

Genetica Molecolare

Anno accademico 2019/2020

Lezione 1

Intro

Al centro del corso ci saranno i meccanismi di mantenimento della stabilità del genoma.

Cellule batteriche possono essere trasformate con plasmidi, mediante un processo di ricombinazione del DNA.

La PCR è stata una invenzione fondamentale per gli studi sul DNA.

Nel 2001 è stato completato il sequenziamento del genoma umano. Si è entrati così nell'era post genomica, dove si esplorano le applicazioni del progetto genoma umano nel miglioramento della qualità della vita dell'uomo.

Le malattie genetiche sono patologie riconducibili a mutazioni del genoma. Possiamo distinguere:

- Malattie di tipo mendeliano, o monogeniche.
 - Sono dovute alla mutazione di un singolo gene.
 - Hanno un alto rischio di ricorrenza familiare e sono così facilmente identificabili dal fenotipo, specialmente quando la penetranza è completa.
- Malattie multifattoriali
 - Sono dovute alla mutazione di più geni
 - Gli individui affetti mostrano un fenotipo non omogeneo, perché l'espressione del fenotipo dipende dall'influenza da altri geni e dall'interazione con l'ambiente
- Malattie genetiche delle cellule somatiche
 - Le mutazioni che causano queste malattie non vengono ereditate ma insorgono in uno o più tipi cellulari del paziente. Il paziente può essere o meno predisposto allo sviluppo della patologia a causa di mutazioni preesistenti.

Dal progetto genoma si è visto che circa il 99,9% del genoma è condiviso tra gli individui, e solo lo 0,1% circa determina l'unicità dell'individuo. Queste sono spesso caratterizzate da SNPs, polimorfismi a singolo nucleotide.

Queste variazioni possono non avere alcun effetto, causare effetti innocui (ad esempio le differenze nell'aspetto degli individui) oppure predisporre o causare patologie.

Mutazioni puntiformi

Le mutazioni non comportano necessariamente un difetto, ma danno luogo alla variabilità all'interno della popolazione, che è un elemento assolutamente indispensabile per il successo evolutivo di una popolazione.

Avere variabilità nel genoma di una popolazione aiuta ad adattarsi ai cambiamenti dell'ambiente ed all'emergere di nuove patologie infettive.

Si è visto che in organismi con popolazioni a basso tasso di variabilità genetica non si ha rigetto delle cellule tumorali, e quindi i tumori si possono trasmettere orizzontalmente.

Un altro esempio degli effetti negativi dovuti alla mancanza di variabilità genetica è la banana. Nel sud-est asiatico ci sono principalmente due tipi di banana: *Musa balbisiana* e *Musa acuminata*.

La *Musa acuminata* è triploide ed il suo frutto non ha semi, quindi è utilizzata in agricoltura come pianta da frutto. La *M. acuminata* triploide è quindi sterile e va propagata mediante talea, quindi non si replica in natura.

La varietà Gros Michel era l'unico tipo di banana sul mercato fino al 1950-60, fino a quando il fungo *Fusarium oxysporum* ha determinato la scomparsa della varietà Gros Michel. Questa è stata rimpiazzata dalla varietà Cavendish, che è resistente all'infezione da parte di questo fungo.

Ora il fungo è mutato nella variante TR4, e la Cavendish non è più resistente. Si sta pensando quindi di usare l'ingegneria genetica con CRISPR per creare piante di banana resistenti al fungo.

Nell'uomo è stata stimata la variabilità all'interno di una popolazione di 2500 individui. Si sono stimate oltre 84 milioni di SNPs ed oltre 68.000 variazioni strutturali, quali delezioni, duplicazioni. Inserzioni ed inversioni.

Questi studi hanno permesso di individuare dalle 24 alle 30 rare mutazioni mendeliane in eterozigosi, quindi mutazioni recessive che non manifestano il fenotipo in eterozigosi. La soluzione alla diffusione di questo tipo di patologie è evitare matrimoni tra consanguinei.

Ogni giorno il nostro organismo subisce decine di migliaia di lesioni al DNA per ogni cellula. Una lesione al DNA non è una mutazione, ma è una situazione da cui la cella può ancora proteggersi grazie ai meccanismi di riparazione del DNA.

Difetti ai sistemi di riparazione del DNA causano diverse patologie, tra cui lo *Xeroderma Pigmentosum* (XP), malattia in cui non funziona il sistema di riparazione dei danni causati dai raggi ultravioletti (NER). Questi pazienti hanno un rischio molto aumentato (circa di 1000 volte) di sviluppare tumori.

La cancerogenesi è favorita dall'alto livello di danni al DNA che non vengono riparati, dando luogo a mutazioni le quali destabilizzano il genoma, creando un terreno fertile per lo sviluppo di tumori.

Lo sviluppo e l'evoluzione della vita sono legati ad un equilibrio tra tasso di mutazioni del genoma e meccanismi di riparazione. La il tasso di mutazione deve esserci per favorire variabilità genetica e flessibilità nell'adattamento all'ambiente, ma non deve essere eccessivo per non incorrere nello sviluppo di patologie.

Il cromosoma eucariotico

Il cromosoma in metafase ha un grado di condensazione estremamente elevato. Il cariotipo umano è formato da 23 cromosomi, di cui 22 cromosomi autosomici ed i cromosomi sessuali X ed Y. Per ciascun cromosoma esistono due copie, uno di origine materna ed uno di origine paterna, che dopo la duplicazione del DNA si trovano sdoppiati nei cromatidi fratelli.

Tutti gli autosomi hanno una numerazione, da 1 a 22, che dipende dalla grandezza del cromosoma e dalla posizione del centromero. I cromosomi sessuali X ed Y sono presenti entrambi nell'uomo, mentre due copie del cromosoma X, uno da ogni genitore, sono presenti nella donna.

Gli elementi fondamentali di un cromosoma eucariotico sono le regioni telomeriche, che sono complessi nucleoproteici composti da DNA e proteine che si trovano alle estremità dei cromosomi eucariotici, che sono cromosomi lineari.

Un cromosoma circolare non ha regioni telomeriche.

Il centromero è la parte del cromosoma che prende contatto con le fibre del fuso mitotico e permette la corretta segregazione dei cromosomi durante mitosi e meiosi.

Le origini di replicazione del DNA sono regioni specifiche permettono la replicazione del DNA cromosomico, e ve ne sono diverse in ogni cromosoma eucariotico. Dalla replicazione di un cromosoma se ne generano 2 identici, che sono i cromatidi fratelli. Ognuno dei cromatidi fratelli prenderà contatto con le fibre del fuso mitotico permettendone la segregazione.

Il DNA si associa a delle proteine, che sono gli istoni, per compattarsi fino a dar luogo alla cromatina che costituisce i cromosomi.

Un assetto cromosomico normale è detto euploide, e la ploidia è caratteristica di ogni organismo. L'uomo è diploide, mentre le banane commestibili sono triploidi. Il *Saccharomyces cerevisiae* può essere sia aploide che diploide. Una variazione del grado di ploidia non è compatibile con la vita nell'uomo, né in molti animali.

La variazione di ploidia è invece tollerata nelle piante. Le piante con una ploidia elevata sono spesso più vitali e producono più frutti.

Ciclo cellulare

Le cellule vanno incontro a varie fasi nella loro vita.

In fase G1 la cellula cresce e svolge il normale metabolismo. A questa segue la fase S in cui il DNA viene replicato. Nella fase G2 la cellula continua a crescere e si prepara alla mitosi. La fase M si suddivide in più sottofasi, quali la profase, metafase, anafase, telofase e citochinesi, che si conclude con la divisione della cellula in due cellule figlie.

Gli eventi chiave della fase S iniziano dalla doppia elica di DNA. I due filamenti si separano in più punti, che sono le origini di replicazione. Dalle origini di replicazione inizia la sintesi dei nuovi filamenti di DNA complementari ai filamenti stampo. Le eliche di neosintesi si congiungono man mano che la duplicazione procede, fino ad ottenere alla fine due doppie eliche identiche, formate ciascuna da un filamento stampo e da un filamento neosintetizzato. Questi sono i cromatidi fratelli, tenuti associati dalla coesina.

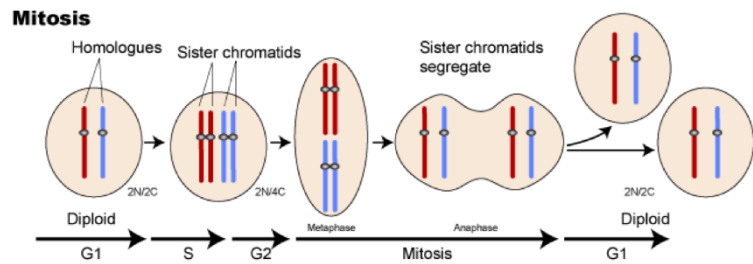
Durante la fase M i cromatidi fratelli, ciascuno attraverso il proprio centromero, prendono contatto con le fibre del fuso mitotico che si originano dal centro di organizzazione dei microtubuli. La coesina viene degradata dalla *separasi* e si ha la separazione dei cromatidi fratelli, che migrano con il fuso mitotico.

Mitosi

Partendo da una cellula diploide, avremo una coppia di cromosomi omologhi per ciascun cromosoma, uno derivato dal padre ed uno derivato dalla madre.

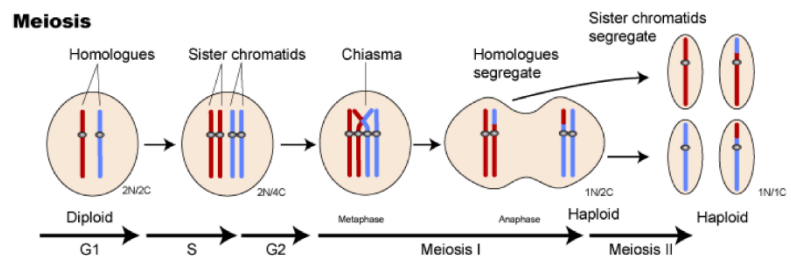
Durante la fase S questi cromosomi vengono duplicati dando luogo a due cromatidi, detti cromatidi fratelli, che restano inizialmente adesi al cromosoma originale grazie alla coesina ed altre proteine.

I cromatidi originati dalla duplicazione di ogni cromosoma si dispongono sulla piastra metafase, il centromero di ognuno prende contatto con le fibre del fuso mitotico, che permettono la separazione dei cromatidi fratelli, i quali vengono trasportati ai poli opposti della cellula in divisione. In questo modo si generano due cellule figlie che sono esattamente identiche alla cellula madre.



Meiosi

Partendo da una cellula diploide si avremo sempre le coppie di cromosomi omologhi provenienti di genitori. Questi si duplicano in fase S e successivamente i cromatidi fratelli prodotti dai cromosomi omologhi originari possono appaiarsi, formando la *tetrade*. In questa fase si può avere il crossing-over, cioè lo scambio di materiale genetico tra cromosomi omologhi. Finito il crossing-over la cellula si divide, dando luogo a due cellule figlie ciascuna contenente un genoma diploide. Queste cellule vanno poi incontro ad una seconda divisione senza duplicazione del materiale genetico, dando luogo in totale a quattro cellule figlie con genoma aploide.



La meiosi è caratterizzata dalla presenza del *complesso sinaptonemale*, che si forma tra i due cromatidi omologhi.

Nella mitosi la coesione tra i cromatidi fratelli è data dalla coesina. In meiosi non si ha la coesina, ma la coesione è mantenuta dalla formazione dei ponti crociati tra cromatidi (non dal complesso sinaptonemale)???

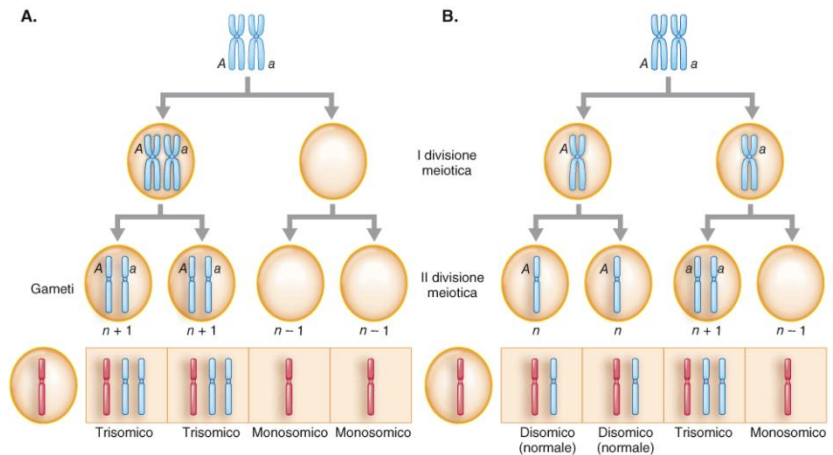
Alterazioni del corredo cromosomico

Le alterazioni dell'assetto cromosomico sono poliploidie o monoploidie, cioè alterazioni dell'intero assetto cromosomico, oppure aneuploidie, che sono alterazioni di uno o pochi cromosomi.

La variazione del grado di ploidia è causata spesso da eventi di non-disgiunzione alla meiosi, dove non si ha una corretta ripartizione del genoma durante la meiosi. La non disgiunzione può avvenire durante la *meiosi I* oppure nella *meiosi II*.

Si è visto che per quanto riguarda la sindrome di Down si ha una relazione tra età della madre e rischio di avere un nascituro con la sindrome di Down. Non c'è relazione invece con l'età del padre. Nelle donne le cellule uovo sono bloccate in prima divisione meiotica.

Con l'aumentare dell'età della madre è possibile che ci siano processi che alterano i contatti tra cromosomi per cui aumenta la possibilità di non disgiunzione dei cromosomi omologhi, e con questo il rischio di aneuploidie. Troviamo poche aneuploidie compatibili con la vita nell'uomo.



Tra le variazioni del numero di autosomi troviamo:

- La trisomia 21 è detta sindrome di Down. 1/700 nati.
- La trisomia del cromosoma 13 è detta sindrome di Patau. 1/20.000 nati.
- La trisomia del cromosoma 18 è detta sindrome di Edwards. 1/8.000 nati

Tra le variazioni del numero di cromosomi sessuali troviamo:

- La sindrome di Turner, con una sola X. 1/2500 nate femmine.
- La sindrome di Klinefelter, con genotipo caratterizzato dalla presenza di uno o più (fino a 4) cromosomi X sovrannumerari. 1/500 nati maschi.
- La sindrome della tripla X, con tre cromosomi X. 1/700 nate femmine.

Le cellule tumorali formano alterazioni cromosomiche tra il 90 ed il 100% dei casi.