

Genetica

Giacomo Fantoni

Telegram: @GiacomoFantoni

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

5 ottobre 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
2	Mitosi e meiosi	9
2.1	Cromosomi e ciclo cellulare	9
2.1.1	Cromosomi	9
2.1.2	Ciclo cellulare	9
2.2	Mitosi	10
2.2.1	Fasi della mitosi	10
2.2.2	Attivazione della fase M	10
2.2.3	Eventi drammatici nella mitosi	11
2.3	Meiosi	15
2.3.1	Meiosi 1	15
2.3.2	Meiosi 2	16
2.3.3	Confronto con mitosi	16
2.3.4	Crossing-over	16

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 Shramm 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*.