che può interessare sia i cromosomi autosomici che quelli sessuali, è spesso difficoltoso se le indagini sono limitate ad uno o pochi tessuti specifici, come frequentemente avviene nel caso di indagini su soggetti della specie umana. La condizione di **poliploidia** che può essere documentata nell'uomo è relativa soltanto ad alcuni assetti cromosomici triploidi o tetraploidi, mostrati da alcune linee cellulari nel soma di individui portatori di mosaici cromosomici; le situazioni di poliploidia di tutte le cellule dell'organismo nella specie umana non sono compatibili con la vita.

**FISH: fluorescent in situ Hybridation -> si basa sulla complementarità delle basi azotate dei filamenti di DNA con delle sonde correlate; il principio prevede l'aggiunta diretta o indiretta di un colorante fluorescente (fluorocromo) ad una sonda a DNA nota che viene fatta ibridare con la sua regione complementare del cromosoma. Si lavora su cromosomi metafisici, e l'osservazione viene effettuata al microscopio a fluorescenza.*

Riparazione del DNA

Molte mutazioni si generano durante la replicazione del DNA; ciò avviene a causa di errori commessi dalla DNA polimerasi, nonostante una certa percentuale di tali errori venga riconosciuta e riparata ad opera di una subunità dell'enzima con funzione di correzione denominata **correttore di bozze o proofreading**. Inoltre il DNA è spesso soggetto a modifiche chimiche spontanee più o meno favorite dalle condizioni ambientali; tra queste la deaminazione della citosina, e la depurinazione. Infine il DNA viene danneggiato in seguito all'esposizione alle radiazioni ambientali (ionizzato o raggi UV) o a metaboliti reattivi. Per contrastare l'azione di questi mutageni i sistemi biologici hanno evoluto dei meccanismi atti a mantenere integra la corretta informazione genetica; infatti si tratta di uno o più sistemi di **riparo del DNA** capaci di identificare e correggere le anomalie presenti nella sequenza del DNA. Alcuni meccanismi funzionano già durante la duplicazione del DNA ed altri agiscono dopo la replicazione. Quando la cellula invecchia, tuttavia, la velocità di riparazione del DNA rallenta fino a che non può più tenere il passo all'insorgenza di nuovi danni al DNA. A quel punto la cellula va incontro ad uno dei tre possibili destini:

- a. Uno stato di dormienza irreversibile, la senescenza
- b. Il "suicidio", l'apoptosi
- c. La *carcinogenesi* (formazione delle cellule cancerose)

Negli organismi pluricellulari la maggior parte delle cellule diviene dapprima senescente per poi dopo un danno irreparabile al DNA andare incontro ad apoptosi; questa rappresenta un meccanismo di ultima istanza per prevenire la trasformazione carcinogenica di una cellula pericolosa per l'organismo. Quando le cellule divengono senescenti, le alterazioni nelle biosintesi e nel turnover determinano una minore efficienza nel loro funzionamento, causando inevitabilmente malattia; quindi la capacità di riparo del DNA in una cellula risulta vitale per il normale funzionamento di tutto l'organismo.

Meccanismi di riparo del DNA

Sebbene la maggior parte delle mutazioni originatisi nelle cellule venano immediatamente riparate tramite l'attività di proofreading della DNA polimerasi e indipendentemente da questo meccanismo operano alcuni enzimi specifici capaci di riconoscere le modifiche chimiche delle basi azotate e quindi di ripararle; tra questi la *metil guanina metil trasferasi MGMT* che rimuove specificatamente gruppi metilici dalla guanina o la *fotoliasi*, che nei batteri rompe il legame prodotto dai raggi UV tra basi adiacenti di timina. La peculiarità di questi meccanismi diretti è che non richiedono nessun filamento stampo per il processo di riparazione. Altri meccanismi si attuano in funzione del tipo di danno presente nella struttura della doppia elica del DNA in quanto la cellula è in grado di rilevare i danni che alternano la configurazione spaziale dell'elica. La strategia di riparo prevede dapprima la localizzazione del danno e quindi il reclutamento di molecole specifiche che si legano sul sito di lesione, favorendo il legame di altre molecole, e quindi la formazione di un complesso che rende possibile il riparo. I tipi di molecole coinvolte così come lo specifico meccanismo di riparo dipendono da vari fattori correlati al tipo di danno, alla fase del ciclo cellulare, etc.

Danno e riparo nel singolo filamento Quando solo uno dei due filamenti di un cromosoma presenta un difetto, l'altro filamento può essere utilizzato come stampo per guidare la correzione. Principalmente si assiste a meccanismi di riparo per escissione, che rimuovono il nucleotide danneggiato sostituendolo con

un altro complementare al nucleotide presente nel DNA non danneggiato. Il meccanismo di **riparo per escissione di base** (BER) coinvolge un singolo nucleotide, danneggiato da ossidazione, alchilazione, idrolisi oppure deaminazione. Questo tipo di riparazione avviene in tre fasi:

1. La rimozione della base azotata danneggiata grazie all'azione di specifiche DNA glicosilasi e del desossiribosio fosfato ad opera di una endonucleasi
2. Il riempimento del gap con il nucleotide corretto ad opera della DNA polimerasi beta
3. La formazione, tramite una specifica DNA ligasi, del legame fosfodiesterico che elimina il nick.

Il meccanismo di **riparo per escissione di nucleotidi** (NER) si attua per risolvere danni che coinvolgono filamenti lunghi da 2 a 30 nucleotidi come quelli responsabili di una voluminosa distorsione dell'elica, dovuto per esempio alla costituzione dimeri di timina. Il meccanismo di azione prevede cinque fasi:

1. Il danno è riconosciuto da fattori proteici UvrA e UvrB che si assemblano su di esso
2. UvrC si lega a UvrB e UvrA viene rilasciato
3. Il complesso UvrC/B opera tagli alle estremità 5' e 3' del filamento danneggiato
4. UvrB ed UvrC vengono rilasciati, mentre UvrD si lega all'estremo 5' per svolgere la regione interessata al riparo. Esso rilascia il filamento danneggiato. La DNA polimerasi I riempie l'interruzione
5. L'azione della DNA ligasi ripristina il legame fosfodiesterico

Una forma specializzata di NER, nota come **riparazione associata alla trascrizione (TCR)**, utilizza enzimi ad alta priorità per geni che sono attivamente trascritti, anche se il meccanismo con cui questo avviene non è ancora chiaro. Difetti a carico dei geni coinvolti nei meccanismi NER sono responsabili di diverse patologie genetiche, quali:

- Lo xeroderma pigmentoso
- La sindrome di Cockayne
- La tricotiodistrofia

Il meccanismo di *mismatch repair* (MMR), anche detto **di riparazione dell'appaiamento errato**, corregge errori di replicazione di ricombinazione genetica che determinano la formazione di nucleotidi non correttamente appaiati. Il sistema di riparo prevede la partecipazione degli enzimi dei sistemi BER e NER (elicasi II, esonucleasi, DNA polimerasi III, DNA ligasi e altre) oltre a proteine specifiche. .

Rotture e riparo del doppio filamento nelle cellule in divisione può verificarsi un tipo di danno al DNA, quale la rottura di entrambi i filamenti della doppia elica, che determina gravi conseguenze. Esistono due meccanismi capaci di riparare questo danno che sono generalmente conosciuti come riparazione per ricombinazione e "*non homologous end joining*" (saldatura delle estremità non omologhe). La **riparazione per ricombinazione** richiede la presenza di una sequenza identica, o quasi, che possa essere utilizzata come stampo per il riparo di una rottura. Il macchinario enzimatico responsabile di questo processo di riparo è praticamente identico al macchinario responsabile del crossing over nelle cellule germinali durante la meiosi. Questo meccanismo è usato in maniera predominante durante le fasi del ciclo cellulare in cui il DNA si sta replicando o ha completato la duplicazione. Ciò permette ad un cromosoma danneggiato di essere riparato con l'impiego, come stampo, di un cromatide fratello neo sintetizzato, una copia identica che è per di più, ordinatamente appaiata alla regione danneggiata. Molti geni nel genoma umano sono presenti in copie multiple fornendo diverse possibili fonti di sequenze identiche, tuttavia il riparo per ricombinazione che si basa su queste copie come stampi reciproci è problematico dal momento che porta a traslocazioni

cromosomiche ed altri tipi di riarrangiamenti cromosomici. Il non homologous end joining (NHEJ) riunisce le due estremità della rottura in assenza di una sequenza che possa fungere da stampo. Può tuttavia esserci una perdita di sequenza durante questo processo e quindi tale riparo può essere mutagenico. Dal momento che la grande maggioranza del genoma degli umani e degli altri organismi pluricellulari è fatta di DNA che non contiene geni, il cosiddetto junk DNA, DNA spazzatura, un NHEJ mutagenico è probabilmente meno pericoloso di un riparo assistito da stampo costituito da sequenze presenti in copia multipla: infatti in quest'ultimo caso si possono produrre riarrangiamenti cromosomici indesiderati.

Danni al DNA ed invecchiamento

Dopo periodi funzionali più o meno lunghi in relazione ai differenti tipi, le cellule intraprendono alcuni comportamenti e mostrano condizioni che generalmente fanno dire che stanno invecchiando. In tali momenti esse accumulano un certo numero di danni al DNA che supera la velocità di riparazione, determinando una alterata sintesi proteica; poiché le proteine nella cellula svolgono e condizionano le funzioni vitali, la cellula viene lentamente compromessa ed alla fine muore. Quando, in un organo, un numero congruo di cellule raggiunge un tale stato, l'organo stesso risulterà compromesso e cominceranno a manifestarsi sintomi di malattia. Studi in cui erano stati silenziati geni coinvolti nel riparo del DNA, hanno evidenziato un accelerato invecchiamento, una manifestazione precoce di malattie connesse con l'età avanzata ed una aumentata suscettibilità al cancro. Al contrario ricerche, condotte su cellule in coltura, in cui si determinava la sovra espressione di alcuni geni di riparo del DNA, hanno mostrato un incremento della durata della vita e resistenza agli agenti carcinogeni. Alcuni studi sull'invecchiamento hanno dimostrato la relazione tra lesioni in alcuni geni mitocondriali ed il processo di invecchiamento e le malattie degenerative croniche, come l'Alzheimer e varie alterazioni motorie. L'invecchiamento è principalmente causato dall'accumulo di errori nel genoma mitocondriale. In proposito sembra che il DNA nucleare subisca meno danni rispetto ai genomi mitocondriali. Fra le altre cose è evidente che nel DNA mitocondriale si accumulano con facilità errori perché questi organuli hanno meno risorse rispetto ai nuclei, per controllo degli errori.

VARIAZIONI DELLA STRUTTURA DEI CROMOSOMI

Fra i cambiamenti del materiale ereditario si annoverano anche quelli che prevedono la rottura ed il rimaneggiamento della struttura dei cromosomi. La frequenza di tali eventi è fortemente condizionata dalla dimensione dei cromosomi ed è correlata al grado di esposizione degli stessi agenti mutageni. Fratture trasversali multiple producono consistenti rimaneggiamenti strutturali degli stessi; i frammenti così ottenuti possono di nuovo reinserirsi nei cromosomi, magari in maniera errata modificando la sequenza dei loci genetici, altri spezzoni possono andare perduti, altri possono scambiare delle parti non omologhe. I cromosomi più lunghi vanno incontro a rottura più facilmente dei piccoli, ma nonostante ciò tutti i cromosomi risultano ugualmente sensibili e fragili se esposti ad agenti mutageni. Fondamentalmente le rotture che interessano i cromosomi possono portare a quattro tipi di variazione strutturale: la *duplicazione*, la *delezione*, l'*inversione* e la *traslocazione*. Perché una variazione di struttura di un cromosoma sia tale, bisogna che sia visibile al microscopio, pertanto questa deve coinvolgere almeno $6 \cdot 10^6$ coppie di basi (6000kb). Si ha una mutazione per **duplicazione** quando in un cromosoma sono presenti più copie di uno stesso segmento cromosomico con geni identici che codificano gli stessi prodotti. Il cromosoma con duplicazione risulta chiaramente più lungo dell'omologo, tuttavia gli effetti fenotipici della duplicazione non sono sempre rilevabili, e solo in pochi casi risultano letali (9p+). Le duplicazioni originano per crossing over ineguali. La duplicazione è rilevabile quando durante la prima profase meiotica gli omologhi si appaiano; infatti il cromosoma con duplicazione formerà una specie di ansa, che corrisponderà

al segmento duplicato. Si definisce **delezione** quel tipo di mutazione che comporta la perdita di frammenti di un cromosoma. Il segmento deleto, che può essere terminale o interstiziale, è spesso un trammento **acentrico** (cioè privo di centromero) che sarà perso durante la divisione cellulare. Anche la delezione sarà visibile, come la duplicazione, durante l'appaiamento degli omologhi in quanto il cromosoma normale, più lungo di quello deleto, formerà un'ansa. Molto spesso gli eventi di duplicazione e delezione sono simultanei come avviene, per esempio, durante la meiosi, quando una coppia di cromosomi va incontro a crossing over ineguale. Una cellula gametica che porta un cromosoma che ha subito una delezione o una duplicazione, se si dovesse unire ad un gamete con normale assetto cromosomico, produrrà uno zigote in cui una coppia di cromosomi sarà costituita da un elemento normale, ed uno anormale; una sorta di bilanciamento tra i due cromosomi può far sì che in qualche modo venga ad essere compensato il cromosoma anormale, ma di solito, le delezioni hanno conseguenze gravi anche negli eterozigoti. Nella specie umana piccole delezioni cromosomiche sono compatibili con la vita. Esempi di patologie legate a delezioni sono la sindrome del "cri du chat" causata da una delezione di una parte del braccio corto del cromosoma 5, e la sindrome di Prader-Willi/Angelman. La perdita dei geni contenute nella specifica frazione del braccio corto del cromosoma 5 determina la sindrome del cri du chat che si manifesta con una frequenza di 1/100.000 nati ed è detta così per il tipico pianto dei bambini che assomiglia al miagolio del gatto. I bambini con tale mutazione mostrano un fenotipo patologico con ritardo mentale, malformazioni della faccia, dell'apparato gastrointestinale e anomalie del collo. La delezione della regione 5p15.3 comporta lo sviluppo anormale della laringe e di conseguenza il caratteristico pianto; la delezione della regione 5p15.2 è responsabile del ritardo mentale e delle altre alterazioni fenotipiche. Altre importanti delezioni sono state osservate in specifici tumori come il retinoblastoma con la delezione 13q14, ed il tumore di Wilms dove si osserva la delezione 11q. Alcuni cromosomi modificati, quali gli **isocromosomi**, recano contestualmente delezione duplicazione parziali che sono originate in maniera diversa da quanto già descritto. Gli isocromosomi sono cromosomi metacentrici, i cui bracci sono uguali sia strutturalmente che geneticamente perché si è avuto un errato sdoppiamento del cromosoma dicromatidico durante la divisione mitotica o pre-meiotica; il centromero invece di sdoppiarsi secondo un asse parallelo a quello longitudinale del cromosoma, subisce una rottura perpendicolare a questo, cioè trasversale. Nella specie umana l'unico caso di isocromosoma compatibile con la vita è quello che coinvolge i bracci lunghi di X. Anche i **cromosomi ad anello** costituiscono un'anomalia della struttura dei cromosomi, e praticamente rappresentano un particolare tipo di delezione. Infatti se le rotture avvengono nella regione terminale di entrambi i bracci di un cromosoma e sono seguite dalla perdita dei segmenti estremi, oltre che alla successiva riunione delle due estremità spezzate, si formerà un cromosoma ad anello, il quale può o meno, contenere il centromero. La presenza di tali cromosomi può essere causa di alcune irregolarità di distribuzione del set cromosomico durante la divisione cellulare. L'**inversione** prevede che all'interno di uno stesso cromosoma si formino due fratture e che il frammento exciso sia reinserito dopo aver fatto una rotazione di 180°. L'inversione può o meno contenere la regione del centromero: nel primo caso si dice **inversione pericentrica**, nel secondo caso si parla di **inversione paracentrica**. Questo tipo di mutazione non comporta acquisizione o perdita di informazione, gli individui che porta una inversione possono non manifestare alcun effetto fenotipico; tuttavia, numerose e rilevanti complicazioni potrebbero aversi durante la gametogenesi. Infatti durante la divisione meiotica, in particolare nelle fasi relative all'appaiamento dei cromosomi omologhi, in presenza di inversione pericentrica, i due omologhi hanno notevole difficoltà di riconoscimento. In una coppia di omologhi, in cui uno dei due cromosomi contiene una inversione pericentrica, si osserva la formazione di un loop, un cappio proprio nella regione di inversione, per favorire in contatto tra gli alleli corrispondenti. Se avviene un crossing over entro l'anello di inversione, i prodotti della meiosi saranno gameti per ¼ normali, per metà portatori di delezioni/duplicazioni e per ¼

con contenuto genico normale ma portatori di inversione. Si definisce **traslocazione** lo spostamento di tratti di DNA secondo almeno tre possibilità:

- Spostamento di un segmento di DNA in un'altra zona dello stesso cromosoma (**traslocazione intracromosomica non reciproca**)
- Spostamento di un segmento di DNA su un cromosoma diverso (**traslocazione intercromosomica non reciproca**)
- Scambio di tratti non omologhi tra i due cromosomi (**traslocazione intercromosomica reciproca**)

Le conseguenze dal punto di vista quantitativo sono quasi nulle, i cambiamenti riguardano le relazioni di associazione tra i geni. Inoltre, nel momento della gametogenesi, sempre durante la meiosi, si avrà produzione di gameti sbilanciati. Per meglio comprendere consideriamo due coppie di cromosomi omologhi N1/T1 e N2/T2; con la lettera N indichiamo il cromosoma normale, con T il cromosoma traslocato. Per permettere l'appaiamento degli omologhi i quattro cromosomi formeranno una figura a croce. Ci sono tre possibilità di assortimento:

- N1 e N2 migrano ad uno polo e T1 e T2 all'altro; i gameti contengono una serie completa di geni, e sono quindi vitali
- N1 e T2 migrano ad un polo ed N2 e T1 all'altro; questa condizione è piuttosto frequente, i gameti che si formano contengono duplicazioni e delezioni e sono spesso non vitali
- N1 e T1 migrano ad un polo, N2 e T2 all'altro; questa condizione, è molto rara, i gameti sono spesso non vitali perché contengono duplicazioni e delezioni

Un esempio di traslocazione è rappresentato dal **cromosoma Philadelphia**, chiamato così perché è stato identificato a Philadelphia. In questo caso si osserva una traslocazione reciproca che vede coinvolti i cromosomi 9 e 22. Questo semplice spostamento induce una trasformazione neoplastica che condurrà alla leucemia mieloide cronica con crescita incontrollata dei mieloblasti. Un altro esempio di traslocazione reciproca che causa una patologia nell'uomo, coinvolge i cromosomi 8 e 14; si tratta del **linfoma di Burkitt**; la traslocazione ha come conseguenza una iperproduzione della proteina Myc che è la causa della trasformazione neoplastica. Alcune traslocazioni non reciproche sono dovute al trasferimento di una estremità di un cromosoma sul centromero di un cromosoma acrocentrico; in questo caso si ottiene la cosiddetta **fusione centrica o traslocazione robertsoniana**. Una considerazione particolare merita la forma di traslocazione robertsoniana che è responsabile della sindrome di Down familiare. La più nota e diffusa sindrome di Down è dovuta alla trisomia del cromosoma 21, che si verifica in seguito a fenomeni di non disgiunzione meiotica. La forma familiare della sindrome di Down invece è dovuta ad una traslocazione che vede coinvolti i cromosomi 14 o 15 e 21 per cui gli individui affetti, pur presentando un assetto cromosomico di 46 cromosomi, hanno una parziale trisomia del 21, in quanto posseggono il cromosoma traslocato che hanno ereditato da uno dei genitori. Di fatto, in seguito alla traslocazione, si forma un singolo cromosoma submetacentrico costituito dalla fusione dei bracci lunghi dei cromosomi 14 e 21, mentre dalla fusione dei due bracci corti si origina un cromosoma molto piccolo, privo di centromero, che si perde. Un soggetto portatore della traslocazione alla conta dei cromosomi appare monosomico, quindi con 45 cromosomi, mentre ad una accurata analisi citogenetica si rilevano tutte le quote cromosomiche e quindi una compiuta diploidia. Pertanto un tale soggetto portatore della traslocazione è detto "falso monosomico", non ha alcuna sintomatologia di Down ed è fenotipicamente normale, però avendo un cromosoma traslocato può generare sia figli con sindrome di Down sia figli normali. Trisomia 14 o monosomia 21 sono non compatibili con la vita.

Meccanismi di adesione cellulare, adesione fra cellule e fra cellule e matrice extracellulare

Le cellule animali sono descritte come entità isolate che terminano a livello della membrana plasmatica. Nella maggior parte dei casi si interconnettono strettamente, organizzandosi in tessuti ed organi con funzioni specializzate. Inoltre quasi tutte le cellule secernono all'esterno molecole che vengono organizzate negli spazi intercellulari ed intratessutali. Queste strutture extracellulari hanno una natura chimica con caratteristiche comuni e consistono di lunghe molecole fibrose flessibili immerse in una matrice idratata amorfa di glicoproteine e polisaccaridi ramificati. Questa struttura, definita **matrice extracellulare**, assume una varietà di forme differenti, giocando un ruolo fondamentale in diversi processi cellulari quali la proliferazione, la motilità, il differenziamento e l'adesione. Le cellule che hanno acquisito funzioni specializzate si organizzano in tessuti distinti, e questi a loro volta in organi.

I contatti cellula-cellula nell'organizzazione di strutture complesse L'integrità degli organismi multicellulari dipende dalla capacità delle cellule di associarsi in strutture specifiche formando tessuti ed organi. Queste interazioni richiedono che le singole cellule siano capaci di riconoscersi, aderire e comunicare tra loro. Le cellule provenienti dallo stesso tessuto sono capaci di riconoscersi e di stabilire interazioni che permettono la formazione di aggregati. Questa capacità viene meno se le cellule in sospensione vengono sottoposte a trattamento con enzimi proteolitici che demoliscono le proteine di membrana. Pertanto è dimostrabile che le capacità di riconoscimento e di aggregazione cellulare dipendono dall'interazione tra proteine specifiche, poste sulla membrana, che vengono genericamente definite "recettori adesivi". Essi sono stati caratterizzati dal punto di vista strutturale e funzionale, il che ha permesso di definire almeno tre differenti meccanismi molecolari di legame cellula-cellula:

- L'interazione omofiliaca, che consiste nel legame tra un recettore di una cellula con uno identico sulla cellula adiacente
- Il riconoscimento eterofiliaco, che consiste nel legame tra recettori di tipo diverso
- Il legame mediato da una molecola bi funzionale che fa da ponte tra due recettori su due cellule adiacenti.

I recettori adesivi in grado di mediare il riconoscimento e l'adesione cellula-cellula si raggruppano in due superfamiglie: le **caderine**, che per funzionare richiedono ioni calcio, e le **CAM (cell adhesion molecules)** componenti della famiglia delle immunoglobuline che mediano l'adesione in assenza di ioni calcio. La superfamiglia delle caderine comprende una dozzina di molecole che sono distinte in base alla loro espressione nei tessuti. La prima, che è anche la più studiata è quella delle caderine E, del tessuto epiteliale. Le caderine sono glicoproteine transmembrana caratterizzate dalla presenza, nel dominio extracellulare, di cinque moduli strutturali ripetuti e stabilizzati da legame con gli ioni calcio. In proposito, da molti anni è noto che la rimozione di ioni calcio dal mezzo di coltura cellulare causa la dissociazione di aggregati cellulari in cellule singole. Il calcio è richiesto per l'integrità dei tessuti anche perché modifica la conformazione delle caderine permettendo la loro funzione adesiva. Oltre al dominio extracellulare che media i legami esterni, la regione citoplasmatica della caderina è fondamentale per generare un'adesione stabile. Questa porzione della molecola si associa infatti con i filamenti di actina del citoscheletro della cellula, tramite tre proteine, chiamate α , β e γ *catenine*. La caderina E è anche responsabile della reazione di compattamento, uno dei fenomeni più precoci dello sviluppo embrionale per cui un processo di adesione cellulare permette l'organizzazione di cellule in strutture specifiche. La morula è una sfera composta da cellule che durante il processo di compattamento, si modifica facendo in modo che le cellule dello stato esterno aderiscano in

modo stretto. Le caderine che caratterizzano i desmosomi, giunzioni specializzate tra cellule epiteliali, presentano una regione citoplasmatica molto estesa. Nei desmosomi troviamo le desmoplachine e le desmoglobine le quali non legano direttamente i filamenti intermedi, ma sono collegate a questi ultimi tramite le desmocallmine e cheratocalmine. Le CAM sono molecole della famiglia delle immunoglobuline che costituiscono il secondo più importante sistema di recettori adesivi che, a differenza delle caderine, non è calcio-dipendente per mediare il riconoscimento e l'adesione tra le cellule. La proteina N-CAM, la prima ad essere stata studiata, si trova soprattutto nel sistema nervoso, le proteine N-CAM sono in realtà una grande famiglia di isoforme, infatti esse derivano per splicing alternativo dall'RNA messaggero trascritto da un singolo gene. Mentre le caderine possono dare origine a giunzioni specializzate tra cellule, come le giunzioni aderenti ed i desmosomi, le CAM non organizzano giunzioni specializzate, ma mediano contatti non giunzionali diffusi sulla membrana; a differenza delle caderine, che mediano adesioni forti, le N-CAM contribuiscono alla regolazione al fine dei contatti cellula cellula.

Giunzioni cellulari specializzate Le associazione delle cellule nei tessuti richiedono modificazioni specializzate delle membrane nel punto in cui le cellule vengono in contatto tra loro. Queste strutture specializzate vengono definite **giunzioni cellulari**. Nelle cellule animali si osservano tre tipi di più comuni giunzioni cellulari: *le giunzioni strette, o occludenti, le giunzioni aderenti (desmosomi, emidesmosomi) e le giunzioni comunicanti*. Come indicato dal nome, le **giunzioni occludenti** non lasciano spazio tra le membrane delle cellule che sono come sigillate e formano strati che servono a separare due compartimenti nel nostro corpo. Le giunzioni occludenti percorrono l'interno perimetro di cellule adiacenti formando un sigillo contiguo che si estende sull'intera superficie del tessuto che riveste la cavità o la superficie di un organo. In questi punti le membrane cellulari sono in stretto contatto in modo da impedire il transito di molecole nello spazio intercellulare. Questo tipo di giunzione è di particolare rilievo nelle cellule dell'epitelio intestinale, dove formano una barriera che previene la diffusione incontrollata dei fluidi dal lume dell'intestino ai tessuti sottostanti. Ogni giunzione stretta appare formata da una serie di filamenti *intrecciati* che costituiscono una fascia di congiungimento. Ciascun filamento è costituito da un insieme di proteine giunzionali transmembrana: claudina e occludina. Le **giunzioni adesive** legano il citoscheletro di una cellula e quello della cellula adiacente o alla matrice extracellulare. L'interconnessione tra i filamenti citoscheletrici garantisce la resistenza agli insulti meccanici, condizione necessaria per la stabilità dei tessuti. Tali giunzioni sono frequenti nei tessuti animali, ma sono particolarmente rilevanti in tessuti come il muscolo cardiaco e l'epitelio della cute. Delle giunzioni adesive fanno parte *le giunzioni aderenti, i desmosomi e gli emidesmosomi*. Negli epiteli, la giunzione aderente percorre l'intera circonferenza della cellula ed ha una morfologia caratteristica che al microscopio elettronico appare come una fascia di adesione, detta giunzione a cintura. In questa zona, le membrane delle cellule adiacenti, separate da uno spazio ridotto, sono mantenute accostate dal legame emofilico tra le molecole di caderina. Al di sotto della singola membrana si organizza una placca di giunzione che contiene le catenine alfa beta e gamma. Altre proteine presenti nella placca sono la vinculina e l'alfa-actinina che fanno da tramite fra le caderine ed il citoscheletro. In questo caso, la parte di citoscheletro interessata sono i filamenti di actina. In questo modo fasci di microfilamenti delle cellule di un tessuto sono in un reticolato continuo tramite le proteine di placca e le caderine presenti nelle giunzioni aderenti. Diversamente dalle giunzioni aderenti, i **desmosomi** sono punti di contatto non continui tra cellule, distribuiti sulla superficie cellulare come piccole aree circolari di adesione stabile. Queste strutture sono abbondanti, per esempio, nell'epitelio pluristratificato della cute, nel muscolo cardiaco e nel collo dell'utero. L'organizzazione tridimensionale dei desmosomi è complessa: anche in questo tipo di giunzioni le principali proteine, che sulla faccia esterna mediano il contatto diretto tra membrane di cellule adiacenti, appartengono alla famiglia delle caderine. Le membrane plasmatiche di due cellule adiacenti risultano parallele e separate da un sottile interstizio, definito come il

cuore del desmosoma, mentre una placca spessa e densa è presente sul versante citoplasmatico subito al di sotto della membrana di ciascuna cellula. Il cuore del desmosoma contiene le regioni extracellulari delle **desmocolline e desmogleine**, caderine tipiche del desmosoma. L'attività richiede la presenza di ioni calcio. La placca citoplasmatica contiene una miscela di proteine tra cui la **desmoplachina e la placo globina**; su queste strutture si ancorano i filamenti citoscheletrici, che in questo caso appartengono alla classe dei filamenti intermedi, detti in questo caso, tonofilamenti che, a seconda del tipo di cellula, si dividono in cheratina o desmina. Negli epiteli esiste anche un altro tipo di giunzione adesiva: l'**emidesmosoma**, una struttura adesiva simile ad un desmosoma ma che connette la membrana basale di una cellula alla lamina basale sottostante, cioè a quel sottile strato di matrice extracellulare che fa da supporto meccanico all'epitelio. Le principali proteine adesive sono le caderine, ma piuttosto le integrine, tipi specializzati di recettori cellula-matrice. Le giunzioni adesive hanno una principale funzione meccanica. Le forze esercitate su una cellula si scaricano anche sulle cellule vicine e si ammortizzano all'interno del citoplasma nelle strutture elastiche del citoscheletro. Le **giunzioni comunicanti** sono regioni dove le membrane di due cellule sono molto vicine; ciascuna giunzione mette in contatto il citoplasma di due cellule permettendo lo scambio di ioni e piccole molecole e quindi instaurando una comunicazione chimica ed elettrica. Queste giunzioni sono particolarmente abbondanti nei tessuti, quali quello nervoso e muscolare, dove è richiesta una comunicazione molto rapida tra le cellule. Nel cuore, per esempio, queste giunzioni facilitano la propagazione della corrente che causa il battito. La giunzione comunicante è costituita da una particolare struttura, denominata *connessone*, formata da sei proteine transmembrana chiamate connesine. Questa struttura attraversa la membrana sporgendo nello spazio tra le cellule. Ogni connessone ha una cavità idrofiliaca interna, con un diametro sufficiente al passaggio di ioni e piccole molecole. Nella giunzione, i connessioni di due cellule adiacenti appaiono allineati testa-testa in modo tale che i cilindri formano una cavità continua che mette in comunicazione le due cellule. Poiché la corrente elettrica richiede il passaggio di ioni, questi canali intercellulari permettono il loro passaggio direttamente senza attraversamenti extracellulari. La giunzione comunicante permette il passaggio di molecole con peso inferiore a 1000 dalton, tra queste molti metaboliti delle cellule. Queste giunzioni tendono ad essere aperte a basse concentrazioni di calcio, e si chiudono ad alte concentrazioni; la chiusura della giunzione non è un evento tutto o nulla, è piuttosto graduale e si verifica entro un certo range di concentrazione di calcio. È stato anche dimostrato che la permeabilità della giunzione può essere regolata dal potenziale di membrana e dalla concentrazione di protoni, quindi dal pH citoplasmatico.

QUARANTESIMA LEZIONE: BANDEGGIO, CARIOTIPO, AMNIOCENTESI

Cromosomi umani e cariotipo

Il corredo cromosomico, o **cariotipo** umano, contenuto in ciascuna cellula somatica del singolo individuo consiste di 46 cromosomi, suddivisi in 23 coppie di omologhi, di cui 44 autosomi e 2 eterosomi. Tale corredo cromosomico è diploide non soltanto nelle cellule somatiche, ma anche in quelle della linea germinale che si sono differenziate per dare inizio al percorso che le porterà all'aneuploidia (corredo dimezzato, 23 cromosomi). Alla fecondazione l'unione dei due gameti ristabilisce il numero diploide dei cromosomi; lo zigote quindi avrà un set paterno ed uno materno un numero di combinazioni cromosomiche possibili molto elevato. Queste possibili combinazioni insieme alla ulteriore variabilità determinata dai numerosi crossing over per ciascuna coppia di cromosomi, garantiscono la assoluta individualità ad ogni figlio prodotto, anche se, tale variabilità sarà minore nel caso di gemelli monozigoti. Il termine cariotipo viene generalmente usato sia per indicare il set cromosomico di un individuo, sia per riferirsi alla immagine o fotografia dei cromosomi stessi (**cariogramma**). Generalmente in un cariotipo, i

cromosomi sono mostrati come essi appaiono in metafase, quando sono costituiti da 2 cromatidi fratelli uniti a livello del centromero. Le analisi di routine vengono quindi effettuate usando delle cellule in divisione che vengono bloccate in metafase per aggiunta di alcuna sostanza (spesso colchicina) che interferisce con la normale formazione del fuso mitotico. La fonte più facilmente accessibile è il sangue venoso, da cui si isolano i linfociti T, che si sottopongono successivamente al normale procedimento per la preparazione del kariogramma. Altre cellule utilizzabili per l'analisi dei cromosomi si possono ottenere mediante la tecnica dell'ago aspirato, sia con altre tecniche, anche chirurgiche. Infatti alcune biopsie possono fornire all'analisi cellule provenienti dai testicoli, o altri organi. In caso di diagnosi prenatale, l'analisi può essere effettuata su cellule fetali presenti nei villi coriali o nel liquido amniotico.

Per prelevare i villi coriali viene introdotto attraverso la vagina un catetere nell'utero, con il quale è possibile prelevare un campione di cellule fetali dal corion.

La procedura per l'amniocentesi, invece, prevede l'inserimento di un ago attraverso le pareti addominale ed uterina, con il quale è possibile aspirare un campione di liquido amniotico da cui si possono selezionare cellule fetali che, coltivate ed espanse opportunamente, consentiranno le analisi programmate.

Fino al 1971 i cromosomi venivano distinti sulla base della loro lunghezza e della posizione del centromero. Prendendolo come punto di riferimento possiamo distinguere tre differenti morfologie cromosomiche:

- **Metacentrici** con un rapporto di lunghezza dei due bracci del cromosoma pressoché uguale a 1:1
- **Submetacentrici** se il centromero è in posizione sub mediana
- **Acrocentrici** se il centromero è quasi terminale

Va ricordato che il DNA dei centromeri è costituito da sequenze di DNA altamente ripetute e che i cromosomi acrocentrici presentano anche dei bracci molto piccoli con un'appendice globulare, detta *satellite*, che contiene alcune centinaia di copie di geni che codificano per l'RNA ribosomiale. La perdita di questi satelliti può non avere conseguenze significative dal punto di vista clinico. Invece la funzionalità delle cellule ed il loro invecchiamento, sembra siano correlate al mantenimento dell'integrità delle regioni telomeriche, anch'esse costituite da basi ripetute, al contrario di quanto avviene nelle cellule cancerose. I cromosomi umani sono stati originariamente suddivisi in sette gruppi, indicati con le lettere maiuscole da A a G, e numero di ordine crescente in merito alla loro lunghezza:

- A- Coppie 1 – 3 **metacentrici più grandi**
- B- Coppie 4, 5 **submetacentrici più grandi**
- C- Coppie 6 – 12 e X **submetacentrici medi**
- D- Coppie 7 – 15 **acrocentrici grandi**
- E- Coppie 16 – 18 **submetacentrici corti**
- F- Coppie 19, 20 **metacentrici corti**
- G- Coppie 21,22 e Y **acrocentrici corti**

Il cromosoma 21 fa eccezione: per un errore, sebbene sia leggermente più corto del 22, esso venne inizialmente sistemato prima ed è ancora oggi in tale errata posizione. La sola lunghezza e la posizione del centromero non sempre però permettono di discriminare i cromosomi. Per superare questo problema nei primi anni '70 sono state introdotte particolari tecniche di analisi, quali il **bandeggio**.

Bandeggio Le tecniche di bandeggiatura permettono di distinguere un cromosoma dall'altro in base alla colorazione di ciascuno di essi secondo un alternanza di **bande** adiacenti, trasversali, chiaramente distinguibili, che appaiono scure o chiare. In questo modo ogni cromosoma presenta un suo specifico pattern di bandeggiatura che rende inequivocabile la sua identificazione. Il più comune metodo per bandeggiare prevede l'aggiunta di tripsina per denaturare le proteine che legano ciascun cromosoma, seguita dalla colorazione con il colorante Giemsa. Questo colorante si lega al DNA secondo uno specifico pattern di zone, producendo bande chiare e scure, le cosiddette **bande G**, specifiche per ogni coppia di cromosomi omologhi, tanto che la loro disposizione consente di riconoscere gli omologhi grazie al loro pattern pressoché identico. La colorazione fa effettuata solo in metafase, poiché in profase aumentano a causa del differente compattamento cromatinico, e rendono meno accurata la colorazione. Altri tipi di bandeggiatura, usati meno frequentemente sono il bandeggio Q (quinacrina colorante), il bandeggio R (reverse) e il bandeggio C (eterocromatina costitutiva). Queste tecniche sono utilizzate solo in casi particolari quando si desidera studiare una particolare regione o si ha la necessità di avere conferme circa la presenza di determinate bande poco chiare in alcuni preparati. Le basi molecolari della presenza di queste bande si pensa possano essere dovute a sequenze di DNA che si legano selettivamente ai coloranti, o alla presenza di specifiche proteine che si legano a sezioni del cromosoma. Nel 1971 si stabilì una convenzione per la nomenclatura dei cromosomi: Non essendo il centromero dei cromosomi umani quasi mai in posizione perfettamente mediana, ciascun cromosoma risulta costituito da un braccio corto (p, petit) ed un braccio lungo (q, queu, coda) separati dal centromero. talvolta per localizzare uno specifico punto del cromosoma vengono usati i termini *prossimale* ad indicare un locus che si trova nella regione vicina al centromero, o *distale*, ad indicare che si trova in una regione lontana dal centromero. Secondo il nuovo sistema adottato nel 1995 denominato ISCN, International System for Human Cytogenetic Nomenclature, ogni cromosoma, oltre che ad essere distinto in un braccio corto ed uno lungo, presenta in ogni braccio delle regioni che vengono numerate con i numeri arabi a partire dal centromero e andando verso la parte terminale; *si tratta di regioni determinate da punti di riferimento specifici, con caratteristiche morfologiche costanti*. All'interno delle regioni si distinguono le bande anch'esse numerate in successione a partire dal centromero verso l'esterno. Per tale motivo **14q2.1** sta a significare **cromosoma 14, braccio lungo, regione 2, banda 1**. Recentemente, con gradi di risoluzione microscopica maggiori, si è scoperto che oltre alle bande esistono anche le sottobande, e le sottosottobande. Per descrivere il cariotipo di un individuo, per convenzione si indica dapprima il numero totale dei cromosomi, seguito dalla specifica dei cromosomi sessuali, e poi l'elencazione di tutte le eventuali alterazioni osservate. Pertanto la descrizione formale del cariotipo umano normale è 46,XX e 46,XY.

p	Braccio corto
q	Braccio lungo
cen	Centromero
tel	Telomero
del	Delezione
dup	Duplicazione
+	Acquisizione di un cromosoma
-	Perdita di un cromosoma
i	Isocromosoma
ins	Inserzione
inv	Inversione
r	Anello
t	Traslocazione
rob	Traslocazione robertsoniana
mos	mosaicismo

46,XX	Femmina normale
46,XY	Maschio normale
45,X0	Donna con sindrome di Turner
47,XXY	Maschio con sindrome di Klinefelter
47,XY,+18	Maschio con trisomia 18
69,XXX	Triploide
46,XX del (5p)	Femmina delezione braccio corto del 5 (cri du chat)
46,X,i(X)	Donna, isocromosoma del cromosoma X
46,XY,t(1;2)(p21;q21)	Maschio con traslocazione braccio corto da 1 a 21 e braccio lungo da 2 a 21
45,XX,rob,(14;21)(q10;q10)	Femmina, portatrice di una t.robertsoniana bilanciata 14;21
47,XY,+21/46XY	Maschio con mosaicismo per la trisomia 21

QUARANTUNESIMA LEZIONE: FECONDAZIONE, SVILUPPO EMBRIONALE

La fecondazione è quel processo durante il quale i gameti si fondono per dare origine ad un nuovo individuo con i potenziali genetici derivanti da entrambi i genitori e con assetto cromosomico diploide tipico della specie di appartenenza. La fecondazione può essere esterna o interna. Nel caso di **fecondazione esterna** la cellula uovo si presenta racchiusa dalla membrana plasmatica che è a sua volta circondata dalla **membrana vitellina**, che è costituita da un complicato intreccio di fibre ancorate alle glicoproteine della membrana plasmatica. La membrana vitellina è importante per il legame specie-specifico tra SPZ e uovo. All'esterno è presente un involucro gelatinoso che ha la funzione di attirare e o attivare lo SPZ. Nelle specie a **fecondazione interna**, intorno alla membrana plasmatica c'è la **zona pellucida ZP**, uno strato di cellule dette del cumulo ooforo (cellule del follicolo che nutrono l'ovocita fino al rilascio dall'ovario). L'ovocita presenta al di sotto della membrana plasmatica lo *strato corticale*. Al momento della fecondazione, favorisce il sollevamento dei microvilli che aiutano lo SPZ ad entrare nell'ovocita. Nello strato corticale, inoltre, sono presenti i granuli corticali, che intervengono nella fase di blocco lento della polispermia. Le varie fasi del processo di fecondazione si possono riassumere nei seguenti passaggi:

- Attacco di SPZ ai rivestimenti dell'ovocita (reazione acrosomale)
- Penetrazione di tali rivestimenti
- Contatto e riconoscimento tra SPZ e ovocita
- Fusione tra le membrane plasmatiche (la testa dello SPZ si fonde tangenzialmente con la membrana e liberazione del nucleo di SPZ nel citoplasma dell'ovocita che risponde con:
- Attivazione del citoplasma e blocco della polispermia

- Trasformazione del nucleo dello SPZ in un pronucleo maschile
- Trasformazione del nucleo dell'uovo in pronucleo femminile (sbloccato dalla meiosi)
- Fusione dei pronuclei ed inizio dello sviluppo

Nelle specie a fecondazione interna si è visto che le vie genitali femminili svolgono un ruolo importante nell'indurre importanti modificazioni negli SPZ i quali, appena eiaculati, non hanno capacità di fecondare. Questa viene acquisita solo in seguito al passaggio nelle vie genetiche femminili. Questo fenomeno è detto **capacitazione**. Le principali modificazioni molecolari che intervengono nella capacitazione riguardano:

- Fluidità della membrana plasmatica che viene alterata da cambiamenti della componente lipidica, in pratica diminuisce il colesterolo
- La perdita di alcune proteine carboidrati di membrana dello SPZ
- La fosforilazione di certe proteine che sono coinvolte nel legame SPZ-uovo.

Gli SPZ che non hanno subito la capacitazione vengono inglobati nella matrice del cumulo ooforo ed in tal modo non possono fecondare l'uovo. Quando gli SPZ passano dall'utero alle tube, dove è possibile l'incontro fra i due gameti, si iperattivano, cioè nuotano a maggiore velocità e con maggior vigore. Nei mammiferi gli SPZ si avvicinano tangenzialmente all'uovo. Grazie al rilascio della ialuronidasi da parte dello SPZ, questo raggiunge la ZP dove avviene il riconoscimento di tre glicoproteine, ZP1, ZP2 e ZP3. Gli SPZ legano ZP3. Nello SPZ al livello del collo, tre recettori interagiscono con ZP3. Il sito intracellulare ha un'attività tirosina-chinasi. Se tale attività viene inibita gli SPZ si legano comunque, ma non viene innescata la **reazione acrosomale**, che consiste nel rilascio di tutto il contenuto di enzimi litici presenti nell'acrosoma. A questo punto l'acrosoma subisce un'esocitosi (reazione acrosomale) che libera l'**acrosina**, un enzima che ha il compito di digerire la ZP. Il legame tra SPZ e la membrana dell'ovocita è mediata infine da proteine di adesione. La cellula dell'uovo deve difendersi dall'attacco di molte centinaia di migliaia di SPZ e fare sì che uno solo entri, quindi deve mettere in atto strategie efficaci per evitare la polispermia. Esistono due meccanismi: un blocco rapido ed un blocco lento. Il **blocco rapido** è dovuto ad una rapida modificazione della differenza di potenziale che passa da -70mV a $+20\text{mV}$. Questa inversione della differenza di potenziale è causata da un ingresso massiccio di ioni calcio dovuto ad una proteina che apre i canali del sodio; questa proteina sarebbe inattiva a pH fisiologico. Questo tipo di blocco è estremamente rapido, ma di breve durata. Il **blocco lento** invece si instaura nel giro di pochi secondi e prevede l'esocitosi dei granuli corticali. Il riconoscimento e la successiva fusione delle membrane, prima dell'esocitosi, sono mediati da un sistema di riconoscimento del tipo v-snare t-snare. Il contenuto di questi granuli è rappresentato da proteasi che tagliano le proteine che ancorano la membrana alla membrana plasmatica; mucopolisaccaridi che attirano acqua; altri enzimi che hanno il compito di indurire la membrana vitellina che ora viene chiamata **membrana di fecondazione** e ciò fa sì che gli SPZ attaccati alla membrana vitellina si staccino. Il blocco lento è attivato dalle proteine G; si può immaginare allora una cascata di eventi che vede coinvolte le proteine G e la cascata di inositoli. La conseguenza è l'aumento della concentrazione del calcio intracitoplasmatico. Lo ione calcio è responsabile dell'inizio della **reazione corticale**. Nei mammiferi manca il blocco rapido della polispermia, ma è presente la **reazione della zona pellucida**, che prevede modificazioni a carico di ZP2 e ZP3 e mancanza di membrana di fecondazione. Tali cambiamenti fanno sì che le glicoproteine della ZP non possano essere riconosciute dai recettori degli SPZ. Una volta che lo SPZ ha rilasciato il suo nucleo nel citoplasma dell'ovocita c'è bisogno che i due nuclei subiscano delle modificazioni prima della fusione. Il nucleo dello SPZ perde il suo involucro, la cromatina si decondensa e le protamine, laddove presenti, sono sostituite dagli istoni citoplasmatici di origine materna. Eventuali mitocondri e flagello entrati nell'uovo vengono degradati. In quasi tutti i tipi cellulari studiati i centrioli

presenti nello zigote sono di origine paterna. Laddove mancano i centriolo, la formazione del fuso pare essere indotta dal materiale pericentriolare.

Cosa sblocca la seconda meiosi? Al momento della fecondazione l'ovocita è fermo alla metafase II. Il blocco pare dovuto ad un complesso proteico detto CSF (cytostatic factor) che inibisce sia la degenerazione di MPF (maturation promoting factor, formato da ciclina B/Cdk1) che la funzione del fattore che promuove l'anafase. Quando l'ovocita, che ora chiameremo **uovo**, sarà fecondato, una serina treonina chinasi, che è parte del CSF sarà degradata. In seguito all'arrivo dello SPZ, si osserva un incremento intracellulare di ioni calcio. Il calcio attiva una particolare calcio dipendente, la quale ha il compito di demolire il fattore citostatico CSF che impediva la degradazione del complesso MPF. In seguito alla degradazione di MPF si attiva lo sblocco del fattore che promuove l'anafase per cui la meiosi II può essere completata. Completata con successo la seconda meiosi, i due pronuclei sono pronti per la fusione, chiamata anche **anfimissi**. Si forma lo **zigote**, nella donna, la prima cellula del nuovo organismo. In breve, lo sviluppo dei gameti femminili avviene nell'ovario, la fecondazione avviene normalmente nelle tube di Falloppio, e lo sviluppo del nuovo individuo avviene nell'utero. Durante il viaggio dalle tube di Falloppio all'utero, comincia lo sviluppo e lo zigote inizia la segmentazione circa 30 ore dopo la fecondazione. In 3-4 giorni raggiunge l'utero dove avviene l'impianto dell'embrione, che, in questo stadio viene denominato **morula**. Successivamente, nella morula si forma una cavità e la struttura prende il nome di **blastocisti**, che al 6° giorno si impianta nella mucosa uterina arrivando all'endometrio.

Caratteristiche delle uova

Polarità le cellule uovo vergini presentano nella maggior parte dei casi un unico piano di simmetria che corrisponde all'asse **polo animale-polo vegetale**. Il polo animale è la regione dell'uovo dove vengono emessi i globuli polari, mentre il polo vegetativo è quella regione dove si concentra il materiale di riserva sotto forma di granuli di tuorlo.

Dimensioni le dimensioni delle uova variano da specie in specie. La diversità di dimensioni è strettamente correlata alla quantità di materiale di riserva sia presente nel citoplasma. In base alla quantità di tuorlo, le uova possono essere classificate in:

- **Uova oligolecitiche** provviste di una scarsa quantità di tuorlo
- **Uova mesolecitiche** provviste di una considerevole quantità di tuorlo disposto per lo più nella regione vegetativa
- **Uova telolecitiche** che hanno dimensioni notevoli e presentano grandi quantità di tuorlo

Tipi di sviluppo le uova possono essere distinte in due categorie: uova con **sviluppo di tipo a mosaico, e di tipo regolativo**. Appartengono alla prima categoria le uova come quelle dei molluschi, i cui blastomeri iniziali sono già rigidamente destinati a dare strutture specifiche dell'embrione. Nel secondo caso invece i blastomeri mantengono la totipotenza più a lungo. Nelle uova di mammifero, invece, fino alla quarta divisione si ottengono blastomeri totipotenti.

Sviluppo dell'uovo negli anfibi

Le uova di anfibio appena deposte misurano circa 2mm di diametro, e sono quindi visibili ad occhio nudo, e vengono classificate come uova mesolecitiche. Esse, come le uova di tutti i vertebrati, al momento della deposizione sono bloccate alla metafase della II divisione meiotica e sono circondate da un involucro gelatinoso secreto al momento del passaggio attraverso gli ovidotti. Gran parte delle uova degli anfibi sono

caratterizzate dalla presenza di granuli di pigmento nell'emisfero animale e di granuli di tuorlo nell'emisfero vegetativo, ragion per cui è facile distinguere le due zone. In seguito alla fecondazione, si osservano nell'uovo una serie di cambiamenti che si manifestano con le **reazioni di orientamento e di simmetrizzazione**. La prima permette all'uovo di equilibrarsi secondo le leggi di gravità per cui l'emisfero vegetativo, più pesante per la presenza del tuorlo, si dispone in basso. La capacità dell'uovo fecondato di potersi orientare è dovuta al sollevamento della membrana di fecondazione al di sotto della quale si forma un ampio spazio **perivitellino** nel quale l'uovo è libero di ruotare. Alla formazione dello spazio perivitellino contribuiscono i granuli corticali. Lo sviluppo continua con la comparsa della **semiluna grigia**, struttura che determina la **simmetrizzazione dell'uovo** fecondato. La formazione della semiluna grigia inizia pochi minuti dopo la penetrazione dello spermatozoo. Nel lato che corrisponde alla futura regione dorsale dell'embrione, la massa di pigmento resta al di sopra dell'equatore dell'uovo evidenziando in tale maniera un'area a forma di semiluna debolmente pigmentata in grigio. Sul lato opposto, nella futura regione ventrale dell'embrione, la massa di pigmento si dispone invece al di sotto della fascia equatoriale dell'uovo. Per tanto si osserva, nell'uovo fecondato degli anfibi, una simmetria bilaterale: la semiluna grigia divide l'uovo in due metà, ognuna delle quali è l'immagine speculare dell'altra. Dopo la fecondazione inizia la segmentazione che sarà di tipo **totale e ineguale**, interesserà cioè tutta la massa dell'uovo e produrrà cellule di dimensioni diverse. Il primo piano di segmentazione passa per l'asse polo animale-polo vegetativo e coincide con il piano di simmetria bilaterale dell'uovo, per cui i primi due blastomeri contengono ognuno metà della semiluna grigia. Il secondo piano di divisione è perpendicolare al primo e produce 4 blastomeri equivalenti fra loro. Il terzo piano, data l'abbondante presenza di tuorlo, sarà invece sopraequatoriale, spostato verso il polo animale; si otterranno quindi 8 cellule, i 4 blastomeri al polo animale, più piccoli, per questo detti micromeri, e i 4 blastomeri del polo vegetale, detti macromeri perché più grandi. Le divisioni successive sono sempre meno sincrone perché i micromeri dell'emisfero animale si dividono più velocemente dei macromeri. Si arriva così allo stadio di morula, formata da 32-64 blastomeri, ed è a questo punto che in corrispondenza dell'emisfero animale si comincia a formare una cavità, il blastocele, che si riempie di liquido. Questa cavità si va mano a mano ingrandendo fino a occupare tutto l'emisfero animale della blastula avanzata. Nello strato esterno di quest'ultima il **blastoderma**, sono presenti **territori presuntivi**, che daranno origine ai futuri foglietti embrionali: ectoderma, endoderma, cordo-mesoderma. Tranne l'ectoderma, che rimarrà all'esterno dell'embrione, i territori della corda dorsale del mesoderma e dell'endoderma migreranno all'interno della blastula per formare i foglietti da cui origineranno i tessuti e gli organi dell'animale adulto. La migrazione dei territori va sotto il nome di gastrulazione ed avviene grazie allo scorrimento, **epibolia**, e all'invaginazione dei territori stessi mediante un solco che si forma nella regione dorso-mediana dell'embrione, la dove è presente la semiluna grigia. Questo solco viene chiamato **labbro dorsale del blastoporo**. Durante la gastrulazione la morfologia del labbro subisce modifiche: i bracci laterali scivolando verso il polo vegetativo, gli danno prima assumere una forma a ferro di cavallo, e poi, chiudendosi ad anello, la forma definitiva rotonda del **blastoporo**.

L'intera superficie della blastula degli anfibi può essere suddivisa in tre grandi regioni:

- 1) Una vasta regione dell'emisfero animale che comprende due aree fondamentali: il territorio presuntivo del sistema nervoso e quello dell'epidermide della larva
- 2) Una regione mediana che comprende il territorio presuntivo della notocorda e del mesoderma. Il primo occupa, nella regione dorsale della blastula, una posizione che coincide con la parte centrale della semiluna grigia, il secondo è disposto ai lati dell'area presuntiva della notocorda
- 3) La regione del polo vegetativo contiene il territorio presuntivo dell'endoderma che darà origine al tubo digerente.

Movimenti dei territori presuntivi embrionali durante la gastrulazione

Ectoderma – occupa una vasta area della regione animale che comprende il tessuto presuntivo dell'epidermide e del sistema nervoso. Alla fine della gastrulazione si espande notevolmente fino a ricoprire l'intero embrione. Mentre il tessuto presuntivo dell'epidermide si espande in tutte le direzioni, il tessuto nervoso presuntivo si espande solo verso nord.

La corda – il territorio presuntivo della notocorda si invagina a livello del labbro dorsale del blastoporo e una volta all'interno prolifera formando una struttura assile che si dispone centralmente, per tutta la lunghezza dell'embrione, al di sotto dell'ectoblasto neurale.

Mesoderma – il territorio presuntivo del mesoderma è quello che compie gli spostamenti più complessi. Esso, in gran parte si invagina a livello del blastoporo disponendosi lateralmente alla corda; a fine gastrulazione è parte del mantello cordo-mesodermico, alias tetto dell'archenteron, disposto fra ectoderma e endoderma.

L'endoderma – il territorio presuntivo dell'endoderma, localizzato in grandissima parte nella regione del polo vegetativo dell'embrione, si invagina a livello del labbro a formare il pavimento dell'archenteron. La prima parte dell'endoderma che si invagina formerà più tardi la parte anteriore dell'archenteron, da cui originerà l'endoderma della bocca. Endoderma orale e della faringe, espandendosi notevolmente, formeranno l'intestino anteriore medio e rettale.

Finita la gastrulazione, inizia il processo di neurulazione, durante il quale l'embrione modificherà la sua forma da sferica a ovoidale allungandosi in direzione cefalo caudale. L'area dell'ectoblasto neurale presuntivo, localizzata sul lato dorsale dell'embrione, diventa **piastra neurale**, e si rende ben visibile perché i suoi bordi si ispessiscono formando le **pieghe o croste neurali**. Successivamente le pieghe neurali si innalzano e convergono e si saldano formando il **tubo neurale**. La fusione delle pieghe neurali procede in direzione cefalo-caudale ed il tubo neurale sarà più slargato nella parte anteriore (encefalo primitivo) e poi ristretto mano a mano che si procede verso la parte caudale (midollo spinale). Gli stadi successivi sono caratterizzati dal **differenziamento cellulare** e dall'**organogenesi**.

Proprietà del labbro dorsale del blastoporo

Lo sviluppo embrionale è un processo determinato da una serie di induzioni graduali e sequenziali che permettono ai territori che entrano in contatto fra loro di determinarsi e differenziare. Il solo territorio che induce senza bisogno di essere indotto è il labbro dorsale del blastoporo, situato nel territorio della semiluna grigia. Il labbro dorsale del blastoporo, per questa sua proprietà è stato definito **induttore primario**. Un'altra sua importantissima proprietà è quella di essere un organizzatore embrionale, di avere cioè la capacità di organizzare la formazione dell'intero embrione. Questa proprietà fu scoperta isolando un ampio frammento del labbro dorsale del blastoporo di una giovane gastrula e lo trapianto nella regione ventrale di un altro embrione allo stesso stadio. Scopo dell'esperimento era quello di verificare se il territorio del labbro di una gastrula iniziale fosse già determinato o ancora totipotente. Se determinato, una volta trapiantato, avrebbe dovuto sviluppare, in armonia con il territorio in cui era stato trapiantato, in strutture endodermiche. Il risultato fu la formazione di un embrione secondario più piccolo, attaccato alla parete ventrale dell'embrione ospite. Questo risultato inizialmente non compreso, fu chiarito quando, marcando il territorio trapiantato con coloranti vitali, si osservò nel lato ventrale dell'embrione ospite l'inizio di una seconda gastrulazione che determinava l'invaginazione e il posizionamento del cordo mesoderma al di sotto dell'epidermide ventrale. La terza importante proprietà del labbro dorsale del

blastoporo è quella di presentare una **regionalista di induzione**. Un frammento del labbro isolato e trapiantato nella regione ventrale di un altro embrione darà risultati diversi secondo il momento in cui viene isolato e trapiantato. Una volta trapiantato, esso darà origine a strutture diverse. Infatti, se si parte da una gastrula: 1) indifferenziale: si formerà una testa attaccata al ventre dell'embrione ospite; 2) intermedia: in questo caso si formeranno strutture del tronco attaccate al ventre dell'embrione ospite; 3) avanzata: si osserverà la formazione di una coda attaccata al ventre dell'embrione ospite.

Il primo territorio che si invagina a livello del labbro dorsale del blastoporo è quello che compie i movimenti più lunghi e complessi: una volta invaginato andrà a costituire la parte anteriore del tetto dell'archenteron, diventando induttore delle strutture nervose cefaliche (**induttore cefalico**). Durante lo stadio di gastrula transita il tratto di cordo-mesoderma, che agirà da induttore delle strutture nervose del tronco (**induttore del tronco**) e alla fine della gastrulazione passerà il tratto del cordo-mesoderma che formerà la parte finale del tetto dell'archenteron (**induttore caudale**) che indurrà la formazione di strutture nervose caudali. La proprietà di regionalista di induzione sembra essere dovuta alla presenza di due classi di sostanze chimiche che interagiscono lungo l'asse cefalo caudale del tetto dell'archenteron. Secondo questo modello le due classi di sostanze diffondono in senso opposto secondo il modello dei due triangoli capovolti formando un doppio gradiente.

Totipotenza e trapianto dei nuclei

L'importanza nell'ambito della biologia dello sviluppo dell'uovo degli anfibi come modello sperimentale è documentata anche dal fatto che esso è stato il primo ad essere utilizzato per gli esperimenti di trapianto di nuclei e di clonazione. Il primo ricercatore che ideò e propose l'esperimento del trapianto fu Speamann, uno scienziato tedesco che visse ed operò in Germania durante il periodo nazista. I quesiti che si poneva erano i seguenti: una cellula differenziata possiede ancora tutti i geni presenti durante il periodo embrionale oppure il suo differenziamento è dovuto alla perdita di quei geni che non servono alla sua attività funzionale? Ed ancora: una cellula differenziata può essere de-programmata per un'altra funzione? Speamann per rispondere ideò un esperimento che per quei tempi era impossibile: prelevare il nucleo di una cellula uovo previamente enucleata. L'esperimento fu fattibile, ed infatti eseguito solo nel 1966 da parte di Gurdon, che operò il trapianto del nucleo di una cellula dell'epitelio intestinale di un girino di *Xenophobus laevis* in un oocita enucleato di un'altra rana della stessa specie. La tecnica che permette il trapianto dei nuclei fu ideata da Briggs e King nel 1952 e prevede:

- **Enucleazione dell'ovocita** l'uovo viene attivato tramite puntura con un sottilissimo ago di vetro. Nucleo dell'uovo migra verso il polo animale per l'emissione del 2° globulo polare e può essere facilmente eliminato sempre con un sottile ago di vetro.
- **Trapianto del nucleo** si isolano cellule dell'epitelio intestinale di un girino con microvilli e pertanto già differenziate per la funzione di assorbimento. Tramite una micro pipetta si opera una suzione che determina la rottura della membrana plasmatica e la liberazione del nucleo all'interno della pipetta stessa. Il nucleo viene poi iniettato con la stessa micro pipetta nel citoplasma dell'uovo enucleato. Soltanto l'1% delle uova fecondate crebbero. Se il trapianto invece veniva fatto con dei nuclei di cellule embrionali le percentuali di riuscita aumentavano considerevolmente arrivando sino al 50-60%. La minore capacità delle cellule differenziate può essere spiegata con il fatto che le cellule differenziate hanno già rigidamente instaurato quei meccanismi di inibizione dell'attività di geni non coinvolti nella loro attività funzionale. Con la tecnica dei trapianti nucleari, Gurdon ottenne dei **cloni** di rane ossia esemplari prodotti in serie, xerocopie identiche all'originale donatore del nucleo. I risultati ottenuti diedero luogo ad una

serie di progetti e speculazioni scientifiche con strascichi enormi sul problema della clonazione umana.

QUARANTAQUATTRESIMA LEZIONE: REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA

Introduzione

Per descrivere e comprendere i meccanismi di regolazione è necessario illustrare alcune regole, frutto di convenzione per orientarci nella lettura del tratto di DNA che consideriamo essere un gene. La lettura di un gene si fa sull'elica complementare all'elica di stampo, in modo da leggere direttamente la sequenza corrispondente sull'mRNA sostituendo T con U. Un gene eucariotico si presenterà al 5' con il suo promotore, con un tratto corrispondente al 5' UTR cui seguono le sequenze che sull'mRNA saranno la tripletta di inizio (ATG) ed i segnali di termine della traduzione. Poi avremo il tratto corrispondente al 3'UTR che comprende il segnale per la poliadenilazione.

Procarioti

Regolazione a livello trascrizionale a livello trascrizionale la cellula batterica regola l'espressione del gene attraverso il modello dell'**operone**. Innanzi tutto è necessario definire l'operone come un tratto di DNA comprendente, in sequenza dal terminale 5' al 3' tratti regolativi (**promotore ed operatore**) e **geni strutturali** che concorrono all'espressione di un'unica attività essendo strettamente correlati. Ad esempio, per degradare il lattosio, servono tre molecole proteiche: queste vengono tradotte a partire da un unico RNA (policistronico). I geni strutturali daranno vita ad un unico trascritto situato a valle dei tratti regolativi. Gli operoni vengono definiti **inducibili o reprimibili** a seconda se possono essere accesi o spenti; gli stessi sono detti **anabolici o catabolici** a seconda se presiedono a processi di **sintesi o di degradazione di un substrato**. Generalmente gli operoni inducibili sono catabolici e quelli reprimibili sono anabolici. Il substrato, inoltre può agire da **induttore o corepressore**. Esaminiamo il funzionamento di un **operone inducibile**, quindi catabolico, il cui substrato è anche induttore. Si tratta dell'operone del lattosio, o **operone lac**. Il lattosio viene scisso in glucosio e galattosio da tre prodotti proteici che sono la permeasi, la tras-acetilasi e la β -galattosidasi. In particolare, la β -galattosidasi scinde il lattosio e la permeasi agevola il passaggio di lattosio all'interno della cellula. Il ruolo dell'acetilasi non è ancora ben conosciuto. In assenza di lattosio, una proteina, il **repressore**, proveniente dall'attività di un altro gene, lega l'operatore inibendo la trascrizione. Quando nel mezzo di coltura è presente il lattosio, questo (il lattosio stesso) è in grado di legare il repressore (substrato legato all'operone nella regione che precede la 5'UTR, cioè la regione del promotore, che promuove la trascrizione) in un sito diverso da quello che ha affinità per l'operatore (specifica regione del promotore a cui si può legare il substrato che funge da repressore della trascrizione). Il legame del lattosio, che funge da induttore, con il repressore comporta un cambiamento nella tridimensionalità di quest'ultimo che così viene meno al legame con il sito dell'operatore. In questo modo, in presenza dell'induttore è possibile trascrivere i geni strutturali per produrre, dall'mRNA policistronico gli enzimi necessari per l'ottenimento del glucosio e galattosio. È noto che un catabolita del glucosio è in grado di agire sui livelli di cAMP attraverso l'inibizione dell'**adenil-ciclasi** (enzima che sintetizza cAMP), oppure attivando la **fosfodiesterasi** (enzima che degrada il cAMP in AMP). Il cAMP è in grado di legare una proteina nota come CAP, catabolite activator protein, oppure CRP, cAMP receptor protein. Se si somministra il glucosio l'operone viene represso, mentre l'aggiunta di cAMP lo attiva nuovamente. Quindi il cAMP,

legato a CAP, è un regolatore dell'operone del lattosio. In definitiva, perché l'operone del lattosio funzioni è necessario che sia presente lattosio ma che sia assente il glucosio; inoltre è evidente che questo operone è **regolato negativamente**, cioè inibito, dal legame col repressore ed è **regolato positivamente**, cioè attivato, dal legame con il cAMP-CAP. Gli **operoni reprimibili** sono quelli anabolici, e sono formati da geni strutturali che concorrono alla sintesi di un prodotto finale (substrato, **corepressore**) che si lega ad un repressore inattivo. Il cambiamento di conformazione che ne consegue conferisce al repressore attività di legame per l'operatore e ciò blocca la trascrizione.

Regolazione a livello post trascrizionale gli operoni anabolici possono possedere un altro livello di regolazione che dipende dalle conformazioni del trascritto. Il meccanismo che porta alla sintesi del triptofano è del tutto simile al precedente. In aggiunta però bisogna dire che esiste un tratto di DNA fra l'operatore ed i geni strutturali, definito, leader, che contiene il sito **attenuatore**. L'**attenuazione** è il meccanismo dipendente dalle conformazioni dell'RNA trascritto sul tratto leader ed in particolare sul sito attenuatore. L'RNA corrispondente al tratto leader è caratterizzato dal possedere molte triplette che specificano per il prodotto finale. In presenza di quantità ingenti di istidina, vi saranno molti tRNA^{His} carichi che si porteranno sui ribosomi che aggrediranno il trascritto. Questo può ripiegarsi in strutture alternative che sono dipendenti dalla linearizzazione indotta dalla presenza di più o meno ribosomi. Se ci sono molti ribosomi attivi per la presenza di molti tRNA^{His}, sarà linearizzato il primo tratto con conseguente ripiegamento a forcina di un tratto a valle, che rappresenterà il segnale di termine della trascrizione, con distacco prematuro dell'RNA polimerasi. Non saranno quindi trascritti i geni strutturali per la sintesi dell'istidina. Viceversa, se vi sono bassi livelli di tRNA^{His}, la conformazione responsabile dell'RNA polimerasi non verrà assunta in quanto si formeranno forcine verso il 5'P a causa dei pochi ribosomi attivi. L'RNA polimerasi potrà quindi trascrivere i geni strutturali. Il triptofano può regolare i suoi tRNA (attenuazione). Nel secondo caso, l'attenuazione si sviluppa attraverso conformazioni alternative del trascritto che segnalano alla RNA polimerasi di terminare o continuare la sua attività. Un altro meccanismo legato alla possibilità di formare strutture ripiegate alternative dell'mRNA è quello relativo alla possibilità di innescare o meno attività ribozimiche connesse con le possibili strutture a forcina.

Regolazione a livello traduzionale le regioni di mRNA che legano metaboliti (senza attività ribozimiche) si definiscono **riboswitch**. Sono regioni che precedono la sequenza codificante e si trovano nei batteri, nei funghi e nelle piante. Sino ad ora non sono stati trovati nell'uomo. Esiste un **metabolita-sensing domain**, dominio di riconoscimento per il metabolita, che quando attivato, induce una conformazione che maschera il sito di inizio della traduzione e ne provoca l'inibizione.

EUCARIOTI

Regolazione a livello trascrizionale tranne poche eccezioni non sono stati proposti modelli simili a quello dell'operone. L'assenza di mRNA policistronici, sembra sfavorire questo modello ed indica una maggiore complessità dei meccanismi di regolazione in un genoma nel quale molti geni fanno parte di unità funzionali regolate indipendentemente; uno stesso segnale infatti induce risposte differenti e/o segnali diversi che possono indurre la stessa risposta. Se il gene A ad esempio, partecipa all'espletamento delle funzioni a,b,c,d ecc.. questo può essere regolato diversamente se partecipa alla funzione a o b ecc. A tale scopo, si distinguono sequenze regolative che sono localizzate verso l'estremo 5' anche alcune migliaia di nucleotidi a monte del promotore, e sono quindi, sullo stesso filamento di DNA, e per questo definiti **elementi in cis**. Queste sequenze non vengono trascritte e legano proteine che viaggiano nel nucleo ed agiscono quindi come elementi regolatori **in trans**.

Proteine come i recettori per gli ormoni steroidei possono essere fattori *trans* attivanti di sequenze in cis. L'interazione fra proteine può avvenire fra proteine che si aggregano sul promotore e una proteina localizzata su siti distanti da esso o più proteine localizzate sullo stesso sito e proteine aggregate sul promotore. Allfrey, circa 40 anni fa, scoprì che esisteva una correlazione tra l'incremento dell'**acetilazione degli istoni** e l'aumento dell'efficienza della trascrizione. Tutte le modifiche che regolano il compattamento ed il de compattamento della cromatina e che quindi contribuiscono al suo rimodellamento rientrano a pieno titolo nei meccanismi di regolazione dell'espressione genica. Anche la metilazione del DNA è un importante fattore di **rimodellamento della cromatina**. Esso agisce favorendo lo stato di eterocromatina in sinergia con la metilazione degli istoni. Il cromosoma X inattivo è estesamente ipermetilato. La metilazione avviene laddove ci sono coppie CG. Esse si possono estendere per 1-2kb costituendo le cosiddette **isole CG** che, nel genoma umano, sono circa 45.000 e sono localizzate in prossimità dei siti di inizio della trascrizione. La metilazione del DNA nei mammiferi è responsabile di casi in cui l'espressione di un gene è controllata dalla sua origine parentale. **L'imprinting** è quel fenomeno per cui l'espressione di un gene è determinata dalla sua origine parentale. Ciò è dovuto al fatto che il gene è stato "marcato" in modo che ricordi da quale genitore provenga. più di 20 geni "imprantati" sono stati identificati sia nel topo che nell'uomo e si è visto che il pattern di metilazione marca i geni imprantati si sviluppa nelle cellule somatiche nel periodo di tempo che intercorre tra la formazione dello zigote e l'impianto. Le cellule germinali primordiali (PGC) per contro, subiscono un processo di totale de metilazione. Durante la gametogenesi, tutto il DNA viene metilato così che il gamete maschile e quello femminile sono caratterizzati da DNA completamente metilato quando, fondendosi durante la fecondazione, danno origine allo zigote. L'attività di regolazione di geni legati alla metilazione del DNA è **epigenetica**, cioè avviene tramite processi chimici che non comportano cambiamenti di quanto scritto sul DNA e possono modificare il fenotipo dell'individuo e/o della progenie. Ciò vale anche per modificazioni che riguardino gli istoni e quindi il rimodellamento della cromatina in senso generale. La possibilità che il pattern epigenetico in genere possa determinare caratteri apre la possibilità al fatto che il perturbare tale pattern possa incidere sulla loro trasmissione. Nei topi, il regime alimentare in gravidanza sembra influenzare meccanismi di regolazione genetica su base epigenetica incidendo nella linea germinale del feto. Una dieta che porti all'obesità quindi potrebbe generare la trasmissione del diabete alla generazione successiva o modificazioni indotte da sostanze inquinanti potrebbero ugualmente alterare il pattern di metilazione del DNA e/o degli istoni incidendo sulla linea germinale del feto. Questi, quindi, potrebbe da adulto portare con sé e trasmettere alle generazioni successive il danno, anche se in un ambiente salubre. Il rimodellamento dei territori nucleari può infine essere considerato un meccanismo di regolazione genica. Infatti un singolo fattore di trascrizione potrebbe agire contemporaneamente su più siti di azione che, avvicinandosi, ne favorirebbero l'attività senza richiedere alla cellula una produzione tale da farlo agire in punti distanti dell'architettura cromatinica.

Regolazione a livello post-trascrizionale nel 1993 sono state identificate molecole di RNA piccolissime con funzioni di regolazione dell'espressione del gene. Recentemente si è visto che questi microRNA (**miRNA**) sono presenti in tutti gli eucarioti. Dodici geni che producono i miRNA sono stati identificati analizzando il genoma delle cellule staminali di topo, vengono trascritti dalla **RNA polimerasi II** e maturano presentando un **cap al 5' ed una coda al poli A al 3'**. La loro maturazione inizia nel nucleo a partire da un **pri-miRNA (miRNA primario)** che riduce le sue dimensioni a circa 70 nucleotidi (**pre-miRNA, precursore**) grazie a un complesso noto come **microprocessore** contenente le proteine (**Drosha/Pasha**). L'**esportina 5** sembra essere responsabile del passaggio del pre-miRNA, sempre ripiegato a forcina, nel citoplasma dove l'endonucleasi **dicer** trasforma il pre-miRNA in una molecola a

doppio filamento grazie all'abolizione dell'ansa ripiegata. Uno dei due filamenti è il miRNA maturo che viene incorporato nel complesso **RISC (complesso del silenziamento indotto dall'RNA)**. I miRNA si concentrano nei P-bodies (processing bodies) citoplasmatici: regioni ove avviene anche il decapping dell'mRNA. Il miRNA riconosce per complementarità di basi un mRNA bersaglio, che grazie a RISC viene degradato. I miRNA possono riconoscere più di un mRNA bersaglio, non essendo necessario un perfetto riconoscimento fra basi complementari. Alcuni miRNA possono essere di derivazione intronica e pertanto denominarsi **mirtroni**. Questi non necessitano degli interventi di Drosha o Pasha. Il meccanismo innescato dai miRNA è alla base del silenziamento indotto dai **siRNA** (corti RNA interferenti). Questo tipo di regolazione è stato descritto da Fire nel 1998. Fu osservato in *Caenorhabditis elegans* uno specifico silenziamento di geni altamente simili nella sequenza nucleotidica a un duplex RNA-RNA che era stato iniettato. È ora chiaro che da questo duplex derivano i siRNA che sono in grado di interagire con RISC per la degradazione di mRNA. Questi siRNA non originano quindi da geni cellulari, ma sono oligonucleotidi sintetici fabbricati per distruggere selettivamente l'attività di un dato gene e pertanto riconoscono in modo perfetto l'mRNA bersaglio; si pensa che i siRNA possano essere usati per combattere specificamente infezioni virali. Alcuni siRNA possono derivare dalla trascrizione di pseudo geni (in questo caso verranno denominati endo-siRNA) o da duplex RNA-RNA formati da una RNA polimerasi RNA-dipendente di origine virale. Un particolare tipo di piccolissimo RNA è costituito da Piwi (pi)RNA. Si tratta di RNA costituiti da 25-30 nucleotidi che derivano da precursori più lunghi a singolo filamento che, quindi, maturano senza l'intervento di Drosha o Pasha. Il complesso proteico con il quale agiscono è composto principalmente dalla proteina Piwi che appartiene ad una sottofamiglia di Ago (proteine argonauta). Questi piccolissimi RNA possono indurre un'accelerata deadenilazione (depolimerizzazione della coda di poli(A)) degli mRNA facilitandone la degradazione. Sembra anche che esista un'attività regolatrice a livello trascrizionale: infatti, è probabile che sia i miRNA che i siRNA siano in grado di inibire la trascrizione inducendo in qualche modo la metilazione del DNA ed agendo sul compattamento della cromatina. Fra i meccanismi di regolazione genica a livello post-trascrizionale è bene ricordare in fine la possibilità di usare siti alternativi di inizio della trascrizione o lo splicing alternativo.

Regolazione a livello traduzionale e post-traduzionale quando una proteina è stata sintetizzata, questa può essere soggetta a meccanismi di maturazione che avvengono in modo diverso secondo l'occorrenza. Ad esempio la *proopiomelanocortina (POMC)* è una grossa proteina da cui si originano sia l'ACTH, ormone adrenocorticotropo, che l'MSH, ormone melanocita-stimolante. La POMC viene "tagliata" nel lobo anteriore dell'adenoipofisi in modo da generare l'ACTH, mentre nel lobo intermedio viene generato l'MSH.

QUARANTESIMA LEZIONE: REGOLAZIONE DEL CICLO CELLULARE

Alcuni sistemi, definibili come veri e propri controlli di qualità, verificano il passaggio attraverso le diverse fasi del ciclo cellulare. Il passaggio da una fase all'altra non è un evento automatico, anzi la transizione tra le fasi è sottoposta a continue verifiche. È richiesto che ogni fase sia correttamente terminata affinché la successiva possa essere avviata, quindi la cellula è sempre sotto esame. Più di esaminazione si potrebbe parlare di autocertificazione perché essa stessa effettua tutte le verifiche. Queste verifiche sono denominate **checkpoint o punti di controllo** del ciclo cellulare. Il sistema dei checkpoint opera affinché le diverse fasi si attivino in sequenza temporale ordinata; sono tre i checkpoint del ciclo cellulare che sono stati più studiati:

- 1) Il checkpoint che controlla l'ingresso nella fase S (**transizione $G_1 \rightarrow S$**). Questo controlla che il DNA sia integro, che vi siano gli elementi nutritivi necessari per la crescita cellulare e che nell'ambiente extracellulare vi siano i fattori di crescita idonei. Il non superamento di questo checkpoint provoca l'uscita della cellula dal ciclo; una permanenza prolungata fuori dal ciclo è descritta come fase G_0 o quiescenza cellulare.
- 2) Il checkpoint che controlla l'ingresso nella fase M (**transizione $G_2 \rightarrow M$**). A questo punto la cellula controlla che il DNA non abbia subito danni o mutazioni, il non superamento di tale controllo impedisce alla cellula di proseguire con la mitosi.
- 3) Il checkpoint che controlla il completamento della fase M (**metafase $\rightarrow$ citodieresi**). Il checkpoint mitotico opera affinché sia controllata la progressione dello mitosi; in questo modo è verificata l'interazione tra le fibre del fuso mitotico ed i diversi cromosomi, ed il loro corretto allineamento nella zona equatoriale della cellula.

Qualora non siano soddisfatti i requisiti richiesti la progressione del ciclo cellulare può essere bloccata ai vari punti di controllo. Il blocco è garantito dall'interazione degli elementi molecolari che costituiscono il checkpoint con il macchinario che controlla la progressione cellulare.

L'interruttore che controlla il ciclo cellulare Come sono orchestrati i cambiamenti di una cellula quando entra in mitosi? Chi decide se il DNA deve essere replicato? Come fa la cellula a decidere se uscire o meno dal ciclo? Perché molte cellule non riescono più ad arrestare il ciclo cellulare e si dividono in continuazione. Per rispondere a queste domande è necessario identificare quale macchinario molecolare controllasse il ciclo cellulare. All'inizio degli anni '70 esperimenti basati sulla fusione di cellule in diverse fasi del ciclo cellulare sottolinearono che se una cellula in mitosi veniva fusa con una cellula in una qualsiasi delle altre fasi, il nucleo di quest'ultima assumeva degli aspetti mitotici (dissolvimento dell'involucro nucleare, blando compattamento dei cromosomi); se invece una cellula in fase S veniva fusa con una in G_1 , il nucleo di quest'ultima iniziava a replicare il DNA. Al contrario se la cellula in fase S veniva fusa con una in G_2 , quest'ultima non soltanto ricominciava la duplicazione del DNA, ma attendeva che il completo duplicamento del materiale neo-fuso per entrare in mitosi. Queste osservazioni suggerirono l'esistenza di vari fattori regolativi. Non fu però chiaro quali fossero questi meccanismi.

Il meccanismo principale che regola il ciclo cellulare consiste in una modificazione post-traduzionale quale la *fosforilazione* dei residui di serina e treonina (aggiunta di un gruppo fosfato prelevato dall'ATP) di particolari proteine cellulari. Sembra sorprendente che soltanto la modifica post traduzionale di una proteina possa essere così influente nel ciclo cellulare. Il gruppo fosfato è relativamente grande, è carico negativamente, quindi è molto idrofilico, perciò, se aggiunto al gruppo $-OH$ della serina o della treonina, modifica radicalmente la distribuzione spaziale degli amminoacidi adiacenti provocando un cambiamento locale della struttura della proteina capace di indurre delle profonde variazioni nella sua funzione.

Diversi modelli hanno contribuito a definire il macchinario che controlla il ciclo cellulare in particolare gli ovociti di rana, in quanto sono fermi nella fase G_2 . Normalmente la stimolazione ormonale attiva la progressione del ciclo con l'entrata della fase M della meiosi. Agli inizi degli anni '70 gruppi di studi scoprirono che estratti proteici cellulari prelevati da oociti stimolati con ormoni, quindi commissionati ad entrare in mitosi, se micro iniettati in oociti in fase G_2 ne promuovevano l'entrata in fase M. questi risultati mostravano che il supposto "fattore" era di natura proteica. Questo fattore era stato denominato **MPF (maturing promoting factor)** poiché la ripresa della meiosi negli oociti è conosciuta come maturazione del oocita. Il lievito, grazie ad un genoma più semplice ed alla facilità di crescita in laboratorio è stato un modello di studio indispensabile per la comprensione dei meccanismi del ciclo cellulare. In *Saccharomyces*

cervisiae sono stati generati e studiati dei mutanti *cdc* (mutanti che presentano difetti nel *ciclo di divisione cellulare*); molte mutazioni del gene *cdc* impediscono ai lieviti che le contengono di dividersi e quindi di proliferare. È stato quindi necessario selezionare delle mutazioni particolari: **mutazioni temperatura-sensibili** comunemente indicate con *ts*. A temperature permissive i mutanti *cdc-ts* si dividono normalmente, ma a temperature non permissive, solitamente più alte della norma, la mutazione manifesta il suo effetto. In genere si tratta di mutazioni puntiformi, che manifestano il loro effetto alterando la struttura della proteina e quindi la sua funzione. Diversi geni che generano mutazioni *xdx* sono stati identificati nel lievito; il più significativo è rappresentato dal gene ***cdc2* e *cdc28***. I lieviti mutanti per questi due geni si bloccavano alle temperature non permissive in due precise fasi del ciclo cellulare: nella transizione da G_1 ad S e nella transizione da G_2 a M; il blocco nella fase G_1 avveniva in un punto preciso, definito START o punto di restrizione (il checkpoint $G_1 - S$ corrisponde allo start, per cui se le cellule in fase G_1 proseguono oltre questo punto continueranno il ciclo, altrimenti entreranno in quiescenza). L'isolamento del gene *cdc2*, il suo sequenziamento, l'analisi bioinformatica ed infine le conferme biochimiche hanno dimostrato che questo gene codifica un enzima con attività **serina-treonina chinasi**. Nell'uomo esistono vari orologi del gene *cdc2* e alcuni di questi possono complementare la mutazione del lievito. La complementazione si basa sull'introduzione in cellule di lievito difettive per *cdc2* del gene umano corrispondente; questo è risultato in grado di sostituire efficacemente il gene di lievito permettendo l'avanzamento nel ciclo alla temperatura non permissiva. La complementazione dimostra la conservazione evolutiva del macchinario di controllo del ciclo cellulare. Un terzo contributo alla definizione del sistema di controllo del ciclo si deve a studi su fasi iniziali dell'embriogenesi del riccio di mare. Osservando i cambiamenti nel quadro proteico durante le caratteristiche rapide mitosi che si succedono a fasi S (assenza di fasi G_1 e G_2 ben distinte) scoprirono che due proteine si accumulavano durante l'interfase per poi scomparire durante la mitosi. Queste proteine venivano sintetizzate ad un tasso costante durante l'interfase determinando così il loro accumulo, ma venivano distrutte durante la mitosi. L'espressione oscillatoria legata al ciclo cellulare ha suggerito che tali proteine fossero denominate **ciclina**, in particolare **ciclina A e ciclina B**. nel frattempo fu dimostrato che il fattore MPF è in realtà un complesso formato da due subunità: una catalitica, con attività serina-treonina chinasi, omologa a *cdc2* di lievito, ed una regolativa, richiesta per l'attività enzimatica che si accumula durante il ciclo cellulare, con un picco prima dell'entrata in mitosi.

Regolazione di MPF il passaggio attraverso le diverse fasi del ciclo cellulare è permesso dall'azione di una chinasi che funziona insieme ad una subunità regolativa, la ciclina: il complesso chinasi-ciclina promuove la mitosi, senza la ciclina la chinasi non è attiva. Per questa ragione è denominata **Cdk (cicli dependent kinase)**. L'attivazione della Cdk in mitosi evidenzia che non è sufficiente accumulare la ciclina e che il complesso Cdk-ciclina è soggetto a molteplici regolazioni. La ciclina, in questo caso la ciclina, incomincia ad accumularsi a partire dalla fase S ma il complesso MPF non si attiva se non al momento della transizione G_2/M . Se bastasse l'interazione tra ciclina B e Cdk allora un po' di MPF dovrebbe essere già attivo prima della mitosi. Ma questo non avviene. Ciò significa che i complessi ciclina-Cdk formati prima dell'entrata in mitosi, non sono attivi. Allora come è possibile l'attivazione di MPF proprio come si osserva normalmente durante il ciclo? La risposta sta nella fosforilazione/ defosforilazione di alcuni residui amminioacidici di Cdk. La chinasi è soggetta al controllo da parte di altre chinasi, le quali, aggiungendo gruppi fosfati in parti critiche di Cdk esercitano un ruolo fondamentale nel determinare l'attivazione rapida, quasi istantanea del complesso. Appena si forma un complesso tra Cdk ed una ciclina B, la treonina 161 di Cdk è fosforilata da un enzima conosciuto come **CAK (Cdk activating Kinase)**; se la cellula non è in mitosi, altri residui di Cdk quali la tirosina 15, e nei vertebrati, anche la tirosina 14, sono soggetti a fosforilazione inibitoria. Per comprendere perché queste modificazioni regolano l'attività di MPF, è necessario prima descrivere i

meccanismi utilizzati dalla ciclina per controllare l'attività enzimatica di Cdk. Il sito attivo di Cdk è caratterizzato da un particolare insenatura dell'enzima dove si lega l'ATP e dove viene anche inserita la porzione della proteina (il substrato) che dovrà essere fosforilata; l'accesso all'insenatura è impedito, in assenza della ciclina, da una particolare regione della Cdk stessa che potremmo definire auto-inibitoria, e conosciuta come **t-loop** (ansa che contiene la treonina). In assenza di ciclina, il t-loop si ripiega sull'imboccatura del sito provocando un ingombro sterico. Questa è una condizione di preattivazione, ma per ottenere la piena attivazione di Cdk è richiesta un'altra modificazione: è necessario che la treonina 161 che si trova sul t-loop venga defosforilata. CAK, a sua volta una Cdk, è responsabile di questa fosforilazione che provoca un ulteriore allontanamento del T-loop dall'imboccatura del sito catalitico e rafforza l'interazione tra ciclina e Cdk; l'effetto della fosforilazione sulla treonina 161 si evidenzia con un aumento dell'attività chinasi pari circa a 300 volte. Il legame con la ciclina determina anche il riposizionamento di due particolari residui: una treonina, la 14, ed una tirosina, la 15, che sono anche essi punti fondamentali di regolazione della Cdk. questi due residui, a loro volta modificati da fosforilazioni, possono bloccare la capacità di Cdk di idrolizzare ATP. Proprio grazie all'aggiunta rimozioni di gruppi fosfato a questi due residui si rende possibile l'attivazione rapida e sincronizzata di MPF con l'inizio della mitosi.

Tuttavia, affinché la mitosi inizi, il motore Cdk deve essere al massimo della sua potenza. Per accendere rapidamente ed in maniera sincrona i diversi complessi Cdk-ciclina, condizione necessaria per muovere la cellula verso la mitosi, verranno tolti i due fosfati presenti sulla treonina 14 e la tirosina 15 utilizzando una fosfatasi, conosciuta con il nome di **Cdc25**. Sebbene descritta nel contesto della transizione $G_2 \rightarrow M$, la fine regolazione di Cdk si ritrova simile, per molti aspetti, negli altri momenti decisionali del ciclo; a riprova di ciò agiscono più fosfatasi del tipo Cdc25, alcune coinvolte nella transizione da transizione $G_2 \rightarrow M$, altre nella transizione $G_1 \rightarrow S$.

La degradazione della ciclina ed il conseguente spegnimento di MPF controllano il transito e l'uscita dalla fase M I diagrammi che rappresentano l'attiva chinasi ed i livelli di ciclina, illustrano chiaramente che il transito attraverso la mitosi (prima dell'uscita) si accompagna alla scomparsa (degradazione) della ciclina ed al conseguente spegnimento dell'attività chinasi di MPF. Il principale strumento per la degradazione delle proteine cellulari è il sistema **ubiquitina-proteosoma**: anche la ciclina, nel corso della mitosi, è degradata da questo sistema. Il proteosoma è un complesso multi proteico, evidenziabile al microscopio elettronico come una struttura cilindrica, dove risiedono le proteasi che formano una camera degradativa e due zone regolative, definite coperchi. L'ubiquitina, è invece un piccolo peptide formato da una decina di amminoacidi, che viene attaccato covalentemente al gruppo amminico di una lisina presente nella proteina da degradare; ad una prima ubiquitina ne vengono concatenate subito molte altre a formare una catena di poli-ubiquitina. La **poli-ubiquitinizzazione**, è riconosciuta dal sistema di coperchi (regolativi) che controlla l'ingresso nella camera proteolitica del proteosoma: praticamente la poli-ubiquitinizzazione rappresenta una **sequenza per l'indirizzamento** nel proteosoma. La poli-ubiquitinizzazione è permessa dall'azione concertata di tre enzimi, denominati **E1, E2 ed E3**, che trasferiscono l'ubiquitina sulla proteina bersaglio. L'ubiquitina viene coniugata al substrato proteico tramite un legame isopeptidico tra il gruppo amminico di una lisina e la glicina carbossi-terminale dell'ubiquitina. Il passo più critico è realizzato dall'enzima E3 perché questo riconosce la proteina da degradare e trasferisce su di essa le ubiquitine; per questo motivo gli enzimi E3 sono anche definiti **ubiquitina-ligasi**. È evidente che, se per progredire ed uscire dalla meiosi, è necessario degradare la ciclina B, una ubiquitina ligasi, dovrà specificatamente riconoscere la ciclina B solo dopo l'inizio della mitosi, quindi solo successivamente all'attivazione di MPF, altrimenti non si potrebbe attivare mai la Cdk. Durante la mitosi il complesso multi proteico definito **anaphase promoting complex APC** promuove l'ubiquitinizzazione ciclina B.

Attivazione di Cdk, mitosi ed i substrati di MPF

Quale sia l'intimo motivo per cui l'attivazione di Cdk consente l'ingresso in mitosi giunge spontaneo immaginare che l'avvio della divisione si raggiunge grazie alla fosforilazione in serina e treonina di proteine cellulari specifiche, capaci di regolare la formazione del fuso mitotico, compattamento dei cromosomi etc. In verità, non sappiamo quali siano tutti i substrati di MPF, diversi studi hanno dimostrato che il disassemblaggio della lamina nucleare costituisce il prerequisito per la disaggregazione dell'involucro nucleare in piccole vescicole, che rende quindi disponibili i cromosomi, che vanno progressivamente compattandosi all'interazione con i microtubuli. Le lamine nucleari sono substrati di Cdk, e una volta fosforilate, depolimerizzano facilitando la vescicolazione dell'involucro nucleare. Anche l'apparato del Golgi, i mitocondri ed il reticolo endoplasmatico si frammentano in piccole vescicole durante la mitosi in modo molto simile all'involucro nucleare. In questo caso è molto probabile che alcune proteine coinvolte nel mantenimento dell'organizzazione tridimensionale di tali organuli, vengano fosforilate da Cdk e questa modificazione incida sulla funzionalità delle stesse. Anche i microtubuli subiscono mutamenti radicali, richiesti per il costituirsi del fuso mitotico. La stabilità dei microtubuli viene rapidamente intaccata durante l'avvicinamento alla mitosi, presupposto indispensabile per un rapido disassemblaggio. Anche in questa fase risulta protagonista Cdk che attraverso la fosforilazione, ad esempio della proteina MAP4, interviene nel controllo della stabilità dei microtubuli. Ancora oscura risulta invece la regolazione del cambiamento più macroscopico della mitosi: il compattamento dei cromosomi; anche se Cdk potrebbe regolare alcuni aspetti del processo fosforilando degli enzimi denominati **condensine**, che sono coinvolte nell'organizzazione dell'architettura dei cromosomi.

Complessità del ciclo cellulare dei mammiferi

Per completare la descrizione di tali meccanismi regolativi dobbiamo discutere di cosa succede nei mammiferi, organismi al più elevato livello nella scala zoologica. Ogni diversa fase del ciclo necessita della formazione di uno specifico complesso Cdk-ciclina; già nel lievito, dunque, sono presenti diverse classi di cicline che per semplicità distinte in:

- Cicline G_1 che legano Cdk ed agiscono nel momento iniziale della fase G_1 ma anche in un periodo più avanzato della medesima fase, cioè in prossimità della transizione alla fase S (START o punto di restrizione);
- Cicline S che legano Cdk durante la fase S e regolano la replicazione del DNA;
- Cicline M o mitotiche, che legano Cdk con l'approssimarsi della mitosi regolando questa fase, come abbiamo descritto precedentemente.

Nei mammiferi un ulteriore livello di complessità è rappresentato da più Cdk, per cui le differenti fasi del ciclo sono caratterizzate dall'attività di diverse Cdk legate a diverse cicline. Ad esempio, il transito attraverso i momenti iniziali della fase G_1 è garantito dai complessi formati dalle **cicline D (D1, D2, D3)** e dalla chinasi **Cdk4** e **Cdk6**, mentre la fase più tardiva della G_1 e la transizione $G_1 \rightarrow S$ sono sotto il controllo della chinasi **cdk2** e della **ciclina E**. Il transito attraverso la fase S è invece permesso dal complesso formato dalla **ciclina A** e dalla chinasi **Cdk2**. Infine la mitosi è attivata da **Cdk1** associata con la **ciclina B**.

Il controllo della transizione $G_1 \rightarrow S$ nei mammiferi la scoperta e la caratterizzazione dei sistemi di controllo della transizione dalla fase G_1 alla fase S, sono state fondamentali per l'identificazione delle alterazioni che promuovono la proliferazione incontrollata delle cellule tumorali. Riuscire ad identificare e caratterizzare le alterazioni nel controllo del ciclo cellulare è normale che rappresenti il passo essenziale

per sviluppare più efficaci e mirate terapie anti-neoplastiche. Un controllo fondamentale della progressione $G_1 \rightarrow S$ è costituito dal fattore di trascrizione E2F che forma un etero dimero, associandosi ad un partner appartenente al gruppo di proteine DP1, quindi si lega al DNA come complesso E2F-DP1. Questo complesso trascrizionale lega sequenze specifiche di DNA presenti nei promotori di molti geni necessari per l'entrata nella fase S del ciclo e la replicazione del DNA. Al complesso E2F/DP1 può associarsi ad una terza proteina, chiamata **pRb (proteina del retinoblastoma)** che modula l'attività trascrizione di E2F in relazione alle diverse fasi del ciclo cellulare. pRb è il prodotto di un anti-oncogene, più precisamente un **tumor suppressor**. L'oncosoppressore Rb, come altri membri della famiglia dei geni oncosoppressore, agisce bloccando la crescita cellulare; i geni oncosoppressori sono freni del ciclo cellulare e se assenti o mutati, permettono la proliferazione incontrollata delle cellule generando così un tumore. pRb esplica l'azione di freno, o meglio, di inibitore del ciclo cellulare legandosi al complesso E2F/DP1 reprimendo la trascrizione dei geni. L'azione repressiva è permessa dal reclutamento, presso questi promotori, degli enzimi modificatori della cromatina, quali le **HDAC (Histone DeAcetylase)**. Le HDAC promuovono la presenza di cariche positive su particolari lisine degli istoni, compattando la cromatina. Quindi pRb si comportano come un "guardiano" del ciclo cellulare in quanto rende meno accessibili i promotori dei geni controllati da E2F, stabilizzando praticamente, l'avvolgimento del DNA sugli istoni. La trascrizione dei geni controllato da E2F, necessari per l'entrata in fase S, si deve effettuare, allorché la cellula intraprende il percorso di progressione nel ciclo cellulare e quindi di divisione. È il momento in cui la cellula, necessariamente, deve rilasciare pRb dal particolare abbraccio che spegne E2F/DP1; tale distacco di pRb è autorizzato dalla fosforilazione che, a sua volta, è innescata attraverso una complessa via di trasduzione del segnale, della presenza nell'ambiente extracellulare di fattori di crescita. Le chinasi che fosforilano pRb sono le Cdk, in particolare i complessi cdk4-ciclina D, cdk2-ciclina E e Cdk2-ciclina A; ciò conferma che pRb risulta essere fosforilata non solo nella fase G_1 di una cellula in ciclo, ma anche nella fase S e fino all'approssimarsi della mitosi. Al contrario, in una cellula che è uscita dal ciclo ed è ferma nella fase G_0 , pRb non sarà fosforilata ed agirà da repressore della trascrizione. Alcuni virus hanno la capacità di promuovere la proliferazione delle cellule infettate per i propri fini. Questi virus sfruttano il macchinario replicativo della cellula per moltiplicare il proprio genoma. Per promuovere la replicazione cellulare producono delle proteine che legano pRb ed inducono il suo distacco da E2F/DP1.

Cicline d e controllo dell'ambiente extracellulare sul ciclo cellulare

Dati sperimentali su linee cellulari in coltura hanno dimostrato che rimozione dei fattori di crescita dal terreno di coltura determina l'accumulo delle cellule nella fase G_0 , l'aggiunta dei fattori di crescita a cellule in G_0 , stimola il loro rientro nel ciclo. Nelle fasi più precoci della risposta alla stimolazione con i fattori di crescita, entro i primi minuti, si osserva una ondata massiccia di trascrizione di nuovi geni, conosciuta come **risposta precoce immediata da siero**. L'attivazione dei recettori per i fattori di crescita presenti nel siero innesca una complessa cascata di eventi che trova conclusione nella trascrizione di nuovi geni. A questa prima ondata di nuova espressione genica ne segue una seconda (in cui troviamo anche le cicline D) che è promossa principalmente dai nuovi fattori di trascrizione prodotti con la prima ondata. L'aumento della espressione di queste cicline comporta l'attivazione di cdk4, cui segue la fosforilazione di pRb, l'attivazione della trascrizione E2F-dipendente e la progressione nel ciclo. Poiché la quantità di ciclina D costituisce il principale strumento attraverso il quale viene promossa l'entrata e la progressione nella fase G_1 del ciclo cellulare, in principio ci aspetteremmo che cellule che esprimono livelli più elevati di queste cicline dovrebbero avere un'aumentata capacità proliferativa perché esse tendono a non entrare in fase G_0 . Questa ipotesi è stata confermata.

Checkpoint del blocco del ciclo cellulare per completare adeguatamente l'illustrazione dei meccanismi di regolazione del ciclo cellulare e quindi anche quelli che lo interrompono, può essere didatticamente utile paragonare il ciclo cellulare a quanto pare può accadere se ciascuno di noi dovesse trasferirsi da una città all'altra viaggiando in treno. Può accadere che un evento eccezionale e repentino si presenti durante il tragitto, obbligando il convoglio ad una fermata non programmata. Analogamente una cellula, sebbene abbia verificato che tutte le condizioni richieste alla sua progressione lungo il ciclo cellulare siano soddisfatte, può trovarsi di fronte ad una situazione d'emergenza non prevista che richiede un blocco immediato del ciclo cellulare. Molte sono le situazioni d'emergenza che possono esigere il rapido blocco del ciclo, ma sicuramente la più studiata è rappresentata dalla condizione di danno al DNA. Il nucleo contiene dei guardiani molecolari che, in continuazione, provvedono a monitorare l'integrità del DNA. Molte volte per cause naturali, come radioattività, radiazioni solari, fumo di sigaretta, ecc. L'esposizione a questi fattori o anche a radiazioni ionizzanti, ad esempio, provoca nel doppio filamento del DNA (**DSB, double strand breaks**), che possono essere molto pericolose se non riparate correttamente; infatti DSB non adeguatamente riparate possono creare traslocazioni cromosomiche con possibile attivazione di proto-oncogeni o inattivazione di anti-oncogeni. La serin-treonina chinasi ATM, che si attiva con un meccanismo non ancora pienamente compreso in seguito a rotture della doppia elica, costituisce, appunto un significativo sensore di DSB. L'acronimo ATM, indica che mutazioni di questo gene sono responsabili, nell'uomo, di una malattia dal quadro clinico molto complesso: la **ataxia telangiectasia**. I pazienti affetti da tale patologia possono presentare ritardo mentale, difetti nel sistema immunitario, alta frequenza d'insorgenza dei tumori e sensibilità all'esposizione ai raggi X. ATM, se attivata dal danno al DNA, a sua volta attiva altre chinasi tra le quali Chk2 (**checkpoint kinase1** chinasi 2 del checkpoint). Queste chinasi fosforilano a loro volta, alcuni componenti dei sistemi di riparazione del DNA ed elementi che controllano il ciclo cellulare, tra i quali CDC25 e p53. CDC25 ha il compito di attivare MPF, così come è un fondamentale regolatore dell'attività delle Cdk, le chinasi che controllano il ciclo. Quando CDC25 è fosforilata fuoriesce dal nucleo e la sua attività fosfataseica viene indebolita. L'effetto finale consiste nella mancata attivazione delle Cdk ed il successivo blocco del ciclo cellulare, necessario per poter riparare il DNA e quindi evitare di fissare nel genoma le mutazioni accumulate.

L'oncosoppressore p53 L'altro substrato di Chk2 è una proteina molto conosciuta, p53 che agisce da fattore di trascrizione ed è codificata dall'omonimo gene, in assoluto il più studiato al mondo. L'ampio interesse suscitato dal gene p53 è giustificato dalla sua centralità nelle vie di controllo del ciclo cellulare, della morte cellulare e del riparo del DNA. A dimostrazione di ciò, p53 si comporta da oncosoppressore e sue mutazioni o mutazioni negli elementi che controllano la funzionalità sono, in larga parte, rilevabili nei tumori umani. L'oncosoppressore p53 è anche implicato in forme tumorali ereditarie. Infatti mutazioni inattivanti p53 nella linea germinale sono responsabili della rara sindrome di Li-Fraumeni caratterizzata da un'elevata frequenza di neoplasie in vari tessuti. P53 agisce su un crocevia molto importante nel controllo della proliferazione e della trasformazione in senso neoplastico. È un crocevia dove le cellule decidono, dopo uno stress genotossico, se arrestare il ciclo cellulare e attivare la risposta del riparo al fine di eliminare le mutazioni indotte, o alternativamente, nel caso in cui il numero di mutazioni sia talmente elevato da rischiare un riparo incompleto e quindi di aumentare la possibilità di fissare le mutazioni nel genoma, avviare il processo di morte per apoptosi. La cellula che ha accumulato troppe mutazioni si suicida.

Checkpoint ed inibitori delle chinasi ciclina-dipendenti (CKI cyclin kinase inhibitor) il danno al DNA attiva un checkpoint che attraverso p53 può alla fine indurre anche la morte della stessa cellula, anche se, come si è già detto, questo checkpoint ha il compito di bloccare il ciclo cellulare. In questo scenario funzionale si inserisce ancora Cdk, per cui qualunque segnale compreso p53, per bloccare il ciclo deve interloquire con

questo enzima. Ma p53 è un fattore di trascrizione, quindi esplica la sua azione attraverso la trascrizione di nuovi geni. Tra i geni regolati da p53 ne troviamo uno in particolare, p21, che codifica una proteina che svolge un ruolo fondamentale nel blocco del ciclo cellulare. Infatti p21 interagisce con i complessi Cdk-ciclina, legandosi ad essi ed inibendoli. Praticamente proprio grazie all'inibitore p21, le cellule con DNA danneggiato arrestano il loro ciclo cellulare allo scopo di riparare il DNA. La strategia di utilizzare degli inibitori dei complessi Cdk-ciclina è sfruttata dalla cellula anche in altre occasioni in risposta a specifiche necessità di arresto del ciclo, e come spesso accade nei mammiferi, e ci troviamo di fronte ad una famiglia proteica, appunto gli **inibitori dei complessi Cdk-ciclina o CKI**. Uno di questi fattori è il **TGF- β (transforming growth factor beta)** il quale a seguito dell'interazione con il recettore specifico presente sulla membrana plasmatica, attivando una specifica via di trasduzione del segnale, provoca un notevole aumento dell'espressione di uno dei CKI conosciuto come **p15 o INK4b**. Anche l'aumento della densità della popolazione cellulare provoca un arresto del ciclo cellulare, conosciuto come **inibizione da contatto**; in questo caso l'espressione di un altro CKI denominato **p27** è promossa dal contatto cellulare. A conferma del ruolo di p27 nel regolare la quantità delle cellule si è osservato che topi knock-out per p27 risultano più grandi di circa il 30%. Tale incremento di massa è causato proprio dall'aumentato numero di cellule riscontrato in molti tessuti. L'azione inibitoria dei CKI si esplica con distinti espedienti molecolari, alcuni di questi inibitori.

QUARANTOTTESIMA LEZIONE: ALBERI GENEALOGICI, PENETTRANZA COMPLETA, INCOMPLETA, ESPRESSIVITÀ

Lo studio dei caratteri ereditari umani presenta notevoli ostacoli, in primo luogo perché il metodo di base dell'analisi genetica non può essere, per ovvie ragioni etiche, un'analisi sperimentale basata su incroci controllati come fece Mendel o come è possibile fare in altri organismi.

Inoltre occorre considerare che nell'uomo numerose ragioni rendono complessa la manifestazione dei caratteri e di conseguenza il loro studio: molti caratteri sono multifattoriali, sono cioè dovuti a più geni in più loci e sono anche fortemente condizionati dalle condizioni ambientali (basti pensare a caratteri relativi alla struttura somatica quali altezza peso ect. che sono correlati ad esposizione a fattori ambientali); ancora, un singolo gene può influenzare l'espressione di altri che sembrerebbero non essere ad esso correlati; inoltre non bisogna dimenticare condizioni di penetranza ed espressività genica variabili. In ogni caso il metodo fondamentale per lo studio della trasmissione dei caratteri ereditari in tutti gli organismi uomo compreso prevede la conoscenza e l'analisi dei fenotipi. Nell'uomo lo strumento primordiale di tale analisi consiste nell'osservazione dei caratteri presenti nelle famiglie e nella ricostruzione e studio della loro storia: cioè nella costruzione dell'albero genealogico. L'**albero genealogico** (pedigree) è una semplice e sintetica rappresentazione grafica che illustra come si distribuiscono nelle generazioni di una famiglia, i fenotipi di uno o più caratteri considerati; in esso si riportano in maniera facilmente leggibile i rapporti coniugazionali e filiali di una famiglia in modo da seguire il flusso della trasmissione dei caratteri. Ovviamente lo studio di più famiglie che manifestano uno stesso carattere consentirà di avere dati numericamente significativi, utili per verificare le modalità con cui esso viene trasmesso alla progenie. L'albero genealogico familiare, comunemente, rappresentato da un grafico che si costruisce utilizzando una serie di simboli convenzionali. I maschi e le femmine sono graficamente rappresentati rispettivamente con un quadratino e con un cerchietto vuoti. Nella rappresentazione si indica per primo il maschio. Un individuo che manifesta il carattere, quindi con il fenotipo considerato viene rappresentato con i simboli già citati, ma scuriti. Il genotipo di individui eterozigoti, oggi identificabili con maggiore facilità e precisione, soprattutto

grazie all'ausilio delle tecniche di genetica molecolare, si indica con i simboli anneriti a metà. I rapporti di parentela sono evidenziati mediante linee. Una linea orizzontale che unisce i simboli di due individui indica l'unione tra un maschio ed una femmina (linea coniugazionale); una doppia linea indica l'unione tra consanguinei (fratelli e sorelle, genitori e figli, cugini). I diversi fratelli e sorelle che nell'insieme costituiscono una *fratria* sono collegati tra loro da una linea orizzontale (*linea di fratria*) e ad i genitori tramite una linea verticale (*linea generazionale*). La progenie è indicata da sinistra verso destra in ordine temporale di nascita. Nella costruzione dell'albero genealogico da sinistra verso destra in ordine temporale di nascita. Nella costruzione dell'albero genealogico il sistema di numerazione individua ogni generazione con i numeri romani (I la generazione parentale) a partire dall'alto in basso, mentre ogni individuo all'interno della generazione è identificato con numeri arabi. In ambito medico, l'albero genealogico si costruisce quando un componente della famiglia si sottopone ad una indagine per una sospetta malattia genetica; questo individuo viene definito *proband* e viene indicato nell'albero con una freccia e una lettera P. una volta che l'albero genealogico è stato costruito si analizzano le informazioni per capire come un dato carattere considerato venga trasmesso da un individuo all'altro. Le caratteristiche ereditarie umane, in funzione sia del tipo di cromosomi su cui sono localizzati i geni responsabili, ma anche delle relazioni di dominanza e recessività dei prodotti degli alleli, possono essere generalmente riportate alle seguenti modalità di trasmissione che successivamente saranno illustrate:

1. **Eredità autosomica** (caratteri specificati da alleli che risiedono su uno degli autosomi, che venono trasmessi con la stessa frequenza nei due sessi:
 - **Autosomica dominante** a completa o parziale penetranza
 - **Autosomica recessiva**
2. **Eredità associata al sesso** caratteri, specificati da alleli che risiedono su tratti differenziali degli eterocromosomi, che vengono trasmessi con diversa frequenza nei due sessi
 - **Legata al cromosoma X e recessiva**
 - **Legata al cromosoma X e dominante**
 - **Legata al cromosoma Y**
3. **Eredità mitocondriale** caratteri specificati da alleli presenti nel DNA mitocondriale e per questo di origine materna; per questo l'eredità è anche detta matrilineare.

Nell'ambito degli studi medici risulta fondamentale stabilire come si trasmette un carattere perché ciò può consentire di predire il rischio di insorgenza di una malattia genetica in vari momenti, per esempio durante l'embrionogenesi, nel corso della vita adulta; ma è soprattutto importante in quanto sarà possibile valutare la probabilità che un fenotipo patologico si manifesti nella prole. Infatti in questi casi, risulta utile e deontologicamente corretto dare opportuna consulenza genetica alle coppie che abbiano deciso di concepire un figlio. In proposito è opportuno conoscere le malattie nell'uomo oggi note, ereditarie e mendeliane, sono state catalogate e inserite in una banca dati disponibile anche on line al sito web OMIM online Mendelian Inheritance in Man.

Eredità autosomica

Con questa espressione si intende la modalità di trasmissione dei caratteri determinati da geni che sono localizzati su gli autosomi. Da ciò deriva che i loci genetici autosomici sono ugualmente presenti in entrambi i sessi e da questi indifferentemente potranno essere trasmessi.

Caratteri autosomici dominanti Un carattere autosomico dominante, specificato da una coppia di alleli presenti in un singolo locus, segregherà secondo le leggi mendeliane. Esso si manifesta fenotipicamente

anche quando sarà presente una sola copia dell'allele mutato. Alcuni criteri possono essere considerati ed utilizzati al fine di riconoscere facilmente la modalità di trasmissione:

1. Maschi e femmine, padri e madri, trasmettono il carattere con la stessa frequenza, questo sarà espresso con la stessa frequenza, nei figli maschi e femmine.
2. Ogni individuo con il fenotipo considerato ha almeno un genitore con la stessa manifestazione
3. In una famiglia il carattere passa attraverso la generazione senza salti e mostra quella che talvolta viene indicata come trasmissione verticale
4. Ciascun individuo con il fenotipo considerato lo trasmetterà alla metà della progenie dei figli (avrà il 50% di possibilità di generare figli con lo stesso fenotipo)
5. Nel caso di unione tra i due individui eterozigoti il 25% della progenie potrà non manifestare il fenotipo considerato
6. Nel caso di caratteri patologici, il fenotipo degli individui omozigoti dominanti è spesso clinicamente più grave di quello degli eterozigoti.

Ovviamente tanti sono gli esempi di caratteri con tale andamento ereditario; solo per citarne alcuni comuni normali e patologici: capelli lanosi; fossetta del mento; epicanto; corea di Huntington; la brachidattilia. Conosciamo attualmente circa 500 malattie genetiche a trasmissione autosomica dominante: gli individui che presentano l'allele mutato, sia con genotipo eterozigote che omozigote, esprimono il fenotipo patologico, gli individui normali, che hanno entrambi gli alleli wild-type, sono omozigoti recessivi. Nella maggior parte dei casi però gli individui che manifestano una malattia autosomica dominante sono degli eterozigoti (soggetti portatori di un gene mutato), mentre gli omozigoti dominanti sono rari anche perché questa condizione è spesso letale.

AMBIENTE E GENI

L'ambiente e l'espressione dei geni: penetranza ed espressività

L'attività dei diversi geni si esplica nell'ambiente cellulare che a sua volta può essere influenzato dall'ambiente extracellulare. Così l'attivazione e l'espressione di un gene, cioè il risultante fenotipo, possono dipendere non soltanto da un genotipo definito, ma anche da un ambiente definito. Il grado di influenza di un ambiente su un genotipo può essere inconsistente o non rilevabile, oppure essere tanto rilevante da risultare condizionante. Fattori quali la temperatura, la luce, l'alimentazione possono modificare l'espressione di un gene. Il genotipo definisce la potenzialità ma il fenotipo che si manifesta è determinato dalla interazione del genotipo con l'ambiente. Il colore del pelo nei gatti siamesi e nei conigli himalayani è più scuro a livello di naso, coda e orecchie. Queste estremità sono in genere caratterizzate da una temperatura più bassa rispetto alle altre parti del corpo. Rimuovendo una parte del pelo in corrispondenza della coda di un gatto siamese, ad esempio, ed allevandolo ad una temperatura superiore a quella normale, il pelo ricresce con un colore più chiaro. La spiegazione di ciò sta nelle proprietà dell'enzima che determina la produzione del pigmento. L'ambiente, quindi costituisce un fattore critico nel determinare due condizioni dell'ereditarietà: la penetranza e l'espressività dei geni.

I fattori che possono influenzare l'attività di un gene non sono conosciuti e questo potrebbe spiegare il verificarsi di condizioni di trasmissioni ereditarie le cui modalità non appaiono canoniche o standard e che comunque non appaiono coerenti con le aspettative dell'analisi genetica: è questo il caso della penetranza e della espressività genetica. La **penetranza** può essere definita come la percentuale in una popolazione di individui con un dato genotipo che mostrano il fenotipo ad esso ascritto; quando tutti gli organismi che

posseggono un dato genotipo manifestano il fenotipo normalmente previsto per esso allora si ha la condizione che viene denominata penetranza completa; se una parte degli individui che possiede quel dato genotipo non ne manifesta il corrispondente fenotipo, o per l'intervento di un altro gene o per effetto dell'ambiente, allora la penetranza verrà definita incompleta. Per esempio se 100 persone posseggono il gene per la polidattilia e solo 90 presentano dita soprannumerarie, allora diremo che il gene ha penetranza incompleta (90%). La penetranza incompleta non deve essere vista come una contraddizione completa alle leggi dell'ereditarietà, ma piuttosto come una conseguenza attesa dall'azione che il genotipo nel suo complesso esercita sull'espressione di ogni singolo allele. Variazioni nell'espressione di un allele dipendono spesso dall'azione di altri geni. Di fatto alcuni geni raggiungono un livello costante di espressione, altri invece possono andare incontro a variazioni nella loro espressione. Questa condizione di modulazione della manifestazione genica viene indicata come **espressività** che indica il grado di manifestazione fenotipica per un certo genotipo. La variazione dell'intensità di espressione di un genotipo, detta **espressività variabile**, può dipendere ancora una volta da altri fattori di natura genica o ambientale, in grado di alterare o sopprimere completamente l'effetto di un particolare gene. Se un allele si manifesta sempre nel 100% degli individui che lo posseggono, sempre in maniera costante sarà a penetranza completa ed avrà espressività del 100%. Se invece si manifesta solo in alcuni degli individui che lo posseggono, ad esempio nell'85% e con espressione costante, sarà a penetranza incompleta ed espressività al 100%. Altri alleli potranno invece avere penetranza completa ed espressività variabile. Nell'uomo diversi caratteri offrono esempi significativi di queste situazioni.

CINQUANTESIMA LEZIONE: EMOGLOBINOPATIE

Con questo termine si identifica una classe eterogenea di patologie ereditarie che insorgono per effetto di alterazioni strutturali e funzionali dell'emoglobina; esse rappresentano le più comuni patologie a livello mondiale con trasmissione mendeliana. Si tratta di malattie che hanno un impatto notevole sulla morbilità e mortalità umana. Sono state descritte più di 700 forme anomale di emoglobina, anche se non tutte sono causa di patologie; la maggior parte di esse sono il risultato di mutazioni puntiformi, a carico dei geni per le diverse globine, che portano alla sostituzione di singoli amminoacidi. Alcune di queste, comportano instabilità dei tetrameri, formazione di catene con struttura terziaria alterata, mancata riduzione dello ione ferro, mancato legame dell'eme; altre sostituzioni sono invece chimicamente silenti. Sono state identificate delle mutazioni frameshift, non senso, per crossing over ineguale, che possono interessare sia le sequenze codificanti, sia quelle regolatrici a monte o a valle del gene. In questi casi le emoglobinopatie sono dette di tipo qualitativo perché dovute a difetti nella qualità delle catene globiniche; altre sono invece dette quantitative perché sono associate alla mancata o ridotta sintesi di una o più tipi di catene globiniche che, comunque, non presentano alterazioni della sequenza amminoacidica.

Anemia falciforme

Questa patologia, descritta per la prima volta nel 1910, è una delle più comuni malattie ereditarie nel mondo con un'incidenza di 1/500 nati nella popolazione afroamericana. La base molecolare della malattia, cioè la presenza di una emoglobina anomala, essa rimane ancora una delle maggiori cause di decesso tra la popolazione di colore del mondo perché ovviamente non è curabile ed il trattamento medico è solo di supporto. L'anemia falciforme prende il nome dalla presenza nel circolo sanguigno di eritrociti a forma di falce, una conformazione che assumono i globuli rossi, soprattutto nella periferia del circolo sanguigno e nei tessuti dove c'è bassa pressione parziale d'ossigeno, dovuta alla presenza di una emoglobina anomala

detta emoglobina S, che ha una solubilità inferiore ad HbA. I tetrameri di HbS ($\alpha_2\beta_2^S$) risultano instabili nella forma di deossigenata e, quando la saturazione dell'ossigeno scende al di sotto dell'85%, polimerizzano, formando delle strutture paracrystalline, bastoncini formi, tattoidi, che insolubili, precipitano all'interno del globulo rosso; pertanto quest'ultimo si distorce assumendo il tipico aspetto a mezza luna, o a falce. I globuli rossi deformati sono molto fragili e hanno un tempo di sopravvivenza ridotto, la falcizzazione inoltre, comporta una certa rigidità, che rende le cellule incapaci di percorrere i vasi della sottile rete di capillari sanguigni. Ne deriva un rallentamento della circolazione e ostruzione del microcircolo con conseguenti gravi danni nei vari sistemi. L'anemia falciforme non curata è letale; alcuni individui affetti muoiono nell'infanzia o nell'adolescenza, sebbene i trattamenti medici attuali (per esempio le trasfusioni ricorrenti di sangue) permettano la sopravvivenza fino all'età adulta. Inoltre questi individui sono particolarmente sensibili ad infezioni (soprattutto da streptococcus pneumoniae) per cui per ridurre la mortalità vengono immunizzati contro questi agenti batterici e trattati con antibiotici per prevenire le infezioni; un'alternativa nelle contrasto alle crisi emolitiche può essere il trapianto di midollo osseo. Tutto ciò è causato da una mutazione missenso, la sostituzione di una timina T con un'adenina A (CTC → CAC) nel sesto codone del primo esone del gene che codifica le globine β ; ne consegue la sostituzione dell'amminoacido acido glutammico con la valina. I due amminoacidi hanno caratteristiche molto diverse: la valina è un amminoacido idrofobico, apolare, mentre l'acido glutammico è idrofilo, dotato di carica e polare; pertanto la sostituzione induce la formazione di siti appiccicosi che portano tetrameri ad aggregarsi, precipitare e determinare la falcizzazione dell'eritrocita. A prescindere dai sintomi della malattia, la diagnosi certa può derivare dall'analisi elettroforetica dell'emoglobina che evidenzierà la presenza di HbS. L'analisi prenatale dell'anemia falciforme si effettua in genere quando entrambi i genitori sono portatori e mira a rilevare la mutazione utilizzando la tecnica degli RFLP. In breve, all'interno della regione, riconosciuta dall'enzima di restrizione MstII, è presente anche il codone 6 che, se mutato (T-A) fa perdere il sito di riconoscimento e tagli per questo enzima. Ne consegue che gli individui affetti mostreranno un pattern dei frammenti di restrizione diverso da quello degli eterozigoti e degli omozigoti dominanti. Un altro esempio di sostituzione a livello dell'esone 6 nel gene della globina β è quello che porta la tripletta CTC per transizione a TTC, per l'acido glutammico viene sostituita la lisina. Si determina in tal caso la malattia da emoglobina C, una anemia emolitica lieve, in quanto in tal caso l'emoglobina tende a precipitare in cristalli all'interno delle emazie solo quando raggiunge alte concentrazioni.

Talassemie

Questo termine si riferisce ad un gruppo di emoglobinopatie dovute ad un difetto di sintesi di globine α e β . La sintesi di una delle due globine può essere ridotta o addirittura assente, causando la conformazione di molecole di emoglobina alterate per uno squilibrio tra le subunità; queste emoglobine anomale non legano l'ossigeno in modo efficiente mostrando instabilità o modeste condizioni di affinità per l'ossigeno, con la conseguenza che gli individui affetti mostrano gravi danni, spesso letali. Le talassemie sono comuni in tutto il mondo, ma sono principalmente diffuse nel mediterraneo e nel sud-est asiatico. Il termine talassemia (dal greco talassa, mare) sottolinea proprio come questa malattia sia caratteristica di individui che popolano il bacino del mediterraneo. Si conoscono due principali tipi di talassemie: la talassemia α e quella β in cui sono quantitativamente ridotte o assenti, le due globine rispettive; in entrambi i casi, ereditabili come caratteri autosomici recessivi, si identificano differenti cause e frequentemente, negli individui eterozigoti, le mutazioni provocano lievi effetti fenotipici, a volte irriconoscibili. Nella talassemia α la mancanza delle catene globiniche α è da ricondurre ad un evento mutazionale che porta alla perdita o delezione di uno o entrambi i geni della globina α ; queste delezioni sono spesso provocate da meccanismi di crossing over ineguale. Considerato che normalmente un individuo ha 4 geni α funzionali (fenotipo $\alpha\alpha/\alpha\alpha$), si

identificano come α -talassemici con cinque diversi genotipi; questi individui hanno mutazioni che danno una sintomatologia che varia dal lieve al grave, fino ad essere letale. In generale si evidenziano:

- a) Solo un allele deletato, 3 alleli funzionanti (genotipo $\alpha\alpha/\alpha\alpha^-$). La malattia è definita talassemia $\alpha 2$, è asintomatica e gli individui affetti non manifestano alterazioni del quadro ematologico, sono pertanto portatori silenti
- b) 2 dei 4 alleli sono deletati (genotipo $\alpha\alpha/\alpha^-\alpha^-$ o $\alpha\alpha^-/\alpha\alpha^-$). Si ha la talassemia $\alpha 1$ o $\alpha 2$, dette anche tratto α^0 ; il fenotipo risulta talassemico ma di scarsa rilevanza sintomatologica e clinica, poiché sia l'emolisi che l'anemia non sono significative
- c) 3 dei 4 alleli sono deletati ed uno solo è funzionale. Il quadro patologico è più grave perché la quantità di globina α prodotta è molto limitata, mentre la globina β , sintetizzata in quantità normali, ma in eccesso rispetto la forma α , forma dei tetrameri nei globuli rossi; si sviluppa la cosiddetta talassemia da HbH in cui l'anemia è presente fin dalla nascita permettendo per tutto il corso della vita associata ad emolisi e splenomegalia.
- d) Tutti e 4 gli alleli sono deletati. Rappresenta la forma più grave di talassemia α ed è incompatibile con la vita, la morte avviene nella fase intrauterina o neonatale in seguito ad arresto cardiaco ed edema generalizzato (idropo fetale); in questo caso nei pazienti si formano tetrameri di globina γ , una emoglobina detta di Barts. Essendo tale patologia autosomica recessiva, la possibilità di generare un figlio che svilupperà idropo fetale deriva solo dall'unione di due soggetti del caso b. in questo caso la possibilità di avere figli con idropo fetale è di $\frac{1}{4}$.

Talassemie β

Come già detto, sono dovute a un deficit della produzione delle globine β a causa di mutazioni nel gene β presente in unica copia (a differenza della duplice copia del gene alfa) sul cromosoma 11 e sono trasmesse secondo la modalità autosomica recessiva. La forma più grave di questa patologia è definita talassemia β major, o morbo di Cooley da colui che per la prima volta, nel 1910 descrisse un gruppo di bambini affetti; essa è dovuta a mutazioni in entrambi gli alleli per la globina β , mutazioni che impediscono la trascrizione e la traduzione del polipeptide per cui nell'adulto non vi è presenza di emoglobina HbA. I soggetti eterozigoti sono fenotipicamente normali anche se i loro globuli rossi sono un po' più piccoli della norma, molti con peculiare morfologia. Ed è per questo che sono definiti *microcitemici* e considerati affetti da talassemia β minor. Se la mutazione a carico del gene per la globina β permette la sintesi di una certa quantità, anche se modesta, di globina, tale condizione viene fenotipicamente denominata talassemia β^+ . In entrambe le forme di talassemia β^0 e β^+ , gli individui affetti soffrono di una severa anemia a causa sia della ridotta eritropoiesi, sia della prematura distruzione (operata dalla milza) di nuove cellule immature che entrano in circolo. I pazienti quindi necessitano di trasfusioni di sangue ricorrenti accumulando nel tempo, a partire dai primi mesi di vita, problemi clinici di entità sempre più grave. Gli individui affetti da talassemia major, che non hanno HbA, presentano invece HbA₂ e HbF come può essere facilmente rilevato tramite elettroforesi; tuttavia questa emoglobina non consente di evitare la grave forma anemica, fra l'altro, nonostante l'elevata presenza di emoglobina fetale, a causa delle differenti proprietà di questa molecola, il trasporto di ossigeno è fortemente compromesso.

Le principali cause della talassemia β major sono mutazioni puntiformi o piccole delezioni nell'allele della globina β ; finora ne sono state individuate oltre 100 con la conseguenza che la stragrande maggioranza di individui affetti presenta distinte mutazioni nei due diversi alleli per la globina β , perché è particolarmente frequente che ciascuno dei genitori abbia trasmesso loro un allele diversamente mutato. Tra le più diffuse mutazioni mappate vi sono quelle nella regione del promotore del gene che consentono l'espressione ma di

solo il 10% del prodotto; altre mutazioni nonsense e frameshift sono invece responsabili di un arresto prematuro della traduzione che produce globine β tronche e totalmente prive di funzione. In tutto il bacino del mediterraneo si può osservare una frequente forma di talassemia del tipo β^0 . Questa è denominata β^{39} perché dovuta ad una particolare transizione, la sostituzione della base citosina del primo nucleotide del codone 39 con la timina. Questa sostituzione determina una mutazione nonsense in quanto la tripletta CAG, che codifica glutammina, viene sostituita da TAG che consentirà la sintesi, nell'mRNA di una tripletta stop. Nell'area del mediterraneo ricorre inoltre una forma di talassemia β major, del tipo β^+ , dovuta alla mutazione puntiforme più comune per questa patologia; si tratta ancora di una sostituzione, la transizione della base G con una A in posizione 110 dell'introne 1. Sono veramente numerose le mutazioni che nelle varie popolazioni del mondo caratterizzano le β -talassemie. Tra le mutazioni si segnalano alcune di esse molto rare che producono forme talassemiche molto poco diffuse ed anzi ristrette a particolari areali ed etnie: ci si riferisce a delezioni dei geni β che portano alla persistenza della espressione di uno o due dei geni γ . Tali delezioni dovute a crossing-over ineguali possono produrre la fusione dei geni β e δ (Hb Lepore) ovvero γ^A e β (Hb Kenya) con conseguente compensazione parziale o totale di HbF. Ma alcune delezioni del gene determinano altre forme rare quali una β^0 -talassemia, in cui non si ha alcuna compensazione di HbF, ma anche una detta HPFH in cui si ha la persistenza totale di emoglobina fetale. La diagnosi di talassemia β viene eseguita ancora oggi negli individui affetti o nei portatori attraverso le indagini ematologia classica; tuttavia, l'analisi del DNA rappresenta un metodo fondamentale per diagnosticare la malattia a livello prenatale: in questo caso si ricorre all'amniocentesi o alla biopsia dei villi coriali. In questi casi è utile conoscere l'origine etnica degli individui oggetto dell'analisi molecolare. Nel caso di specifiche mutazioni puntiformi, presenti sia nella regione del promotore che dei due esoni, che all'interno dell'introne del gene β , esse possono essere investigate con PCR amplificando le regioni di interazione del gene che successivamente vengono analizzate con tecniche diverse. Nel caso di delezioni, inserzioni, duplicazioni l'indagine molecolare viene eseguita effettuando un'adeguata ibridazione su filtro, secondo Southern blotting.

Vantaggio dell'eterozigote

La frequenza e la diffusione di malattie genetiche come le emoglobinopatie ma anche alcuni errori del metabolismo in regioni ad alta incidenza di malaria può essere giustificata dalla osservazione che il rischio di sviluppare malaria è risultato particolarmente basso negli eterozigoti per l'allele mutato. Infatti l'agente infettivo della malaria, il protozoo *Plasmodium falciparum*, è capace di moltiplicarsi bene solo negli eritrociti con HbA per cui, nei fatti, favorisce la selezione positiva degli eterozigoti (**vantaggio dell'eterozigote**). La correlazione tra diffusione delle citate patologie ereditarie e la malaria rappresenta un modello di *polimorfismo bilanciato*, una condizione in cui le frequenze genotipiche si equilibrano per la contestuale presenza del vantaggio degli eterozigoti rispetto agli omozigoti per gli alleli indenni e di uno svantaggio degli omozigoti recessivi che vanno incontro a morte per anemia.

CINQUANTADUESIMA LEZIONE: FENILCHETONURIA (PKU) ALBINISMO, POLIALLELIA, FENOTIPO BOMBAY

Fenilchetonuria (PKU)

È la più comune malattia pediatrica congenita, diffusa soprattutto nelle popolazioni dell'Europa occidentale o da essa originate, dovuta ad una carenza enzimatica e caratterizzata da aumentati livelli sierici dell'amminoacido fenilalanina e da ritardo mentale. Essa è dovuta alla mutazione di un gene localizzato sul

cromosoma 12 (12q24.1) ma esistono altre concause che portano aumentati livelli sierici di fenilalanina e che, globalmente, vengono indicate come *iperfenilalaninemie*. La frequenza della fenilchetonuria nella popolazione caucasica è di 1/10-12.000 nati vivi. La fenilchetonuria è determinata da una mutazione che codifica per la fenilalanina idrossilasi (PAH), un enzima che converte l'amminoacido fenilalanina in tirosina; l'assenza di questo enzima rende impossibile tale reazione. La fenilalanina è un amminoacido essenziale per l'uomo e deve essere introdotto nella dieta per consentire la sintesi di specifiche proteine. I bambini affetti da fenilchetonuria, in assenza di fenilalanina idrossilasi, accumulano fenilalanina che viene convertita in acido fenilpiruvico, un prodotto tossico che causa seri danni al sistema nervoso centrale provocando ritardo mentale e nell'accrescimento, morte precoce. Spesso i pazienti affetti da PKU risultano essere eterozigoti composti piuttosto che omozigoti recessivi per un particolare mutante. Questa malattia genetica mostra infatti effetti pleiotropici, infatti un individuo affetto da PKU risulta incapace di sintetizzare la tirosina, ma ciò che induce la carenza di produzione di proteine fondamentali come gli ormoni tiroxina e adrenalina, così come di melanina; in proposito sono frequenti i malati di fenilchetonuria che hanno carnagioni e occhi chiari per deficit di melanina, e possiedono livelli particolarmente bassi di adrenalina. Durante il periodo di gestazione, ed anche nei primi momenti dopo la nascita, gli individui omozigoti, affetti da PKU, non accumulano fenilalanina poiché questa viene metabolizzata dagli enzimi ricevuti dalla madre e prodotti in sufficienti quantità. Successivamente però l'accumulo di prodotti tossici causa i citati danni al sistema nervoso centrale; ne consegue che riuscire a diagnosticare la malattia prima della nascita o nei bambini appena nati risulta essenziale per consentire di alimentarli subito con una dieta speciale povera di fenilalanina, che possa diminuire i possibili danni. Per la diagnosi della PKU si applica il test di Guthrie: che consiste nel porre una goccia di sangue del neonato su un disco di carta che viene posto a contatto con una coltura del batterio *Bacillus subtilis* a cui è stata aggiunta β -2 fenilalanina, che inibisce la crescita batterica. In presenza di fenilalanina l'inibizione viene contrastata e i batteri sopravvivono; la continuazione della crescita batterica è segnale di alti livelli di fenilalanina per cui è necessario sottoporre il neonato ad ulteriori analisi. Quando la PKU viene diagnosticata in tempo, un neonato geneticamente affetto può crescere con un normale sviluppo del sistema nervoso purché segua, per il resto della sua vita, una dieta povera di fenilalanina. Le pazienti affette da PKU in gravidanza se manifestano alti livelli ematici di fenilalanina possono indurre effetti teratogeni sulla prole.

Albinismo

È una malattia del metabolismo caratterizzata dall'assenza o moderata presenza, del pigmento melanina nella pelle, negli occhi (iride e corioide) e nei peli. Questa condizione che tecnicamente è chiamata ipomelanismo o ipomelanosì, causa nei soggetti affetti, danni alla cute se si espongono alla luce solare (eliofobia), suscettibilità ai carcinomi della pelle e frequenti problemi visivi (fotofobia). Come si è già fatto cenno le modalità di trasmissione ereditaria di questa patologia sono prevalenti a carattere recessivo, pertanto si manifesta in individui (omozigoti) nati da due genitori entrambi figli di albinici o eterozigoti. Diversi geni sono stati associati all'albinismo, ma nella maggior parte dei casi noti la mutazione è relativa ad un gene che codifica per una tirosinasi, un enzima utilizzato nella conversione da tirosina a DOPA, da cui inizia la sintesi della melanina nella catena metabolica della fenilalanina. In ogni caso, tutte le mutazioni coinvolte causano un'alterata produzione di melanina, un pigmento scuro che assorbe la luce dello spettro ultravioletto, proteggendo la pelle dalle radiazioni ultraviolette. Fisiologicamente la produzione di melanina aumenta in seguito all'esposizione al sole proprio per consentire una adeguata protezione delle cellule dell'epidermide; per questo motivo la melanina è considerata un pigmento foto protettivo. Molti dei soggetti con albinismo non sono capaci di sintetizzare neanche dopo l'esposizione al sole, pertanto la loro pelle risulta ipersensibile alla luce solare sviluppando scottature ed altri danni tissutali; anche se priva di

melanina, la pelle degli albinici continua a svolgere funzioni normali. La melanina è presente in altre aree del corpo come gli occhi ed il cervello, ma non è completamente chiaro il ruolo di questo pigmento in queste aree. Le forme della malattia vanno dall'albinismo totale a quello parziale, nel quale la mancanza di pigmentazione è limitata a regioni somatiche come un ciuffo di capelli, una zona cutanea, un solo occhio. Le diverse forme di albinismo sono catalogate come tirosinasi-positivo o tirosinasi negativo; nel primo caso i melanociti sintetizzano l'enzima tirosinasi ma non fino ad un livello utile, nel secondo non si produce la tirosinasi, oppure si produce ma non è funzionale a causa di una mutazione. Tuttavia questa classificazione oggi non appare più adeguata ed è praticamente obsoleta; infatti si preferisce classificare l'albinismo umano in due principali categorie:

- Albinismo oculocutaneo (OCA), nelle due forme tirosinasi negativo e positivo entrambe autosomiche recessive. Nel primo caso la sintomatologia è più grave ed i soggetti mancano totalmente del pigmento melaninico nella cute, occhi, pelle e capelli; la seconda forma è meno grave, perché nei melanociti si osserva una modesta sintesi di melanina.
- Albinismo oculare (OA), che si presenta con forme a trasmissione X-Linked recessiva ed altre autosomica recessiva. In tutti questi casi i soggetti avranno soltanto gli occhi privi di melanina.

Se consideriamo la frequenza di insorgenza delle diverse forme nella popolazione è noto un tipo principale di albinismo oculare e diverse varietà di albinismo oculocutaneo, talvolta con ulteriori sottotipi. Anche l'albinismo è un chiaro esempio della condizione di eterogeneità genetica: infatti non vi sono più loci mutati che determinano lo stesso fenotipo. I diversi geni che sono stati associati all'albinismo, per quanto già detto, codificano vari enzimi della catena metabolica della fenilalanina ed in particolare delle vie metaboliche della tirosinasi. Dall'analisi di alcune mutazioni di soggetti con albinismo oculocutaneo si sono identificati almeno quattro geni che sono coinvolti nella formazione della melanina; tali mutazioni o non consentono la sintesi dell'enzima tirosinasi oppure se ne produce una forma con attività enzimatica molto modesta. L'albinismo risulta ancora utile per illustrare proprio a causa dei diversi geni coinvolti, l'effetto della complementazione genica. Risulta infatti che in alcune famiglie, i figli di genitori albinici mostrano pigmentazione normale. Si tratta di soggetti i cui genitori sono entrambi omozigoti, ma per mutazioni che interessano geni diversi che in ogni caso impediscono la formazione della melanina.

Allelia multipla, gruppi sanguigni, fenotipo bombay

In una popolazione possono essere presenti più di due forme alleliche per uno stesso gene (*poliallelia* o *allelomorfismo multiplo*) e spesso tra di essi non ve ne è uno solo che specifica per il fenotipo dominante; infatti ciascun allele può esprimersi pienamente ed in questo caso il fenotipo corrispondente si dice codominante. Esempi di queste condizioni genomiche sono i gruppi sanguigni nell'uomo, sistemi caratterizzati dalla presenza o meno di antigeni di membrana sulla superficie degli eritrociti. La presenza di un particolare antigene sulla superficie di un globulo rosso definisce il corrispondente gruppo sanguigno. L'assegnazione ad un gruppo sanguigno viene eseguita mediante un test di agglutinazione, che consiste nel mescolare i globuli rossi dell'individuo in esame con un antisiero di specificità nota, successiva incubazione ed in fine osservazione dei globuli rossi, se sono stati agglutinati. La conoscenza quindi del gruppo sanguigno di appartenenza risulta cruciale per la sicurezza delle trasfusioni; infatti ogni trasfusione è incompatibile se le cellule del donatore sono agglutinate dal siero del ricevente: in questo caso l'agglutinazione comporterebbe l'ostruzione dei vasi sanguigni di piccolo calibro, determinando gravi danni o la morte del ricevente.

Sistema ABO

Gli antigeni A e B sono catene oligosaccaridi che protrudono dalla membrana cellulare dei globuli rossi, ancorate ad un lipide di membrana o a una proteina. Questi due antigeni sono quasi identici differendo solo per uno zucchero terminale; è proprio questa lieve differenza che determina le diverse proprietà antigeniche delle due molecole. Da quale anno è noto che molecole con struttura identica a quella degli antigeni di tipo A e B si ritrovano sulla parete cellulare di *Escherichia coli*, per cui, considerando che questi batteri e quindi a questi antigeni, ne consegue che tutti gli individui che non li possiedono sono portati a riconoscerli come non self, e di conseguenza a produrre anticorpi corrispondenti; la predizione di questi anticorpi è comunque indotta da fenomeni di immunizzazione che si verificano fin dalla nascita.

Il locus che contiene il gene codificante l'enzima glicosiltrasferasi è usualmente indicato con I e presenta tre alleli comuni I^A , I^B , I^O o i:

- I^A codifica per una glicosiltrasferasi A che aggiunge N-acetilgalattosammina sulla catena oligosaccaridica H
- I^B codifica per una glicosiltrasferasi B che aggiunge D-galattosio alla sostanza H
- I^O è una forma allelica che ha subito una mutazione del tipo frameshift nella regione codificante e porta all'assenza di attività transferasica dell'enzima; praticamente, se il sesto zucchero non viene aggiunto, si avrà la sostanza H inalterata e l'individuo si dice di gruppo O visto che non ci sono né l'antigene A né il B.

Dato che ogni individuo può trovarsi in situazioni omozigosi o eterozigosi nel totale sono disponibili sei genotipi, ma per la relazione di dominanza e recessività già indicate sono disponibili quattro differenti fenotipi. Infatti gli alleli I^A e I^B sono dominanti su i, ma i loro alleli, quando presenti contemporaneamente, sono espressi entrambi nel fenotipo AB; gli individui con genotipo ii presentano un gruppo sanguigno O.

Fenotipo Bombay

Rari casi di individui che pur possedendo alleli A o B non esprimono gli antigeni corrispondenti: per esempio, un individuo geneticamente $I^A I^B$ potrebbe apparire, al test immunologico, di gruppo sanguigno O. Questo particolare fenotipo è detto "fenotipo Bombay" dal nome della città in cui fu descritto per la prima volta. Questo può accadere perché la sostanza H, che costituisce il substrato per l'aggiunta terminale, non viene sintetizzata. Ciò significa che manca l'enzima fucosiltrasferasi, responsabile dell'aggiunta di un residuo di fucosio all'oligosaccaride. Mancando il fucosio, la sostanza H è incompleta e di conseguenza non potranno essere aggiunti gli zuccheri che determinano gli antigeni A e B.

CINQUANTATREESIMA LEZIONE: GEL ELETTROFORESI, SOUTHERN BLOTT, RFLP, VNTR, POLIMORFISMI DEL DNA, SNP, STR, PLASMIDI, DNA RICOMBINANTE, PCR

Individuazione di specifiche sequenze di DNA e di RNA

Definire all'interno di una molecola di DNA la posizione, relativa rispetto a specifici siti di restrizione, di particolari sequenze di DNA, come ad esempio le sequenze regolative e le sequenze codificanti di un gene, in assenza di un sistema che permetta di separare i singoli frammenti in funzione del peso molecolare non è

praticamente possibile. Il metodo per frazionare i frammenti di DNA in funzione della loro dimensione è detto **gel elettroforesi**, e quello per identificare una specifica sequenza nucleotidica all'interno di miscele complesse di DNA è detto **ibridazione molecolare**.

Gel elettroforesi le molecole cariche negativamente come gli acidi nucleici, carichi negativamente a causa dei gruppi fosfato che costituiscono lo scheletro dello stesso DNA, se poste in un campo elettrico, migreranno verso il polo di carica opposta. Considerando due molecole di DNA, di diversa dimensione, in assenza di una matrice o supporto in cui migrare, esse nel campo elettrico si muoveranno con la stessa velocità, in quanto, pur possedendo un numero di cariche diverso, la quantità di cariche per unità di lunghezza sarà la stessa. Di conseguenza per permettere la separazione di molecole di diversa lunghezza, è necessario che la migrazione avvenga in una matrice che funzioni da setaccio per rallentare le molecole più grandi permettendo a quelle più piccole un movimento relativo più veloce. Tali matrici sono normalmente costituite da **gel di agarosio, o poliacrilammide**. Le dimensioni dei pori di tali gel e quindi le loro capacità di separazione variano al variare della concentrazione della matrice. La gel elettroforesi in agarosio è anche applicabile al frazionamento dell'RNA. Una differenza fondamentale riguarda la struttura dell'RNA che, essendo a singola elica, può formare complesse strutture tridimensionali per appaiamenti intraelica tra le basi complementari. Per questo motivo il frazionamento dell'RNA mediante elettroforesi in gel di agarosio si effettua in condizioni denaturanti. In pratica l'agarosio disciolto è colato in uno stampo che contiene un pettine. Dopo che il gel si è formato il pettine è rimosso per creare dei pozzetti nei quali saranno caricati i campioni di DNA. Si applica quindi una corrente elettrica per spostare il DNA carico negativamente verso l'elettrodo positivo. Le piccole molecole di DNA generalmente migrano attraverso il gel con una velocità superiore rispetto a quelle più grosse. **La gel elettroforesi in poliacrilammide (PAGE)** è stata introdotta negli anni sessanta con la finalità di separare le proteine. La sua applicazione per la separazione delle molecole di DNA è dovuta alla possibilità di formare matrici con pori altamente discriminanti in grado di separare efficacemente molecole di DNA che differiscono per un solo nucleotide. Per questo motivo tale tipo di elettroforesi ha trovato largo impiego nella tecnica del sequenziamento del DNA.

Supponiamo di essere interessati ad identificare all'interno della miscela di frammenti un particolare frammento che contiene la regione codificante di un gene.

Ibridazione molecolare quando si osserva un gel di agarosio in cui è stata frazionata una miscela complessa di frammenti di DNA dopo colorazione con etodio di bromuro ed eccitazione con la luce UV, si visualizza una serie di bande fluorescenti la cui unica differenza è rappresentata dalla diversa migrazione che è funzione della loro dimensione. Questo risultato però non ci dice nulla rispetto ad altre caratteristiche fisiche delle molecole di DNA che sostituiscono le varie bande come ad esempio la loro sequenza nucleotidica. Negli anni settanta è stato messo a punto un sistema per distinguere nel gel bande di DNA caratterizzate da specifiche sequenze nucleotidiche. Questo sistema si basa su due passaggi fondamentali: 1) il trasferimento (blotting) del DNA in stato denaturato dal gel ad un supporto più resistente e maneggevole (membrana di nitrocellulosa o nylon) e 2) il rilevamento di una particolare sequenza mediante ibridazione molecolare. Quindi il blotting permette di ottenere una replica esatta del frazionamento del DNA su un supporto solido dove è più semplice effettuare la reazione di ibridazione. Per il DNA, il sistema attualmente in uso prende il nome di Southern blot. Variazioni sul tema del **southern blot sono rappresentate dal northern blot per l'RNA, western blot per le proteine ed altri tipi di trasferimenti che includono colonie batteriche (colony blot) e le placche fagiche (plaque blot)** per evidenziare una specifica sequenza di DNA all'interno di una miscela eterogenea di frammenti frazionati in gel elettroforesi e quindi trasferiti mediante blotting su un filtro di nitrocellulosa o nylon si utilizzano sonde molecolari

marcate e l'ibridazione molecolare. La doppia elica di DNA è stabilizzata dalla formazione di legami idrogeno tra le basi complementari dei due singoli filamenti polinucleotidici. La rottura dei legami idrogeno con agenti fisici (calore) o chimici provoca la denaturazione della molecola. La temperatura richiesta per separare due filamenti complementari di DNA aumenta con l'aumentare della lunghezza e della composizione di basi (%CG). L'ibridazione molecolare si basa sulla formazione di un doppio filamento per ricostruzione dei legami idrogeno tra le basi complementari di due filamenti singoli. Il processo viene definito ibridazione in quanto i due filamenti complementari del doppio filamento DNA non derivano dalla stessa molecola. Ad esempio, per l'ibridazione in Southern blot un filamento è rappresentato dalla sonda DNA in soluzione e l'altro filamento dal DNA bersaglio, presente nella miscela eterogenea di frammenti immobilizzati sul filtro. Ne deriva quindi che le specie molecolari che partecipano all'ibridazione devono essere presenti in stato denaturato, e che la specie molecolare immobilizzata (bersaglio) sia presente in eccesso rispetto a quella in soluzione (sonda). Solitamente la sonda è una miscela omogenea di frammenti di DNA clonati o sintetizzati in vitro e il bersaglio una miscela eterogenea di frammenti DNA. Se si utilizzasse un'elevata concentrazione di sonda, i filamenti complementari della sonda ibriderebbero preferenzialmente tra di loro sottraendosi all'interazioni con quelli immobilizzati sul filtro (bersaglio). L'ibridazione molecolare avverrà se i due filamenti presentano una totale o almeno parziale complementarità di sequenza nucleotidica.

Plasmidi i plasmidi sono molecole di DNA extracromosomale a doppio filamento circolare, presenti nei procarioti in cui si replicano autonomamente rispetto al cromosoma batterico e molto spesso conferiscono una caratteristica utile, come la resistenza agli antibiotici. La replicazione autonoma dei plasmidi dipende dalla presenza di una corta regione di DNA di poche centinaia di coppie di basi denominata **origine di replicazione**. La strategia di clonaggio del DNA nei plasmidi si basa sull'inserimento al loro interno di frammenti di DNA esogeno, i quali saranno replicati come parte della struttura circolare e quindi trasferiti alla progenie quando la cellula si divide. I plasmidi possono essere suddivisi in basso e alto numero di copie. La differenza del numero di copie è da imputare al meccanismo di replicazione: quelli ad alto numero di copie utilizzano le proteine dell'ospite mentre il basso numero di copie è dovuto alla dipendenza da fattori proteici codificati dallo stesso DNA plasmidico.

Amplificazione di DNA in vitro

Reazione a catena della polimerasi (PCR) Dal momento della sua messa a punto verso la metà degli anni ottanta, il metodo della **reazione a catena della polimerasi (PCR)** ha avuto un immenso impatto sia sulla ricerca, sia su quella applicata. La PCR in virtù della sua sensibilità e rapidità di esecuzione, ha permesso il raggiungimento di obiettivi fino a poco tempo prima impensabili come l'identificazione personale su base genetica e la diagnosi di malattie genetiche o di infezioni da patogeni in tempi molto brevi e con quantitativi estremamente ridotti di materiale biologico di partenza. Il metodo rappresenta un'estensione del processo della replicazione del DNA, permettendo la copiatura ripetitiva di una specifica regione di DNA. come si vedrà più avanti. Uno dei limiti della PCR è rappresentato dal dover conoscere anche parzialmente la sequenza da amplificare. Un ciclo di PCR è costituito da tre fasi: la **denaturazione del DNA stampo (94° per pochi minuti)**, l'**annealing di due primer o inneschi che definiscono una regione di DNA e l'estensione cioè la sintesi di filamenti complementari** da parte della DNA polimerasi, in presenza dei quattro desossiribonucleotidi trifosfato. I due primer oligonucleotidici, sono complementari ai due filamenti che definiscono la regione da copiare, con un orientamento 5' → 3'. In questo modo, all'interno della regione definita, il primer di sinistra dirige la sintesi del filamento complementare verso destra, ed il primer di destra verso sinistra. La reazione di annealing è una normale ibridazione DNA/DNA e viene effettuata ad

una temperatura compresa tra i 45° e i 60° che è influenzata sia dalla lunghezza sia dalla sequenza dei primer stessi. La temperatura ottimale permette quindi un corretto appaiamento tra primer e stampo ed un appaiamento ridotto o nullo con altre sequenze. Sebbene siano disponibili software specifici per determinare la temperatura di annealing di un primer, spesso la si deve determinare in modo sperimentale. La terza fase di un ciclo PCR è rappresentata dall'estensione. Nei primi protocolli questa veniva effettuata da una DNA polimerasi di E.coli. questa DNA polimerasi aveva caratteristiche tali che ad ogni ciclo di PCR era necessario ri-aggiungerla alla miscela di reazione, in quanto quella originale era stata inattivata dalla temperatura non permissiva. Successivamente fu scoperta una polimerasi termoresistente, che resiste ad alte temperature. Quindi utilizzando le DNA polimerasi termoresistenti, le fasi di allungamento, che si svolgono a 72°, non sono in grado di inattivare la potenzialità duplicativa della polimerasi, che è in grado di effettuare fino a 35 cicli di duplicazione. Dopo la denaturazione dei prodotti del primo ciclo, i primer ibridano a livello delle corrispondenti sequenze complementari e l'estensione produrrà la sintesi di quattro filamenti di cui due risultano ancora di dimensione superiore alla regione prefissata. Questi filamenti si sono prodotti utilizzando come stampo la molecola di DNA originaria. Al contrario, utilizzando come stampo i filamenti sintetizzati durante il primo ciclo si generano delle molecole di DNA che si arrestano a livello delle regioni dei primer opposti e quindi di dimensione corretta. Dopo la denaturazione, durante il terzo ciclo di PCR tali filamenti sono utilizzati come stampo per la sintesi di molecole di DNA della dimensione attesa, le cui estremità 5' e 3' corrisponderanno esattamente alle estremità dei primer. Durante i successivi cicli costituiti da denaturazione, annealing ed estensione, si otterrà l'aumento esponenziale di questo tipo di molecole, originando il prodotto finale visualizzato sul gel di agarosio. Partendo da una singola molecola di DNA stampo, in teoria dopo 30 cicli di PCR la miscela di molecole amplificata sarà costituita da un grande eccesso di molecole della dimensione attesa, e da una piccolissima quantità di molecole di dimensione maggiore. Quindi tutte le reazioni di PCR sono contaminate da una piccolissima quantità di molecole di DNA che possiedono una dimensione superiore all'atteso. La loro infinitesima concentrazione non influenza i successivi utilizzi di questi prodotti. La capacità di produrre con la PCR grandi quantità di un segmento di DNA definito ha portato alla definizione di clonaggio senza cellule.

Trascrizione inversa e PCR (rt-PCR)

Utilizzando l'enzima trascrittasi inversa per ottenere una copia di cDNA dall'mRNA, e combinando questo risultato con la PCR si ha la rt-PCR. Rt sta per retro trascrizione. Il metodo è costituito da due passaggi: la sintesi di DNA a singolo filamento utilizzando come stampo l'mRNA e la trascrittasi inversa, e la successiva amplificazione di questo con la reazione di PCR. Durante la retrotrascrizione e la PCR i primer utilizzati sono specifici per un determinato mRNA. Un problema legato alla RT-PCR è che la preparazione iniziale di mRNA può essere contaminata da DNA. lavorando con mRNA eucariotici, questo problema può essere spesso superato disegnando primer complementari a sequenze presenti in esoni adiacenti. In questo modo, l'amplificazione del DNA genomico sarà impedita, perché la presenza dell'introne rende la sequenza troppo grande per essere amplificata, o meglio facilmente distinguibile dall'amplificazione del cDNA. Alternativamente è necessario rimuovere ogni traccia di DNA dall'mRNA, generalmente mediante trattamento con DNasi priva di RNasi. Il sistema della RT-PCR permette l'analisi della espressione di specifici messaggeri di cui si conosce già la sequenza.

La PCR quantitativa (real time PCR)

Per alcune finalità di ricerca è necessario determinare la quantità di una specifica sequenza di DNA. è difficile essere sicuri di ottenere risultati affidabili semplicemente amplificando lo stampo e misurando la

quantità del prodotto su gel di agarosio. Vi è una relazione più affidabile tra le quantità di stampo e il numero di cicli di amplificazione necessari per produrre una quantità di prodotto rilevabile. Con la PCR in tempo reale si è in grado di monitorare la frequenza di amplificazione. Durante il processo di PCR real time si utilizza una sonda che si lega ad un filamento nel mezzo. Questa sonda contiene due basi modificate, un reporter fluorescente ed un inibitore di fluorescenza. Quando la replicazione avanza il prodotto esteso dal primer scalza l'estremità della sonda e l'attività esonucleolitica della polimerasi taglia il reporter fluorescente. Il reporter, separato dall'inibitore, permette l'emissione della fluorescenza. La quantità di fluorescenza è proporzionale alla quantità di prodotto di PCR fatto e misurata durante ciascun ciclo di PCR.

Il clonaggio dei prodotti di PCR

Sebbene la PCR sia spesso utilizzata per produrre quantità apprezzabili di una specifica sequenza da una miscela eterogenea di sequenze o semplicemente per verificare la presenza di una determinata sequenza in diversi campioni biologici, essa può essere impiegata anche per effettuare il clonaggio delle sequenze amplificate. Questo è importante quando il materiale di partenza è molto scarso. In genere i prodotti di PCR ottenuti con la polimerasi termoresistente non possiedono estremità piatte, ma estremità 3' coesive costituita da un singolo residuo non specifico di adenosina. Tali frammenti possono essere clonati in batteri utilizzando il sistema chiamato TA-cloning. Tale sistema sfrutta la presenza dell'adenosina alle due estremità 3' del frammento amplificato utilizzando un vettore plasmidico linearizzato che contiene una singola timina sporgente a ciascuna estremità 5'. Queste estremità molto bravi ma coesive, consentiranno una ligazione piuttosto efficiente. Tuttavia, non tutte le polimerasi aggiungono residui di adenosina al prodotto. È opportuno che le polimerasi proofreading producono frammenti di PCR con estremità realmente piatte. La PCR è attualmente molto utilizzata nella diagnostica di malattie genetiche, di infezioni da svariati patogeni e per l'identificazione su base genetica.

Mappe genetiche: i polimorfismi del DNA

Il metodo classico per l'allestimento di mappe genetiche prevede esperimenti di incroci controllati al fine di stabilire l'eventuale co-segregazione nella progenie di particolari fenotipi. Questo metodo, ha permesso grazie ad incroci specifici e al numero di progenie spesso ottenibile di allestire mappe geniche sufficientemente fitte. Nel caso della gente umana questo tipo di procedura non è applicabile: per la specie umana, il metodo classico è risultato molto poco risolutivo. Per promuovere l'allestimento di mappe genetiche informative, per la specie umana, era quindi necessario trovare un grande numero di fenotipi facilmente identificabili e distinguibili possibilmente con più forme alleliche ben rappresentate nella popolazione e seguire la loro segregazione casuale nelle famiglie: questo procedimento è definito come analisi dei pedigree umani. Il problema è stato risolto grazie alla possibilità di analizzare direttamente i fenotipi del DNA. a livello di DNA è infatti sufficiente la differenza di una singola base tra due sequenze omologhe per creare due alleli diversi. In alcuni casi, la variazione di una singola coppia di basi può dare origine anche ad un prodotto genico drasticamente diverso dal prodotto normale, a volte facilmente identificabile con una analisi fenotipica o con analisi proteiche. La maggior parte delle volte differenze di singole coppie di basi in loco omologhi non hanno alcuna evidente conseguenza biologica o perché la mutazione non comporta alcun cambiamento nella sequenza amminoacidica o semplicemente perché avviene in una regione genomica non codificante. Proprio la caratteristica di essere innocue rende queste differenze non selezionate, quindi molto rappresentate e potenzialmente qui disperse per l'intera

lunghezza di ogni cromosoma, rappresentando così un serbatoio di siti variabili che possono essere estremamente utili per la mappatura genica. Da qui il loro utilizzo come marcatori genetici. Tali marcatori vengono quindi definiti **polimorfismi genetici**, indicando con questo termine la presenza simultanea nella popolazione di alleli che presentano una qualsiasi variazione di sequenza. Ai fini pratici, per essere considerato un polimorfismo, un allele deve avere nella popolazione una frequenza maggiore dell'1%. La caratteristica dei polimorfismi di essere fenotipicamente silenti li ha resi per molto tempo difficili da identificare. Lo sviluppo di tecniche molecolari quali il Southern blotting ed in seguito la PCR e il sequenziamento del DNA hanno permesso negli anni di superare questo problema.

Polimorfismi di sequenza

Polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione

Negli anni 80 fu sviluppata un'idea che avrebbe permesso di identificare facilmente alcune delle variazioni polimorfiche presenti nelle sequenze genomiche. La metodologia si basa sulla proprietà delle endonucleasi di restrizione di tagliare il DNA in specifici siti di riconoscimento sparsi casualmente lungo le sequenze di un cromosoma. Qualora la variazione di una singola coppia di basi cada entro uno di questi siti, l'enzima di restrizione non sarà più in grado di riconoscere e quindi tagliare quella sequenza e di conseguenza saranno prodotti frammenti di DNA di lunghezza differente rispetto al sito non variato. Questi loci sono stati quindi definiti polimorfismi della lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP). Utilizzando il metodo del Southern Blotting ovvero l'ibridazione del DNA con una sonda specifica per il sito da analizzare, si potranno determinare le lunghezze dei frammenti di DNA generati e rivelare così la presenza o l'assenza di un sito polimorfico per l'endonucleasi di restrizione considerata. È importante notare che essendo basati sulla presenza o assenza di uno specifico sito di restrizione, ogni locus, contenente un RFLP, può avere, nella popolazione, soltanto nei due alleli.

Polimorfismi di singoli nucleotidi (SNP)

Dall'analisi dettagliata della sequenza di porzioni di genoma umano è emerso che le sequenze del DNA di individui diversi sono però più identiche, con differenze a livello di singoli nucleotidi (SNP), che si presentano mediamente ogni 500-1000 coppie di basi: quindi considerando che le dimensioni del genoma umano sono circa $3,2 \times 10^9$ coppie di basi, si ritiene che il loro numero totale possa essere compreso tra 3 e 7 milioni. Queste variazioni insorgono attraverso le mutazioni e vengono ereditate come varianti alleliche. In teoria ad un locus SNP dovrebbero esistere quattro alleli, tanti quanti sono i nucleotidi presenti nel DNA; in realtà, nell'uomo gli SNP tri e tetra allelici sono rarissimi in quanto dovrebbero prevedere un nuovo evento mutazionale nella stessa posizione nucleotidica in cui è avvenuto e si è in seguito fissato il primo evento, fatto non impossibile, ma certamente molto poco probabile. Pur avendo la stessa limitazione degli RFLP (bi-allelismo), gli SNP rappresentano preziosi marcatori negli studi di associazione della sequenza genomica a causa della loro ampia diffusione nella sequenza genomica e per il fatto che possono essere individuati con metodi facilmente automatizzabili quali il sequenziamento e analisi di ibridazione con oligonucleotidi.

Polimorfismi di lunghezza

Polimorfismo di loci con ripetizioni in tandem

Negli anni 80 fu scoperto che certi loci all'interno dei cromosomi umani hanno lunghezza variabile da individuo a individuo. All'analisi questi loci dimostrano di contenere serie consecutive di unità ripetute,

dette **minisatelliti**. Nell'ambito della popolazione umana, il numero di ripetizioni in serie per ciascun minisatellite varia notevolmente, motivo per cui questi loci sono anche chiamati sequenze con numero variabile di ripetizioni in tandem (VTNR, variable number of tandem repeats), e costituiscono una buona fonte di polimorfismi multiallelici. L'analisi di questi loci, data la lunghezza delle regioni ripetute, viene normalmente effettuata mediante la procedura del southern blotting. Semplici ripetizioni consecutive composte da meno di 5 nucleotidi collettivamente chiamate "brevi ripetizioni in tandem" (SRT, short tandem repeats) o micro satelliti, sono ancora più rappresentate e maggiormente sparse in tutto il genoma umano rispetto alle sequenze minisatellite. Questi siti, per la loro semplice struttura ripetuta sono una fonte importante di polimorfismi multiallelici (STRP, short tandem repeats polymorphism). La reazione a catena della polimerasi e la possibilità di sequenziare le regioni uniche a monte e a valle di un micro satellite, per derivarne dei primer, hanno reso questi siti di facile analisi, rendendoli in breve tempo i marcatori genetici più utilizzati. Nel 1987 è stata pubblicata la prima mappa del genoma umano principalmente basata su RFLP. Tuttavia, data la bassa informatività dei marcatori utilizzati (solo due alleli) e la loro scarsa frequenza nel genoma, la risoluzione raggiunta era considerevolmente bassa. La disponibilità dei micro satelliti e di programmi di mappatura genetica su larga scala, ha permesso, nel 1994 di pubblicare la prima mappa con una densità di marcatori maggiore di uno ogni centiMorgan. L'allestimento di mappe genetiche ha tuttavia mostrato diversi limiti, il primo dei quali è la risoluzione raggiunta. Il genoma aploide umano è composto da 3,2 miliardi di coppie di basi di DNA e presenta una distanza genetica totale pari a 4000 centiMorgan, con una media di 850.000 pb/cM. È dunque evidente che, anche con un marcatore ogni cM, la risoluzione rispetto alla struttura fisica del DNA è piuttosto bassa. Un secondo problema evidenziato dalle mappe genetiche è che esse non sempre rispecchiano in modo accurato le distanze fisiche tra i geni. Le mappe genetiche si basano sulle frequenze di crossing over, che possono variare notevolmente da una regione del cromosoma all'altra; quindi le distanze genetiche sulle mappe sono solo approssimazione delle distanze fisiche reali riscontrate sul cromosoma. Nonostante questi limiti le mappe genetiche hanno svolto un ruolo cruciale nella determinazione delle posizioni cromosomiche dei geni responsabili di malattie nello sviluppo delle malattie fisiche e nel sequenziamento dei genomi.