

Genetica

Giacomo Fantoni

Telegram: @GiacomoFantoni

Github: <https://github.com/giacThePhantom/Genetica>

28 settembre 2020

Indice

1	Introduzione	2
1.1	Il DNA come base molecolare dell'ereditarietà	2
1.1.1	Isolamento del DNA	3
1.1.2	Caratterizzazione chimica e prima teorizzazione della struttura	3
1.1.3	Determinazione del rapporto tra le basi	3
1.1.4	Studi del pneumococco	3
1.1.5	Studi dei batteriofagi	4
1.1.6	Alternative al DNA a doppio filamento	4
1.2	La rivoluzione del DNA	5
1.2.1	Leggere il DNA	5
1.2.2	Contare il DNA	5
1.2.3	Scrivere il DNA	5
1.2.4	Interazioni gene e ambiente	7

Capitolo 1

Introduzione

Si intende per genetica lo studio della trasmissione dell'informazione genetica da genitori a figli, come questa viene organizzata e decodificata per portare ad un fenotipo rilevante. Si considera la sua organizzazione, divisione, frammentazione utilizzo e modifica nel corso delle varie divisioni di cellule somatiche o germinali. Il DNA svolge il fondamentale ruolo di contenere e permettere la decodifica di informazioni essenziali per la vita. Si indica con mutazione *de novo* una mutazione che accade durante l'osservazione di un sistema. Il soggetto di studio della genetica sono sistemi modello animali o cellulari utilizzati in quanto più semplici da coltivare e studiare. Lo studio si svolge sulle correlazioni genotipo-fenotipo, analisi dei pedigree e loro ricostruzione per capire da dove viene il rischio di portare un fenotipo. L'utilizzo dei sistemi modello per lo studio di patologie o eventi caratteristici dell'uomo è legittimato dal fatto che l'uomo e il sistema modello sono imparentati tra di loro. I modelli sono pertanto predittivi di fenomeni e dell'effetto di mutazioni nella specie umana. I sistemi modello si dividono in:

- Unicellulari con vita coloniale.
- Pluricellulari semplici (poche cellule).
- Pluricellulari complessi.

1.1 Il DNA come base molecolare dell'ereditarietà

Nei primi anni 50 si tentava di determinare quale molecola contenesse il materiale genetico. Per determinarla si sono evidenziate alcune sue caratteristiche:

- Deve contenere informazioni complesse e variegata in modo da essere in grado di dare origine alle molteplici forme viventi: generare ovvero fenotipi diversi.
- Deve essere presente in tutte le forme viventi.
- Deve essere stabile e capace di replicazione fedele.
- Deve essere capace di subire modificazioni permanenti o mutazioni.
- Deve trovarsi nel nucleo e far parte dei cromosomi.
- Deve essere in grado di esprimersi, definire e codificare un fenotipo.

Fino all'inizio degli anni 50 si riteneva che fossero le proteine queste molecole in quanto possedevano la complessità di sequenza e funzione necessaria alle caratteristiche elencate. Il tardivo riconoscimento del DNA si deve alla mancanza di conoscenze precise sulla sua composizione e struttura.

1.1.1 Isolamento del DNA

Il DNA viene scoperto tra il 1868 e il 1869 da Miescher, medico sperimentale che durante il suo studio a Tübingen si dedica a esplorare il nucleo delle cellule. Per farlo utilizza bende usate piene di pus, materiale di scarto da cui isola prima le cellule e il loro nucleo. Le bende vengono lavate in acqua, una soluzione di solfato di magnesio consente l'estrazione del nucleo da cui vengono rimossi i lipidi con acqua ed etere. Utilizzando acidi blandi si nota la formazione di un precipitato che può essere risospeso usando una soluzione lievemente alcalina. Attraverso saggi alla fiamma Miescher nota come sia presente molto fosforo e lo zolfo sia assente. Miescher riesce pertanto ad isolare una nuova molecola che chiama nucleina. Utilizzando pepsina determina che non è una proteina. I suoi colleghi successivamente confermano il risultato estraendo la nucleina da eritrociti nucleati di pesce confermando la sua natura pervasiva. Un altro ricercatore nel 1889 segue il protocollo e ritiene di aver isolato una sottocomponente della nucleina che chiama acido nucleico. Successivamente Miescher riconferma l'esperimento con lo sperma di salmone isolando da esso la nucleina e la sua presenza in cellula germinali fa sorgere domande sul suo ruolo nell'ereditarietà.

1.1.2 Caratterizzazione chimica e prima teorizzazione della struttura

Albrecht Kossel determina che la nucleina è composta da basi azotate, zucchero e fosfato e nella prima decade del 900 Levene e Steudel studiano la struttura della macromolecola e il primo propone una struttura a tetranucleotidi, il DNA come una macromolecola formata da tetrameri contenenti le quattro basi legate tra di loro poste una sopra l'altra. Questo modello viene ampiamente accettato ma l'omogeneità della struttura rende improbabile che questa possa codificare informazioni complesse e pertanto prevale l'idea che il DNA abbia una funzione principalmente strutturale e non si occupi di trasferire le informazioni.

1.1.3 Determinazione del rapporto tra le basi

Chargaff, biochimico, studia il DNA utilizzando cromatografia su carta: prendendo il DNA da diverse sorgenti passa alla cromatografia le molecole caratterizzando il rapporto quantitativo relativo tra le componenti e nota come le basi siano in percentuali diverse (rapporti variabili tra gli organismi), pertanto la struttura a tetranucleotide non può essere quella corretta, riscoprendo il valore del DNA.

1.1.4 Studi del pneumococco

Griffith

Griffith nel 1928 studia a Londra il comportamento del pneumococco e ne osserva due tipi, un primo liscio di tipo IIIS (formano una sovrastruttura di zuccheri) e uno rugoso di tipo IIR. La forma IIIS è aggressiva e in grado di infettare topi con la polmonite. Successivamente compone un esperimento con tre beute di controllo e una di studio. Nella prima beuta fa crescere dei batteri di tipo IIIS virulenti e li fa crescere, iniettandoli poi nel topo nota come questo soffre e muore, nel suo sangue si trova crescita batterica. Nella prima beuta fa crescere batteri di tipo IIR non virulento, iniettandoli poi nel topo questo non soffre e non si trovano batteri nel suo sangue. Nella terza beuta pone i batteri virulenti e li lisa attraverso il calore: iniettando nel topo i corpi cellulari questo non soffre e non si

trovano batteri nel suo sangue. Nella quarta beuta mischia i batteri non virulenti di tipo IIR con il lisato di IIIS, mettendoli in coltura e iniettando il topo questo soffre e muore e si trova il batterio di tipo IIIS nel suo sangue. Griffith scopre pertanto un principio trasformante, una caratteristica permanente che pertanto non è dovuta al trasferimento della capsula ma che è diventato patrimonio dei batteri. Non riesce a determinare la natura chimica del principio.

Dawson e Sia

Dawson e Sia ripetono l'esperimento di Griffith senza iniettare le cellule ma mischiando il lisato IIIS e IIR in coltura e piastrando le cellule sulle piastra di coltura e determinano che il fenomeno è esterno al topo: la cocoltura è sufficiente per far comparire colonie IIR virulente. Si ha la conferma del principio trasformante.

Avery

Nel 1944 nel laboratorio diretto da Avery al Rockefeller institute viene svolto un esperimento per determinare la molecola responsabile del principio trasformante. Si fanno crescere i batteri virulenti in coltura e li si uccide. Il lisato viene diviso in tre provette separate nelle quali vengono introdotte rispettivamente RNAasi, proteasi e DNAasi. Mischiando i lisati con IIR si osserva quando si ottiene la manifestazione fenotipica del principio trasformante: soltanto il lisato trattato con DNAasi non dimostra il passaggio di informazione e pertanto la molecola trasformante è il DNA.

1.1.5 Studi dei batteriofagi

La phage church in particolare Hershey e Chase, un gruppo di microbiologi appassionato alla ricerca dei batteriofagi, entità visibili al tempo solo indirettamente osservando la loro capacità di uccidere batteri, sviluppa un esperimento per visualizzare la molecola responsabile del passaggio genico. Per farlo si sfrutta il fatto che la molecola è ricca di fosforo ma mancante zolfo, elemento presente invece nelle proteine. Pertanto si usa un terreno contenente un isotopo radioattivo dello zolfo dove vengono fatti crescere i batteri e infettati con il batteriofago T2 in modo da avere una progenie di fagi marcata. Recuperando i fagi radioattivi e infettando cellule di E. coli non radioattive le si fa infettare, si separano con un frullatore e si centrifuga per ottenere un pellet di cellule batteriche. Osservando dove si trova la radioattività si nota come questa rimane nel surnatante e non è nei batteri che hanno subito l'infezione: questi successivamente subiscono lisi e la progenie fagica non è radioattiva. Si conclude che le macromolecole marcate con lo zolfo non sono importanti per produrre progenie fagica. Si ripete l'esperimento con fosforo radioattivo e si nota come la radioattività in questo caso si trova nel pellet e non nel surnatante: il tracciante informa che molto probabilmente il DNA è entrato nel batterio e la popolazione di fagi da esso derivante è parzialmente radioattiva. Unendo i due risultati si determina che le proteine non partecipano all'infezione mentre l'acido nucleico viene trasmesso nei batteri e riproposto nella progenie: l'elemento importante per la produzione di nuovi fagi è il DNA e non le proteine che avranno ruolo di rivestimento, di formare il capsido che rimane fuori dalla cellula. Le proteine hanno pertanto la funzione primaria di proteggere e trasportare il materiale genetico.

1.1.6 Alternative al DNA a doppio filamento

Fraenkel-Conrat e Singer studiando il virus del mosaico del tabacco notano come questo sia formato da una struttura proteica molto regolare che forma un barilotto contenente una singola molecola di RNA. Si trovano due varianti del virus A e B e si riesce a smontare e rimontare i virus in provetta

in modo da scambiare il capsido tra una popolazione A e una B. Gli ibridi chimerici ora vengono utilizzati per infettare delle foglie e studiando la progenie si determina che il tipo è determinato dall'RNA e non dalle proteine. Per questo tipo di virus è l'RNA la molecola della vita. Gierer e Schramm completano e confermano gli esperimenti notando come l'evoluzione ramificandosi ha scelto diverse strategie per la molecola della vita: DNA a filamento singolo (ssDNA) e doppio (dsDNA) o RNA a filamento singolo (ssRNA) e doppio (dsRNA).

1.2 La rivoluzione del DNA

Si intende per rivoluzione del DNA la capacità di leggere, contare e scrivere il DNA iniziata con il nuovo millennio.

1.2.1 Leggere il DNA

La tecnica di lettura del DNA viene scoperta da Sanger (da cui prende il nome) che inventa e migliora metodi per leggere il DNA: dei nucleotidi modificati in 3' in modo che blocchino la sintesi da parte della DNA polimerasi quando vengono aggiunti alla catena nascente e accoppiandoli con fluorocromi si può ricostruire la sequenza del DNA in modo lineare in quanto i colori permettono di determinare la posizione delle basi. Questo processo è veloce ed automatizzabile. Il metodo Sanger accoppiato con la reazione a catena della polimerasi (PCR) permette di scegliere un segmento di DNA e crearne moltissime copie in modo da aumentare il segnale e la capacità di riconoscerne la sequenza. All'inizio del 2000 si annuncia il primo draft del genoma umano ottenuto dallo studio del DNA di diversi individui. Il genoma umano è composto da 3 200 000 000 di basi. Ora si necessita di decodificarlo andando a perseguire la funzione del gene. Lo sviluppo tecnologico ha abbassato drasticamente i costi di sequenziamento rendendo meno importanti lo studio del modello e dei pedigree e la ricerca dei tratti rari. Sono nati genome browser, repository contenenti informazioni generali sul genoma dell'uomo e di altri organismi.

1.2.2 Contare il DNA

Il next generation sequencing permette di contare ed annotare informazioni sul DNA, diventa uno strumento quantitativo per capire come l'informazione viene usata e decodificata. Si osserva come alcuni frammenti si sono spostati, la scomparsa di un frammento e le sequenze invertite (inversioni). Grazie alla sua lettura e quantificazione si capisce la struttura della cromatina, capire i punti di inizio di trascrizione da parte dell'RNA polimerasi, tentando di capire l'organizzazione del genoma, numerando i geni e separando la frazione codificante da quella non funzionale e ingombrante. Si noti come la trascrizione genera plasticità in quanto ci sono molte possibilità di splicing alternativo e siti di poliadenilazione diversi. Si nota come studiando il genoma umano invece dei teorizzati 100 000 geni le analisi iniziali ne hanno trovati 35 000 e quel numero è stato diminuito fino a 21 000 e molti geni codificano solo per RNA e non per proteine come prodotto finale.

1.2.3 Scrivere il DNA

Terapia genica

Un esempio di terapia genica è l'ingegnerizzazione delle cellule T citotossiche per l'eradicazione della leucemia. Lo studio utilizza metodi per convertire i linfociti T citotossici di un paziente in modo che siano riprogrammati (ingegnerizzati) per trasformarli in killer specifici della leucemia aumentando

l'aspettativa di vita. La conversione avviene grazie a DNA ricombinante riarrangiando frammenti e costruendo un vettore lentivirale in modo che esprima un antigene chimerico che riconosca e distrugga le cellule leucemiche. Nell'antigene chimerico si trova una molecola transmembrana con un dominio extracellulare a singola catena in grado di riconoscere un antigene specifico delle cellule leucemiche, un dominio transmembrana che la ancora e un dominio citoplasmatico che va ad attivare vie di segnalazione che permettono la sopravvivenza e la proliferazione della cellula solo in presenza di cellule leucemiche. L'ingegnerizzazione del linfocita avviene grazie ad un virus formato dal capsido di un virus HIV per proteggere l'RNA e una chimera di funzioni di geni umani, un sistema di segnalazione del woodchuck, del genoma bovino, resistenza alla penicillina e un punto di origine di replicazione. Tutti questi elementi uniti sono necessari per creare il vettore ingegnerizzante. Un ulteriore esempio di terapia genica si utilizza per curare casi di combined immunodeficiency, malattia che causa un anormale rischio di infezione a causa della disattivazione del gene per l'adenosina deaminasi. Infettando le cellule con un virus disattivato contenente il gene selvatico difettivo nel genoma del paziente. L'utilizzo dei virus presentava però dei problemi in quanto possibile causa di patologie tumorali e leucemie e viene pertanto sostituito con la tecnica CRISPR/Cas9.

Clonaggio

Si intende per clonaggio sia il clonaggio posizionale di un gene, che coinvolge identificazione progressiva di un gene su un cromosoma attraverso tecniche di mappatura sempre più fini sia la produzione di animali transgenici sia la selezione di linee con tratti fenotipici interessanti e il loro incrocio per produrre elementi di interesse biologici. Nel 1996 viene clonata la pecora Dolly prendendo una cellula somatica da una ghiandola mammaria di un adulto riprogrammandola parzialmente in modo che diventi sorgente di informazione per una cellula germinale. Per determinare la buona uscita dell'esperimento l'impianto dello zigote è stato fatto in una madre surrogata con caratteristiche fenotipiche diverse. Si nota come Dolly presenta caratteristiche della cellula somatica riprogrammata.

Editing genomico

Si definisce editing genomico il processo di modificare genomi sito specificamente attraverso enzimi. Uno degli enzimi utilizzati è il complesso CRISPR/Cas9. L'enzima Cas9 è una DNA endonucleasi che naturalmente funziona come difesa nei batteri per DNA invasore. Possiede due siti attivi che rompono un filamento di una molecola di DNA a doppio filamento. L'enzima è guidato al target da una molecola di RNA che riconosce le sequenze di rottura PAM (protospacer adjacent motif). Cas9 crea pertanto rotture sito specifiche che possono essere riparate attraverso unione non omologa o ricombinazione omologa. Durante la ricombinazione omologa l'aggiunta del DNA donatore permette l'inserzione di una sequenza aggiuntiva al sito di rottura permettendo l'ingegnerizzazione del genoma. Un vantaggio rispetto alle altre tecniche di CRISPR/Cas9 è che la correzione è sito specifica e permette così una più alta frequenza di correzione del fenotipo. Inoltre rispetto alle altre tecniche non aggiunge un gene funzionale o parzialmente funzionale insieme al gene difettivo ma va a rimuoverlo.

Prevenzione della distrofia muscolare nei topi attraverso editing del DNA germinale mediato da CRISPR/Cas9 La distrofia muscolare di Duchenne (DMD) è una malattia genetica legata al cromosoma X. È determinata da una mutazione nel gene che codifica la distrofina. È caratterizzata da una progressiva debolezza muscolare e una prospettiva di vita ridotta. Si utilizza editing genomico mediato da clustered regularly interspaced short palindromic repeat/Cas9 (CRISPR/Cas9) per correggere il gene della distrofina mutato nella linea germinale del topo *mdx*. Si nota come si produce una popolazione di animali in cui i geni corretti *Dmd* vanno variano tra il 2%

e il 100%. Che supera l'efficienza della reazione di editing, suggerendo un vantaggio selettivo per le cellule corrette. Il topo *mdx* presenta una mutazione nonsense nell'esone 23 del gene *Dmd* (da *TAA* a *CAG*): si inietta Cas9, sgRNA (single-guide RNA) e uno stampo di HDR (homology directed repair) nello zigote del topo per correggere la mutazione nella linea germinale. Il posizionamento del sgRNA è permesso dalla presenza della sequenza PAM *GGC* nelle vicinanze. CRISPR/Cas9 corregge la mutazione durante lo sviluppo embrionale del topo.

Utilizzo in medicina L'editing genomico nella linea germinale non è correntemente possibile negli umani. Nonostante questo in linea di principio può essere utilizzato in cellule postnatali in vivo superando difficoltà tecnologiche: per dirigere le componenti verso le cellule somatiche appropriate si può utilizzare il virus adeno-associato (AAV). Gli effetti a lungo termine devono essere ancora valutati da studi preclinici in grandi modelli di malattia. Può venire utilizzato per l'inattivazione del retrovirus endogeno porcino nei maiali per permettere gli xenotrapianti con gli umani o ancora per attivare un promotore che combatta l'obesità causata da aploinsufficienza andando a colpire la copia funzionale del gene rimanente attraverso attivazione mediata da CRISPR (CRISPRa) in maniera specifica al tessuto.

Biologia sintetica

Si intende per biologia sintetica il processo di ricerca volto a creare un genoma sintetizzato completamente in laboratorio. Un primo esperimento ha coinvolto il design, la sintesi e l'assemblaggio del materiale genetico di *M. mycoides* e il suo trapianto in cellule di *M. caprocolum* a cui era stato rimosso il DNA. L'unico DNA presente era pertanto quello sintetizzato in laboratorio che conteneva sequenze "watermark". Le nuove cellule possedevano le proprietà fenotipiche attese ed erano capaci di replicazione autonoma continua. Si è pertanto capaci di creare in laboratorio un genoma partendo da una prima fase di progettazione al computer. Il passo successivo è quello di analisi del genoma: ora che è possibile progettarne uno da zero è possibile eliminare geni o loro combinazioni in modo da osservare quali sono a creare le condizioni minime necessarie alla vita permettendo un loro studio accurato in un genoma minimo. Inoltre si ottiene in questo modo un genoma piccolo e versatile per investigare altre funzioni della vita senza che questo diventi troppo grande e non permetta più la propria trasmissione alla progenie. Un ulteriore esperimento ha preso un lievito con un genoma più grande e 16 cromosomi che sono stati fusi in un'unica molecola circolare a cui sono stati introdotti elementi di ricombinazione per determinare l'importanza della posizione dei geni, la relazione tra topografia dei geni e loro livelli di trascrizione o processamento in traduzione. Il lievito così modificato non è resiliente come quello fisiologico in quanto più suscettibile a errori di trasmissione, ma si è scoperto che altre organizzazioni non precludono la possibilità della vita.

1.2.4 Interazioni gene e ambiente

Lo studio dei geni è complicato dalle interazioni tra geni e ambiente. Si intende per ambiente la competizione tra cellule diverse o, in organismi complessi, dalla loro cooperazione e interazione nelle varie nicchie dei microambienti tissutali. L'interazione tra le cellule come quelle umane con la comunità microbiche e virali con cui convivono aumenta il livello di complessità introducendo espressioni specifiche per lo stato ambientale.

L'attivazione ambientale e genetica di un asse di segnalazione BDNF/Leptina causa remissione ed inibizione del cancro Il cancro è influenzato dall'ambiente ma questo ruolo non rimane definito. Si nota come topi che vivono in un ambiente arricchito (EE - enriched environment)

mostrano ridotta crescita tumorale e aumentata remissione. Il siero degli animali tenuti nell'EE inibisce la crescita del tumore in vitro e presenta livelli più bassi di leptina. Il fattore neurotrofico ipotalamico derivato dal cervello (BDNF) è stato selettivamente sovra regolato dall'EE e la sua superespressione ha ridotto il carico tumorale. Si nota come il melanoma *B16* rappresentante al giorno 17 presenta 10^5 cellule per topo. L'EE ha indotto una completa resistenza al tumore in un sottoinsieme di topi e tutti i topi di controllo presentano tumori visibili. Il risultato dell'esperimento mostra che vivere in un EE porta a un'inibizione significativa della crescita del cancro. Il meccanismo dell'attivazione dell'asse HSA e l'induzione dell'espressione ipotalamica di BDNF in risposta a stimoli ambientali porta all'attivazione simatoneurale che attiva gli adipociti b-ARs inibendo l'espressione e il rilascio della leptina.