

Genetica

Giacomo Fantoni

Telegram: @GiacomoFantoni

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

6 ottobre 2020

Indice

1	Introduzione	3
1.1	Il DNA come base molecolare dell'ereditarietà	3
1.1.1	Isolamento del DNA	4
1.1.2	Caratterizzazione chimica e prima teorizzazione della struttura	4
1.1.3	Determinazione del rapporto tra le basi	4
1.1.4	Studi del pneumococco	4
1.1.5	Studi dei batteriofagi	5
1.1.6	Alternative al DNA a doppio filamento	5
1.2	La rivoluzione del DNA	6
1.2.1	Leggere il DNA	6
1.2.2	Contare il DNA	6
1.2.3	Scrivere il DNA	6
1.2.4	Interazioni gene e ambiente	8
2	Mitosi e meiosi	10
2.1	Cromosomi e ciclo cellulare	10
2.1.1	Cromosomi	10
2.1.2	Ciclo cellulare	10
2.2	Mitosi	11
2.2.1	Fasi della mitosi	11
2.2.2	Attivazione della fase M	11
2.2.3	Eventi drammatici nella mitosi	12
2.3	Meiosi	16
2.3.1	Meiosi 1	16
2.3.2	Meiosi 2	17
2.3.3	Confronto con mitosi	17
2.3.4	Crossing-over	17
3	Mendel	19
3.1	Vita	19
3.1.1	Esperiment	19
3.1.2	L'eredità Mendeliana	20
3.2	Principi mendeliani	20
3.2.1	Primo esperimento	20
3.2.2	Reincrocio	21
3.2.3	Secondo esperimento	21

3.3	Comprensione molecolare degli esperimenti di Mendel	22
3.4	Esempi di tratti mendeliani nell'uomo	22
3.4.1	Definizioni	22
3.4.2	Beta-Talassemia	22
3.4.3	Anemia falciforme	25

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.

Capitolo 2

Mitosi e meiosi

2.1 Cromosomi e ciclo cellulare

2.1.1 Cromosomi

Negli eucarioti il genoma è organizzato in cromosomi, molecole di DNA che in determinati momenti del ciclo cellulare si presentano altamente conservati e ben visibili. In alcuni momenti il cromosoma è costituito da un singolo cromatide mentre in altri è formato da due cromatidi fratelli. Le estremità stabili dei cromosomi si dicono telomeri e questi presentano una regione contratta detta centromero, luogo di formazione del cinetocoro a cui si attaccano i microtubuli del fuso. Il numero di cromosomi è tipico per ogni specie, negli umani ne sono presenti 46. Nella specie umana si trovano 23 coppie di cromosomi compresi quelli sessuali X e Y (XX per le femmine e XY per i maschi). Gli esseri umani sono pertanto diploidi: si trovano due serie di cromosomi organizzate in coppie omologhe che presentano una coppia di alleli (versioni di uno stesso gene) che codificano per una caratteristica. Le coppie di cromosomi si trovano nelle cellule somatiche e i loro membri sono detti omologhi. In ogni coppia uno dei cromosomi è di origine paterna e uno di origine materna. Se sono presenti 2 serie di cromosomi ha un corredo cromosomico diploide, se ne è presente solo una si dice aploide.

2.1.2 Ciclo cellulare

Il ciclo vitale di una cellula si divide in due grandi parti: l'interfase in cui la cellula cresce e la fase M in cui avviene la divisione nucleare e cellulare.

Interfase

L'interfase viene a sua volta divisa in varie fasi:

- Fase G_1 : la cellula si accresce e può decidere se entrare in G_0 o fase di quiescenza o raggiungere il checkpoint G_1/S . Una volta superato il checkpoint la cellula è programmata per dividersi.
- Fase S : viene duplicato il DNA.
- Fase G_2 : la cellula si prepara per la mitosi. Questa continua fino a che si raggiunge il checkpoint G_2/M , dopo il quale la cellula può dividersi.

Fase M

Nella fase M avvengono la mitosi e la citocinesi, ovvero la divisione cellulare che darà origine a due cellule figlie che rientrano nella fase G_1 .

2.2 Mitosi

La mitosi è il processo di divisione cellulare che garantisce la conservazione e la distribuzione dello stesso numero di cromosomi da una cellula madre alle due cellule figlie. Il materiale cromosomico raddoppia una volta e la cellula si divide una volta.

2.2.1 Fasi della mitosi

Interfase

Durante l'interfase è presente la membrana nucleare e i cromosomi sono in forma rilassata, entrano nel nucleo della cellula i centrosomi.

Profase

La profase inizia quando i lunghi filamenti di cromatina cominciano a condensarsi attraverso processi di spiralizzazione in cui i cromosomi diventano più corti e più spessi. Ogni cromosoma replicato durante la fase S precedente consiste di una coppia di cromatidi fratelli. Ogni cromatide contiene un centromero. Si forma inoltre il fuso mitotico.

Prometafase

Nella prometafase la membrana nucleare si disgrega e i microtubuli del fuso entrano in contatto con i cromosomi.

Metafase

Nella metafase i cromosomi si allineano sulla piastra metafasica, il piano equatoriale della cellula. Per la loro corretta separazione si forma una connessione tra i microtubuli del cinetocoro e i cromosomi replicati. Il cinetocoro è un complesso proteico che aderisce al centromero.

Anafase

Durante l'anafase i cromatidi fratelli si separano muovendosi verso i poli opposti.

Telofase

Durante la telofase i cromosomi giungono ai poli del fuso, si ricostituisce la membrana nucleare e i cromosomi subiscono un rilassamento.

2.2.2 Attivazione della fase M

I responsabili dell'inizio della fase M in una cellula sono il *MPF* (fattore di promotore della fase M) e la *ciclina B*.

Fase G_1

All'inizio della fase G_1 i livelli di *MPF* e di *ciclina B* sono praticamente nulli. La cellula comincia a sintetizzare *ciclina B*.

Fase S

Durante la fase *S* i livelli aumentati di *ciclina B* si combinano con *CDK* (chinasi ciclina-dipendente), producendo un aumento di *MPF* inattivo.

Fase G_2

Durante la fase G_2 dell'interfase si accumula *ciclina B*. Verso la fine della G_2 l'*MPF* (fattore promotore della fase *M*) viene attivato attraverso fosforilazione da fattori di attivazione determinando la frammentazione dell'involucro nucleare, la condensazione dei cromosomi, l'assemblaggio del fuso e tutti gli altri fenomeni associati alla fase *M*. È pertanto il livello critico di *MPF* attivo a causare la progressione della cellula attraverso il punto di controllo G_2/M e l'ingresso in mitosi.

Metafase

Verso la fine della metafase la degradazione della *ciclina B* riduce la quantità di *MPF* attivo provocando l'anafase, la telofase, la cinetochinesi e l'interfase.

2.2.3 Eventi drammatici nella mitosi

Rotture del DNA e polverizzazione dei cromosomi da errori nella mitosi

In questo studio si tenta di identificare un meccanismo in cui errori nella segregazione dei cromosomi durante la mitosi genera rotture del DNA attraverso la formazione dei micronuclei. I micronuclei si formano quando errori mitotici producono cromosomi lagging. Studiandoli si nota come subiscono una replicazione del DNA asincrona e difettiva risultando in danno al DNA e spesso frammentazione del cromosoma nel micronucleo. Il destino dei micronuclei è vario: possono persistere per molte generazioni o essere ridistribuiti in nuclei figli, pertanto la segregazione errata può portare a mutazioni e riarrangiamenti del cromosoma che possono integrarsi nel genoma. La polverizzazione dei cromosomi nei micronuclei può essere anche la causa del fenomeno di cromotrips, dove cromosomi o loro braccia subiscono massive rotture del DNA e riarrangiamenti. Due modelli animali dove l'errore di segregazione risulta in sviluppo tumorale mostrano eventi di cromotrips. I micronuclei si formano dai cromosomi in ritardo nell'anafase o da frammenti di cromosomi acentrici. Non si conosce precisamente la composizione e proprietà funzionali dei micronuclei ma mostrano molte somiglianze con il nucleo. Diversi studi danno risposte diverse al fatto che i micronuclei siano attivi trascrizionalmente, replichino il DNA o abbiano una normale risposta al danno. Il fatto ultimo del cromosoma intrappolato nei micronuclei rimane poco chiaro.

Esperimento Per determinare se i micronuclei appena formati sviluppino danni al DNA si generano micronuclei in cellule sincronizzate e li si traccia attraverso il ciclo cellulare.

Sincronizzazione Come primo approccio di sincronizzazione i micronuclei sono stati generati da cellule *U2OS* trasformate dal rilascio di depolimerizzazione dei microtubuli indotta dal nocodazolo. Inoltre in quanto l'aneuploidia può causare un arresto del ciclo cellulare causato da *p53* questa è stata silenziata da interferenza a RNA (RANi) in modo da permettere di monitorare il destino delle

cellule a fasi successive del ciclo cellulare. Un altro metodo indipendente per generare i micronuclei avviene attraverso una linea cellulare umana *HT1080* che porta un cromosoma umano artificiale *HAC* con un cinetocoro che può essere condizionalmente inattivato. In questo sistema l'assemblaggio del cinetocoro sull'*HAC* è bloccata dal lavaggio di dossiciclina dal medium in modo che *HAC* sia inabile di attaccarsi al fuso mitotico ed è lasciata indietro durante l'anafase riformandosi come micronucleo.

Osservazione dei micronuclei Presi insieme i micronuclei non presentano significativo danno al DNA durante G_1 ma una grande frazione lo acquisisce durante la fase S , danno che periste in G_2 . Per determinare se l'acquisizione del danno richiede la replicazione del DNA le cellule micronucleate sincronizzate sono state rilasciate in un medio contenente timidina per bloccare la replicazione del DNA. Si nota come il blocco della replicazione abolisce l'acquisizione del danno al DNA dimostrando che le rotture nei micronuclei avvengono in una maniera dipendente dalla replicazione. Per l'osservazione del danno si rilasciano le cellule sincronizzate in un medium con e in uno senza con $2mM$ timidina. Le cellule sono state colorate per *TUNEL* (verde) e *ciclina B1* (rosso). In un'altra osservazione le cellule vengono marcate con *bromodeossiuridina* (*BrdU*), riconoscibile con un anticorpo e mostra la sintesi del DNA. Si nota come il micronucleo si colora di rosso in un momento successivo, confermando l'ipotesi che il danno al DNA venga acquisito a causa di un ritardo nella sintesi del DNA al suo interno rispetto ai cromosomi nei nuclei.

Rotture cromosomiche Successivamente si procede per testare la predizione che replicazione anormale del DNA nei micronuclei può generare rotture cromosomiche. Si preparano dalle cellule non trasformate del primo ciclo cellulare dopo il rilascio del nocodazolo o dai controlli trattati con *DMSO*. Si nota come il 7.6% dei cromosomi esibisce cromosomi che appaiono frammentati colorati attraverso *DAPI*. Il meccanismo di polverizzazione coinvolge compattamento di cromosomi parzialmente replicati indotto dall'attività di *CDK* e viene detto compattazione cromosomica prematura.

Il destino dei cromosomi nei micronuclei Le aberrazioni cromosomi acquisite nei micronuclei possono essere reincorporate nel genoma. La maggior parte dei micronuclei sono stabilmente mantenuti durante l'interfase e nonostante alcuni micronuclei possono essere estrusi non ne sono stati individuati dall'esperimento. I micronuclei non erano degradati, non co-localizzano con i lisosomi e non si fondono con il nucleo primario, ma dopo la rottura della membrana nucleare alcuni micronuclei possono unirsi ad altri cromosomi mitotici ed essere distribuiti alle cellule figlie. Si mostra pertanto come i micronuclei persistono in diverse generazioni e che il cromosoma contenuto in esso può essere segregato nei nuclei delle cellule figlie. Pertanto riarrangiamenti del DNA e mutazioni nei micronuclei possono essere incorporati nel genoma di una cellula. Questo meccanismo potrebbe giustificare il fenomeno della cromotripsia.

Cromotripsia La cromotripsia è stata scoperta sequenziando il genoma delle cellule tumorali ed è definita da cambi del numero di copie del DNA in piccola scala e riarrangiamenti intracromosomiali ristretti a un singolo cromosoma o a un suo braccio. Sono stati proposti due modelli non esclusivi per la cromotripsia:

- La frammentazione di un cromosoma seguita da riunione attraverso unione di terminazioni non omologhe.
- La replicazione del DNA aberrante risultante in stalli della forcella e cambio di stampo o replicazione indotta da rotture e mediata da micro-omologie.

Cromotripsis causata dal danno del DNA nei micronuclei

La cromotripsis è caratterizzata da riarrangamenti genomici estensivi e un pattern oscillante di numero di copie di DNA ristretti a uno o più cromosomi. Il meccanismo non è conosciuto ma potrebbe essere causato dall'isolamento di un cromosoma nei micronuclei. Nell'esperimento si dimostra come il meccanismo della cromotripsis può coinvolgere la frammentazione e il riasssemblaggio di un singolo cromatide da un micronucleo. Studi del genoma del cancro mostrano come esistano eventi di mutazione che generano mutazioni tutte in una volta durante un singolo ciclo cellulare. Un esempio di questo è la cromotripsis, dove avviene un pattern unico di riarrangamenti raggruppati coinvolgendo uno o pochi cromosomi. Si dimostra attraverso imaging di singole cellule con analisi "Look-Seq" come la formazione di micronuclei può generare uno spettro di riarrangamenti cromosomiali complesso, fornendo la prova per un meccanismo che porta alla cromotripsis.

Strategia look-seq Per determinare le conseguenze genomiche del danno al DNA nei micronuclei si prendono cellule non trasformate *RPE-1* sincronizzate dal rilascio di nocodazolo e poste in piastre a pozzetti. Si identificano i pozzetti contenenti una singola cellula micronucleata. Attraverso imaging delle cellule in vivo si identificano le cellule dove la membrana micronucleare si è rotta dopo l'inizio della fase *S*. Questi esperimenti sono stati utilizzando dopo attraverso eliminazione di *p53* attraverso *siRNA*. Dopo una divisione della cellula micronucleata si selezionano le figlie senza micronuclei indicando che il cromosoma micronucleare è stato reincorporato nel nucleo primario. Le cellule sono state selezionate in quanto la rottura disattiva processi di replicazione e trascrizione del DNA. Le cellule figlie sono state successivamente separate, amplificate (multistrand displacement amplification, *MDA*), sequenziate ed analizzate indipendentemente.

Destino dei cromosomi

Caso 1 Il cromosoma in ritardo viene correttamente segregato ma partizionato in un micronucleo in una cellula figlia. Il cromosoma in esse viene sotto replicato e segregato risultando in un rapporto tra le figlie di questa di 2 : 1.

Caso 2 Il cromosoma in ritardo è mal segregato in un micronucleo in una cellula figlia. Il cromosoma è sotto replicato e segregato asimmetricamente, risultando in un rapporto tra le figlie di questa di 3 : 2.

Conclusioni La segregazione mitotica errata può essere altamente mutagenica, con importanti implicazioni per come questi errori e le aneuploidie potrebbero aver contribuito al cancro o altre malattie umane. La cromotripsis è presente in una piccola percentuale di cancro umani e altri disordini congenitali, ma il tasso di cromotripsis è probabilmente più alto in quanto la maggior parte di questi eventi compromettono il fitness cellulare e potrebbero essere individuati solo da un'analisi unicellulare. I micronuclei potrebbero pertanto essere un'importante fonte di variabilità genetica.

Endoreplicazione, la poliploidia con uno scopo

Si nota come un aspetto interessante della diversità dei tipi cellulari è che molte cellule negli organismi diploidi sono poliploidi. Questo evento si dice endoploidia ed è essenziale per il normale sviluppo e fisiologia di molti diversi organismi. Si studiano come sia piante ed animali usino varianti del ciclo cellulare o endoreplicazioni risultando in cellule poliploidi che supportano specifici aspetti dello sviluppo. L'endoploidia può inoltre avvenire in risposta a certi stress fisiologici e come può

portare allo sviluppo di tumori. I fattori che contribuiscono all'endoreplicazione sono stress esterno, crescita e differenziazione. Può essere indotta inoltre per creare una catastrofe mitotica alle cellule tumorali che causa endomitosi e sopravvivenza della cellula e una de poliploidizzazione che porta a una proliferazione mitotica.

Meccanismi di endoreplicazione

Endociti Gli endocicli sono definiti come cicli cellulari consistenti di una fase *S* e *G* senza la divisione cellulare. Le cellule endociclianti non entrano in mitosi: non condensano i cromosomi e non rompono la membrana nucleare. I tricomi sorgono dalle cellule poliploidi che possono essere trovate sulla superficie di tessuti di piante.

Rereplicazione La rereplicazione risulta da regolazione aberrante in cui la sintesi del DNA è iniziata multiple volte a origini di replicazione individuali durante una singola fase *S*. Questo risulta in una crescita del contenuto del DNA.

Endomitosi Durante l'endomitosi le cellule entrano in mitosi e iniziano a condensare i cromosomi senza segregarli ma invece rientrando in uno stato simile a G_1 e dopo la fase *S*. I megacariociti usano endomitosi durante la maturazione portando a una struttura nucleare globulata da cui gemmano coaguli che promuovono trombociti.

Esempi di tessuti endociclianti

Embrione vegetale Un embrione vegetale consiste di una capsula del seme che copre l'endosperma e circonda e fornisce nutrienti per i cotiledoni crescenti e per l'ipocotile dell'embrione. Le cellule sospensore sorgono dalla divisione asimmetrica dell'uovo fertilizzato e connettono l'embrione all'endosperma.

Ovarie della Drosophila Le ovarie della *Drosophila* consistono di 12 – 15 ovaroli che contengono una serie di camere uovo in sviluppo. Il germarium porta le cellule staminali della linea germinale e somatiche che si differenziano in cellule infermiere e oociti e in cellule del follicolo rispettivamente. Le seconde fanno endocicli durante l'oogenesi in risposta a segnalazione di Notch che sottoregola gli stimolatori della mitosi e attiva i suoi inibitori.

TGC dei roditori Le TGC dei roditori sono altamente poliploidi e facilitano l'impiantamento dell'embrione contribuendo all'invasione della parete uterina.

Ipocotile L'ipocotile vegetale subisce endocicli per crescere rapidamente al di sopra del suolo. L'endoreplicazione si ferma una volta che la pianta raggiunge il sole.

Regolazione dell'endociclo della Drosophila Un complesso vettore di controlli assicura l'unicità della replicazione durante la progressione endociclica. I fattori principali sono indicati nell'immagine in rosso quando inattivi e in verde quando attivi rispettivamente nella fase *S* e *G*. Il controllo di *CycE/Cdk2* forma il nucleo della regolazione endociclica: insieme a *CycE* hanno attività bassa durante la fase *G* quando *APC/C^{fzr/cdh1}* reprime l'accumulo di *Geminin* permettendo la formazione di *pre-RC*. La stimolazione da parte di *E2F* della trascrizione *CycE* porta all'attivazione di

CycE/Cdk2 e l'iniziazione della replicazione del DNA che causa la distruzione di *E2F1*. *CycE/Cdk2* reprime la formazione di *pre-RC* e inattiva *APC/C^{fr/cdh1}* che permette un accumulo di *Geminin* che inibisce la formazione di *pre-RC*.

Varianti dell'endociclo Poliploidia somatica può accadere da abbreviazioni del ciclo cellulare, in cui diverse fasi del ciclo sono saltate o causano l'uscita dal ciclo cellulare.

Il modello della soglia a *CDK* Questo modello è stato proposto per la fissione del lievito e poi esteso alle cellule animali si proponeva come l'iniziazione della fase *S* ed *M* sono causate da diverse soglie di attività della chinasi dipendente da ciclina *CDK*. Questa viene attivata durante la fase *S* da cicline di tipo *E* od *A* e per la fase *M* di tipo *A* o *B* complessate rispettivamente con *CDK2* e *CDK1*. Nelle cellule endociclianti la soglia per la fase *S* è periodicamente raggiunta, mentre durante la mitosi si trova un basso livello di *CDK*.

2.3 Meiosi

Gli organismi superiori si riproducono mediante l'unione di due cellule sessuali specializzate i gameti (aploidi) che si uniscono a formare un'unica cellula: lo zigote (diploide). I gameti sono prodotti nelle gonadi (testicolo e ovaio) a partire dalle cellule germinali. Se i gameti avessero lo stesso numero di cromosomi delle cellule del genitore che lo produce allora lo zigote avrebbe un numero doppio di cromosomi, raddoppiamento che si verificherebbe ad ogni generazione. Il mantenimento del numero costante di cromosomi è assicurato da un processo di divisione cellulare "riduzionale" detto meiosi. Durante la meiosi una cellula diploide va incontro a 2 divisioni cellulari (prima e seconda divisione meiotica) producendo potenzialmente 4 cellule aploidi.

2.3.1 Meiosi 1

Durante la prima meiosi i membri di ogni coppia di cromosomi omologhi prima si uniscono e poi si separano e vengono distribuiti in nuclei distinti (divisione riduzionale).

Profase I

La profase viene divisa a sua volta in due fasi.

Profase I intermedia I cromosomi iniziano a condensarsi e si forma il fuso.

Profase I tardiva I cromosomi omologhi si appaiano, si verifica il crossing-over e la membrana nucleare si disgrega.

Metafase I

Le coppie di cromosomi omologhi si allineano lungo la piastra metafasica.

Anafase I

I cromosomi omologhi si separano muovendosi verso i poli opposti.

Telofase I

I cromosomi giungono ai poli del fuso e il citoplasma si divide.

2.3.2 Meiosi 2

Durante la seconda meiosi i cromatidi che costituiscono ciascun cromosoma omologo si separano e vengono distribuiti ai nuclei delle cellule figlie (divisione equazionale). Si producono così alla fine quattro cellule aploidi.

Profase II

I cromosomi si condensano nuovamente.

Metafase II

I singoli cromosomi si allineano lungo la piastra equatoriale.

Anafase II

I cromatidi fratelli si separano spostandosi verso i poli opposti.

Telofase II

I cromosomi giungono ai poli del fuso e il citoplasma si divide.

2.3.3 Confronto con mitosi

I processi di base della meiosi sono simili a quelli della mitosi a netto di:

- La meiosi comporta 2 successive divisioni nucleari e citoplasmatica con potenziale produzione di 4 cellule.
- Nonostante le due divisioni il DNA subisce una sola duplicazione durante l'interfase che precede la divisione meiotica.
- Ognuna delle 4 cellule prodotte contiene un numero aploide di cromosomi, un solo esemplare di ogni coppia di omologhi.
- Durante la meiosi l'informazione genetica che proviene da entrambi i genitori viene mescolata in maniera casuale in modo che ogni cellula possieda una combinazione di geni potenzialmente unica.

2.3.4 Crossing-over

Il fenomeno di crossing-over è l'evento di ricombinazione meiotica. Durante la meiosi un'induzione programmata di rotture a doppio strand di DNA (*DSB*) che porta allo scambio di materiale tra cromosomi omologhi. Questi scambi portano ad un aumento della diversità genomica e sono essenziali per la segregazione corretta alla prima divisione meiotica. Si trova un controllo molecolare della distribuzione dei *DSB* meiotici in mammiferi da un gene che si evolve rapidamente contenente un dominio contenente *PR*: *PRDM9*. I siti di rottura sono determinati e si trovano altre molecole che si occupano dei processi di riparazione che hanno permesso di delineare i cammini di ricombinazione che portano a crossover e non-crossover con ruoli diversi nell'evoluzione genomica.

Organizzazione dei cromosomi e citologia durante la profase meiotica I

La profase meiotica *I* si divide in leptonema, zygonema, pachynema e diplonema. Si nota l'organizzazione dei cromosomi durante le varie fasi attraverso due cromatidi fratelli. La ricombinazione meiotica inizia con la formazione di *DSB* durante il leptonema ed è completata prima della fine del pachynema. La synapsi è iniziata durante il zygonema durante il quale entrambe le terminazioni dei cromosomi sono attaccate alla membrana nucleare. La transizione da leptonema a zygonema viene detto stage a bouquet in cui i telomeri si raggruppano lungo un polo nucleare.

Meccanismo di crossing over

Il crossing over inizia con una *DSB* ad un sito specifico individuato da *PRDM9* che media la rottura e recluta *SPO11* che permette la ricombinazione meiotica. Alla fine si trova un cromatide separato con rottura asimmetrica che compie una strand invasion. A seguito dell'invasione si possono trovare due intermedi: uno di crossover e uno di non crossover. Il primo viene risolto andando a sostituire nei due cromatidi fratelli la sequenza successiva alla rottura, il secondo un gene del cromatide non rotto si trova su quello che è stato rotto. L'evento di crossover può essere individuato unicamente se differiscono in marcatori genetici.

Modello del ruolo di *PRDM9* nella localizzazione meiotica di *DSB*

La proteina PR domain binding 9 si lega a un motivo di DNA specifico attraverso vettori di zinc finger *C2H2*. In seguito il dominio *PR/SET* promuove la trimetilazione della lisina 4 sull'istone *H3* sui nucleosomi adiacenti. La Krüppel-associated box *KRAB* potrebbe portare interazioni con altre proteine. Questi passi e altri permettono il reclutamento del macchinario di *DSB* insieme alla proteina di ricombinazione meiotica *SPO11*.

Struttura e funzione di *PRDM9* La proteina *PRDM9* è un iston-metiltrasferasi che consiste di tre regioni principali: una *N* terminale che contiene un dominio Krüppel-associated box *KRAB* e un dominio repressore *SSX SSXRD*, poi si trova un dominio *PR/SET* circondato da una *pre-SET* zinc knuckle e un *post-SET* zinc finger. Si trova un lungo vettore di zinc finger *C2H2* *C* terminale. Si trovano diverse varianti della proteina che è in grado di evolvere rapidamente. Il dominio *PR/SET* è circondato da zinc knuckle e finger in quanto potrebbero contribuire al legame con substrato e cofattore o essere coinvolti con l'interazione di altre proteine.

PRDM9 organizza gli hotspot dei nucleosomi e limita la migrazione delle giunzioni di Holliday

Nei mammiferi la ricombinazione genica durante la meiosi è limitata a un piccolo insieme di regioni di 1-2 kilobasi dette hotspots. La loro locazione è determinata dai domini di zinc finger di *PRDM9* che lega il DNA e trimetila l'istone *H3*. Questo prepara ad una *DSB* e scambio reciproco di DNA tra cromatidi formando giunzioni di Holliday. Si nota come il legame con *PRDM9* riorganizza i nucleosomi in pattern simmetrici creando una regione estesa senza nucleosomi. Queste regioni sono centrate da un motivo legante a *PRDM9*. Si nota anche come *DSB* si trovi al centro di queste regioni. Pertanto combinando questi risultati si trova che il crossing-over è ristretto a regioni marcate da *H3K4me3*.

Capitolo 3

Mendel

3.1 Vita

Si noti come Mendel costruisce i suoi esperimenti senza sapere che cosa fossero i geni e che controllano i caratteri, che sono localizzati sui cromosomi e che le cellule hanno la possibilità di segregare i cromosomi attraverso meiosi. Mendel non parte da zero ma è un uomo del suo tempo e beneficia della cultura del tempo: anche in famiglia è a contatto con una tradizione di chi lavorando sui campi tenta di migliorare la produzione incrociando le piante. Mendel nasce nel 1822 in Repubblica Ceca, in un piccolo villaggio, centro agricolo. Nasce da una famiglia non molto agiata di contadini, in un ambiente dove l'ibridazione fra piante è pane quotidiano. Viene suggerito alla famiglia di farlo studiare nel ginnasio dove avrà dei buoni risultati e quando dovrà spostarsi per poter accedere all'università si trova in un ambiente difficile e da questa esperienza torna e decide di entrare nel 1843 in un convento di Agostiniani, studiosi che abitavano in un convento a Brno ed erano ben visti per la loro competenza. Non ha successo come insegnante. Conosceva molto la sistematica e la nomenclatura e descrizione delle forme viventi con il sistema di Linneo e aveva idee radicali sul concetto di ereditarietà. Completa i suoi studi e prende i voti nel 1847. L'abate gli permette di continuare gli studi facendolo spostare a Vienna all'università. Mendel matura l'interesse per dimostrare di trovare delle regole nell'analisi dei fenotipi di piante che vengono incrociate in modo opportuno per trovare la comparsa di varianti. Mendel inizia gli esperimenti incrociando topi per cercare di capire se poteva trovare qualche pattern, ma viene scoraggiato dall'abate. Come seconda scelta lavora sulle piante. Ultimati questi esperimenti viene scritta "Esperimenti nell'incrocio delle piante" dove Mendel racconta le sue scoperte dove viene pubblicato il suo articolo che non ha una grossa diffusione. Le scoperte di Mendel rimangono nascoste per alcuni anni. Mendel per discutere della sua scoperta con le persone più influenti scrive a Nägeli per intavolare una discussione e continuare la sua opera. Lo scambio di lettere è molto saltuario. Nägeli dice a Mendel di ricreare l'esperimento con un altro modello sperimentale e suggerisce di usare un modello senza la tendenza di generare ibridi. In parte anche per questo Mendel abbandona l'attività sperimentale anche perché diventa responsabile del monastero e avrà interazioni difficili con l'autorità locale.

3.1.1 Esperiment

L'approccio vincente di Mendel è quello di aver costruito l'esperimento con pazienza scegliendo il modello sperimentale: prova prima con più piante e alla fine sceglie il pisello da giardino. Inizia a selezionare i caratteri da investigare per valutare cosa succede durante gli incroci. È un lavoro

metodico che necessita di alcuni anni: scarta diverse caratteristiche fino ad arrivare a 7. Mendel seleziona il colore, forma e rivestimento del seme, colore e forma del baccello, colore e forma del baccello e altezza del fusto. La pianta è comoda in quanto gli stami e le antere sono confinati in un astuccio, nonostante la pianta tende a fare autofecondazione, Mendel può tagliare le antere prima che maturi il polline e poi andare a fecondare manualmente in modo da realizzare l'incrocio desiderato. La prima cosa che Mendel scopre è che un carattere è dominante e l'altro recessivo: la forma del seme liscia viene detta dominante rispetto alla forma rugosa per esempio. I primi esperimenti si occupano dell'incrocio di piante che differiscono per una sola caratteristica. Le piante da cui Mendel parte devono essere linee pure: autofecondate per diverse generazioni in modo da dimostrare che tutta la progenie abbia il fenotipo scelto. Mendel introduce le lettere del linguaggio mendeliano ancora in utilizzo. La lettera maiuscola determina il carattere dominante. Oltre a preparare il sistema sperimentale genera esperimenti con numerologia significativa. Nel primo esperimento scopre pertanto che una delle due caratteristiche è dominante: nella generazione F_1 generata dall'ibridazione la popolazione torna omogenea e presenta una sola caratteristica. Mendel conduce gli esperimenti fino a che fosse necessario per chiarire l'ipotesi: si deve superare la prima generazione per capire dove finisce il fenotipo recessivo: si autofeconda F_1 e riappare il carattere recessivo e contando i numeri si rende conto che il rapporto tra carattere dominante e recessivo approssima il 3 : 1. Dopo questo comincia a combinare caratteri, con incroci che coinvolgono due fenotipi e riesce di nuovo a stabilire delle regole di segregazione: nella F_1 rimangono visibili solo i fenotipi dominanti e nella F_2 ricompaiono i caratteri recessivi in combinazioni non presenti nella linea parentale: i caratteri segregano e sono collegati a qualcosa che si separa e si assortiscono e nota come l'assortimento sia indipendente.

3.1.2 L'eredità Mendeliana

La scoperta di Mendel rimane sepolta in qualche biblioteca ma viene riscoperta verso il 1900 quando si vede la comparsa nella letteratura scientifica del nome di Mendel e delle sue scoperte grazie a De Vries, Tschermak e Correns che fanno esperimenti di ibridazione citando Mendel. De Vries inoltre deduce che nuove varianti possono essere generate dai mutanti grazie ai quali si può generare l'evoluzione. Correns che lavora a Tübingen, studente di Nägeli che riprende il suo lavoro. Si aggiungono ad essi Bateson e Punnett, il primo è quello che fa più degli altri traducendo l'articolo di Mendel in inglese e diffonde il suo lavoro, il secondo lo affianca e sostituisce creando i quadrati di Punnett che consente di prevedere la formazione di gameti e il fenotipo di una generazione. Viene scoperta anche un'eccezione.

3.2 Principi mendeliani

3.2.1 Primo esperimento

Si parte da due caratteristiche diverse: seme rotondo e grinzoso. Si vuole studiare cosa succede incrociando i fenotipi nella progenie. Lo sperimentatore separa polline dalla parte femminile, lo prende dalla pianta con la caratteristica che ha scelto. Guardando il fenotipo del seme non si deve aspettare molto: si aprono i baccelli e si osserva. Non si può prendere una pianta a caso ma deve essere una linea pura omogenea e si può fare l'incrocio. La generazione P o parentale sono le linee pure che vengono incrociate. La prima generazione o F_1 presenta una progenie omogenea con semi lisci. Le piante poi vengono lasciate libere di autofecondarsi e si osserva poi F_2 e si nota come la caratteristica grinzosa non era scomparsa ma ancora presente, inoltre si deduce con una proporzione come i semi rotondi e grinzosi stanno in rapporto 3 : 1. Mendel comincia a pensare che i caratteri

siano legati a fattori discreti ma comincia ad usare un simbolismo attraverso lettere: una linea pura con fenotipo dominante e in omozigosi RR e per l'altra linea pura con fenotipo rugoso rr . La prima ipotesi di Mendel, per noi formazione di gameti attraverso la meiosi, è che i caratteri discreti alla base del fenotipo si separano durante la formazione di una nuova generazione e nella fecondazione singole lettere si incontrano: le piante F_1 saranno tutte eterozigoti Rr , la dominanza fa sì che tutti i semi abbiano fenotipo liscio, autofecondando F_1 , la produzione attraverso la separazione di alleli. Pertanto nella fecondazione di due eterozigoti si hanno tre possibilità: RR , Rr e rr . Gli eventi sono equiprobabili e sommando per fenotipo si ha un rapporto 3 : 1

Reinterpretazione in tempi moderni

Con la cellula diploide e due cromosomi omologhi, eterozigote per il gene legato al carattere forma del seme. Questa cellula può andare incontro a meiosi per formare nuovi gameti e per farla, si duplica il DNA, i cromosomi sono composti da due cromatidi fratelli con 4 lettere, la cellula viene divisa meioticamente: vengono separati i due omologhi e poi i cromatidi fratelli formando cellule aploidi con solo un cromosoma e una lettera. Partendo da un'eterozigote si formano cellule aploidi in pari numero dominanti e recessivi, vero anche se avviene un crossing-over meiotico che scambia porzioni dei cromatidi non fratelli.

Quadrati di Punnet

Ipotesi di Mendel

Ci sono dei fattori responsabili della trasmissione ereditaria dei caratteri e sono unità discrete (geni) che compaiono in coppie, esistono in forme alternative e si separano (segregano) durante la formazione dei gameti. Le piante possono avere due alleli equivalenti (omozigoti) o due alleli diversi: uno dominante e uno recessivo (eterozigoti). Mendel conclude che facendo l'incrocio tra individui che differiscono per un solo carattere possono differire solo per una coppia di alleli e se si hanno delle linee pure AA e aa la progenie F_1 sarà obbligatoriamente eterozigote Aa . Facendo autofecondare F_1 $Aa \times Aa$ si può ottenere F_2 dove si ritrova il fenotipo scomparso in proporzione di $\frac{1}{4}$ e il resto presenta fenotipo dominante di classe omozigote AA ed eterozigote Aa .

3.2.2 Reincrocio

Un altro incrocio di Mendel: si ha un problema con una pianta che mostra il fenotipo dominante si può non essere sicuri di avere una linea pura omozigote. Per chiarire se la pianta è omozigote od eterozigote il fenotipo non ci può aiutare, Mendel si inventa un incrocio: incrocio di controllo o reincrocio: si prende una pianta a fenotipo dominante e genotipo non noto e incrociarla con una pianta a fenotipo recessivo. Osservando il risultato e la proporzione della progenie si nota il fenotipo della pianta di controllo.

3.2.3 Secondo esperimento

Il secondo esperimento è l'incrocio tra due coppie di caratteri. La generazione parentale presenta omozigosi di due tratti: giallo e liscio $RRYY$ e l'altra è verde e rugoso $rryy$. La pianta con il fenotipo dominante e linea pura si separano le coppie di elementi discreti RY e il fenotipo recessivo ry . Questi gameti vengono fatti reincontrare e F_1 possiede un genotipo $RrYy$ con fenotipo dominante giallo liscio. L'esperimento continua e si autofeconda F_1 creando F_2 . Si formano diversi gameti: RY , Ry , rY , ry . Non si sa se R e Y si muovono in modo causale o con delle regole precise, non si sa se si

formano davvero o con la stessa proporzione. Aprendo il baccello si nota che si trovano semi gialli e lisci $R - Y -$, gialli e rugosi $rrY -$, verdi e lisci $R - yy$ e verdi e rugosi $rryy$. Si nota la comparsa di fenotipi che non si trovavano nella linea parentale. Si dimostra come si assortiscono in modo casuale le coppie di caratteri diversi e i numeri dicono che il processo è casuale: $\frac{9}{16}$ giallo e liscio, $\frac{3}{16}$ per giallo e rugoso e verde e liscio e $\frac{1}{16}$ per verde e rugoso. Si nota come i geni stanno sui cromosomi e la coppia allelica Yy sta su un cromosoma e quella Rr un altro e l'assortimento indipendente è il movimento indipendente del movimento dei cromosomi.

Assortimento indipendente

È vero che ci si deve sempre aspettare assortimento indipendente. Se i geni sono sullo stesso cromosoma ci si aspetta che siano ereditati insieme.

3.3 Comprensione molecolare degli esperimenti di Mendel

L'identificazione dei geni responsabili per i tratti di studio di Mendel richiedono dimostrazione che:

- Alleli diversi devono essere responsabili di variazione morfologica.
- La differenza tra alleli è legata a una di DNA.
- I prodotti proteici tra diversi alleli hanno diversa struttura e funzione.
- Le differenze funzionali tra le varianti di proteine hanno effetto sulle variazioni morfologiche.

3.4 Esempi di tratti mendeliani nell'uomo

3.4.1 Definizioni

- Ogni cromosoma è costituito da una successione lineare di geni o loci.
- Ogni coppia di cromosomi contiene gli stessi geni nello stesso ordine ma non necessariamente in forma identica.
- Il locus è la posizione occupata da un gene su un cromosoma.
- Gli alleli sono forme diverse di uno stesso gene.
- Il genotipo è la costituzione genetica di un individuo, è riferito sia ad un singolo gene che al loro insieme.
- Il fenotipo è la manifestazione fisica di un carattere genetico che dipende dal genotipo specifico e dalla sua interazione con l'ambiente.
- Un carattere è una caratteristica di un organismo rilevabile con un qualsiasi mezzo di indagine.

3.4.2 Beta-Talassemia

La beta-talassemia può essere causata da mutazioni in omozigosi o eterozigosi-composta nel gene della beta-globina 11p15. Può originarsi dalla delezione dell'intero cluster di geni della beta-globina o delle sequenze 5' dal cluster o regione di controllo del locus beta.

Descrizione

La beta-talassemia è caratterizzata da una produzione ridotta dell'emoglobina A (HbA , $\alpha-2/\beta-2$), che risulta in sintesi ridotta delle catene di beta-globina rispetto a quelle di alfa-globina causando uno sbilanciamento e eritropoiesi anormale. Il disordine è clinicamente eterogeneo. L'assenza di beta-globina causa beta-zero-talassemia, mentre ridotte quantità di beta-globina individuabile causa beta-più-talassemia. La beta-talassemia si divide in talassemia maggiore (dipendente dalle trasfusioni), intermedia e minore (asintomatica). La diversità fenotipica riflette l'eterogeneità delle mutazioni al locus HBB , l'azione di molti modificatori secondari e terziari e un grande intervallo di fattori ambientali.

Caratteristiche cliniche

Talassemia maggiore Infanti affetti da talassemia maggiore non si sviluppano correttamente e sono pallidi con problemi di diarrea, irritabilità, numerosi episodi di febbre e allargamento dell'addome causato da splenomegalia. Attraverso trasfusioni crescita e sviluppo sono normali fino a 10 o 11 anni, successivamente gli individui sviluppano rischi legati al sovraccarico di ferro imposto dalle trasfusioni.

Talassemia intermedia Pazienti con la talassemia intermedia subiscono effetti eterogenei: pallore, allargamento di ittero, fegato e milza, cambi scheletrici da moderati a severi, ulcere nelle gambe, masse extramidollari di midollo eritroide, una tendenza a sviluppare osteopenia e osteoporosi. Le trasfusioni non sono richieste e il sovraccarico di ferro accade principalmente dal suo assorbimento aumentato causato da eritropoiesi inefficace.

Talassemia minore I portatori di beta-talassemia sono clinicamente asintomatici.

Caratteristiche geniche La coeredità di alfa-talassemia con omozigote beta-talassemia risulta in un miglioramento della beta-talassemia. Inoltre la beta-talassemia eterozigote è associata con manifestazioni cliniche severe quando coereditata con un gene di alfa-globina in più: in ognuno dei 5 casi un cromosoma 16 trasportava 3 geni di alfa-globina. Lo stesso aggravamento si trova con loci alfa triplicati (esempio di interazione genica).

Cluster genici della globina

Esistono diversi geni della globina, prodotti durante diversi stadi della vita di un individuo. Questi si trovano raggruppati in cluster su diversi cromosomi:

Cromosoma 11 Globina epsilon ϵ , gamma γ G e A a formare $Hb F$, delta δ a formare $Hb A_2$ e beta β a formare $Hb A$.

Cromosoma 16 Globina zeta ζ 2, zeta ζ 1, alfa α 2 e alfa α 1.

Composizione emoglobina L'emoglobina è un tetramero formato da due subunità proveniente dal cromosoma 11 e due dal cromosoma 16. La composizione varia in base allo stato di sviluppo:

- Embrionica: $\zeta\zeta\epsilon\epsilon$, $\alpha\alpha\epsilon\epsilon$ o $\zeta\zeta\gamma\gamma$.
- Fetale: $\alpha\alpha\gamma\gamma$ (HbF).

- Postnatale: $\alpha\alpha\delta\delta$ (HbA_2) o $\alpha\alpha\beta\beta$ (HbA).

Formazione del cluster genico Probabilmente il gene cluster si è originato da un gene primordiale della globina che si è duplicato formando nel cromosoma 22 il gene della mioglobina e un gene precursore della α/β -globina. Quest'ultimo si è poi duplicato e diviso nel gene primordiale della α -globina e della β -globina. Questi due poi sono successivamente andati incontro a duplicazioni multiple che hanno portato la formazione dei cluster genici rispettivamente nei cromosomi 16 e 11.

Gestione clinica

Trattamento con 5-azacitidina Nel 1982 la beta-più-talassemia è stata trattata in un uomo di 42 anni con 5-azacitidina. Si è registrato un aumento di concentrazione di emoglobina. Si nota l'ipometilazione della γ -globina e della ϵ -globina oltre a un aumento di mRNA per γ -globina.

Trapianto di midollo Lo studio di pazienti a cui era stato svolto il trapianto del midollo *BMT* per la cura della talassemia. Il midollo allogenico proveniente da donatori *HLA*-identici e i pazienti avevano β -talassemia ed erano sotto i 16 anni. Conclusero che il trapianto di midollo offriva un'alta probabilità di sopravvivenza senza complicazioni se il recipiente non soffriva di epatomegalia o di fibrosi portale.

Terapia genica La terapia genica per la β -talassemia è difficile in quanto richiede produzione massiva di emoglobina in maniera specifica al lignaggio e dalla mancanza di vantaggio selettivo per le cellule staminali ematopoietiche corrette. In ogni caso dopo la terapia un paziente è diventato indipendente dalle trasfusioni e la maggior parte dei benefici deriva da un clone cellulare a base mieloide dominante. Viene suggerito che la dominanza clonale che accompagna l'efficacia può essere coincidentale e stocastica o il risultato da un espansione di una cellula benigna causata dalla mal-regolazione del gene *HMG2* in cellule staminali o progenitrici.

Background La disponibilità dei donatori e i rischi del trapianto limitano il suo uso nei pazienti, pertanto dopo aver stabilito che il trasferimento lentivirale di un gene di β -globina marcato potrebbe sostituire la trasfusione di pazienti affetti da β -talassemia si vuole valutare la sicurezza ed efficacia della terapia genica nei pazienti.

Metodi Nello studio si ottengono cellule mobilizzate autologhe *CD34+* da pazienti e si trasducono le cellule in vivo con il vettore LentiGlobin *BB305* che codifica l'emoglobina adulta *HbA* con una sostituzione amminoacida. Le cellule sono state reinfuse nel paziente. Si monitorano poi gli effetti avversi, l'integrazione del vettore e i livelli di replicazione del lentivirus.

Risultati Dopo un intervallo di 26 mesi tutti i pazienti tranne uno hanno smesso di ricevere trasfusioni e i livelli di emoglobina erano vicini al normale. La terapia genica ha pertanto eliminato la necessità di trasfusioni a lungo termine senza eventi avversi importanti.

Trattamento con CRISPR *CTX001* è una terapia in ex vivo in cui cellule autologhe sono raccolte dal paziente, CRISPR applica poi la tecnologia di editing genomico alle cellule per fare un cambio genetico progettato per aumentare l'aumento di livelli di emoglobina fetale. Le cellule sono poi reinfuse e dovrebbero produrre cellule di globuli rossi con emoglobina fetale nel paziente superando le deficienze di emoglobina. L'edit di CRISPR crea una delezione in *BCL11A* che codifica

un fattore di trascrizione che altrimenti reprime la sintesi di emoglobina fetale. Questa terapia è efficace anche contro l'anemia falciforme.

Genetica della popolazione

La β -talassemia è uno dei disordini recessivi e autosomiali più comuni. È prevalente nelle popolazioni di mediterraneo, medio oriente, transcaucaso, Asia centrale, subcontinente indiano e l'est. È comune in popolazioni di discendenza africana.

3.4.3 Anemia falciforme

Descrizione

L'anemia falciforme è una malattia multisistema associata con episodi di malattia acuta e danno agli organi progressivo. La polimerizzazione dell'emoglobina che porta alla rigidità dell'eritrocita e all'occlusione dei vasi è centrale nella fisiopatologia della malattia. La causa più comune è una variante di *HbS* con la malattia di emoglobina *SS* prevalente negli africani.

Caratteristiche cliniche

L'anemia falciforme comporta tosse, sudore notturno, dolori nelle gambe e nelle articolazioni, dolori addominali, poco appetito e fatica. Si mostra una correlazione tra tensione dell'ossigeno e la forma a falce dei globuli rossi. La forma diventa più pronunciata con bassa pressione dell'ossigeno e le grandi aggregazioni delle cellule viste nei capillari e negli organi riflettono una bassa tensione dell'ossigeno che porta alla morte. I pazienti che esprimono γ -globina tra il 10 e il 20% del livello di globina a falce hanno migliorato le prognosi cliniche. La sindrome di anemia falciforme prodotta da Antille *HbS* ha un fenotipo più severo rispetto a quella prodotta da *HbS*. Gli eterozigoti umani per *HbS* hanno globuli rossi che contengono il 40% *HbS* ma non esibiscono sintomi clinici, mentre gli eterozigoti per Antille *HbS* esibiscono sintomi clinici simili agli omozigoti. Questo in quanto *HbS* Antille è meno solubile e favorisce deossigenazione e polimerizzazione di Antille *HbS*. Gli eventi sono dovuti alla polimerizzazione della deossiemoglobina *S* quando i globuli rossi trasportano ossigeno. La cellule a falce possono bloccarsi nei capillari e causare dolori. Possono inoltre lisarsi e l'emoglobina legare ossido nitrico *NO* causando vasocostrizione. Possono inoltre essere fagocitate dai macrofagi causando anemia grave. Possono inoltre aderire all'endotelio causando infiammazione associata con leucocitosi neutrofila. La formazione di *HbS* è dovuta a una mutazione puntiforme di *GAG* in *GUG* che sostituisce un acido glutammico con una valina. In caso di genotipo *HbA/HbA* si ha un fenotipo normale, con *HbA/HbS* non si manifesta a livello clinico ma si trovano alcuni globuli rossi falciformi visibili, *HbS/HbS* presenta anemia grave con globuli rossi a falce.

Gestione clinica

Terapia genica La terapia genica per l'anemia falciforme coinvolge una singola infusione di midollo autologo derivato dalle cellule emopoietiche staminali *HSC CD34+* trasdotte con un vettore lentivirale contenente un ansa di RNA con target *BCL11A*. Questa terapia abbassa l'espressione di *BCL11A* che normalmente reprime la produzione di emoglobina fetale.

CRISPR per combattere l'anemia falciforme I ricercatori hanno mostrato del successo nel correggere la mutazione nei topi, ma l'applicazione umana è lontana anni, l'efficienza del processo è bassa per usi pratici.

Serendipity L'uso di idrossiurea per la prevenzione dell'avvenimento di infarti in bambini affetti da anemia falciforme può essere utilizzata nei paesi in via di sviluppo in quanto i costi di cura sono contenuti. L'uso di idrossiurea è associato con eventi avversi come neutropenia se utilizzata ad alte dosi. L'utilizzo di idrossiurea causa un aumento della concentrazione intracellulare di emoglobina fetale *HbF* che interferisce con la formazione del polimero di deossiemoglobina *S* e riduce la conta neutrofila riducendo lo stato di infiammazione cronico.

meccanismo di azione dell'idrossiurea L'obiettivo dell'idrossiurea è l'enzima ribonucleotidasi riduttasi e agisce come un radicale libero per i gruppi tirosile dell'enzima, essenziale per la sintesi di DNA. La sua inibizione causa un arresto nella fase *S* del ciclo cellulare. L'efficacia nel trattamento dell'anemia falciforme è associata all'abilità di aumentare i livelli di emoglobina fetale che diminuisce la concentrazione di *HbS* diminuendo la polimerizzazione dell'emoglobina anormale. Il meccanismo non è chiaro e potrebbe essere citotossica per i precursori eritroidi tardivi, un effetto che porta al reclutamento di precursori primordiali con una capacità maggiore di produrre *HbF*. Un altro meccanismo è che potrebbe riprogrammare i precursori tardivi per fargli produrre *HbF*. Alternativamente potrebbe interrompere i fattori di trascrizione che si legano a regioni promotrici intorno ai geni di globina alterando il rapporto tra *HbA* e *HbF*.

Resistenza alla malaria

Le cellule infettate da *falciparum malaria* sviluppano gobbe sulla superficie che le portano ad attaccarsi all'endotelio di capillari come quelli nel cervello. In questi siti avviene la falcificazione a causa della bassa concentrazione di ossigeno. Perforazione della membrana dei parassiti come risultato di stress fisico avviene con perdita di potassio. Inoltre la cellula infetta è più acida, aumentando il tasso di falcificazione. I parassiti intraeritrocitici si sviluppano più lentamente in eritrociti *HbF* che pertanto fornisce protezione dalla *plasmodium falciparum malaria* ritardando la crescita del parassita. Il meccanismo coinvolge la resistenza alla digestione da emoglobinasie malariali basata sulla super stabilità del tetramero *HbF*.