

DNA

Biochimica della replicazione

Replicazione DNA: replicazione dell'intero corredo cellulare; avviene sia negli eucarioti (più cromosomi) che nei procarioti (un cromosoma)

La replicazione avviene in specifiche porzioni del corredo cellulare, dette *repliconi*, in ognuno dei quali è presente un *sito di origine di replicazione (ori)*

Procarioti → DNA coincide con il replicone, ed essendoci un solo cromosoma il sito di origine di replicazione è uno (batteri, plasmidi, virus)

Eucarioti → i cromosomi possiedono molteplici siti di origine di replicazione

Forcella di replicazione → frazione del DNA dalla quale inizia la replicazione, che può essere *unidirezionale* o *bidirezionale* (più frequente)

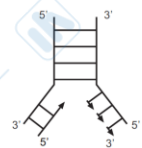
Nel caso di replicazione bidirezionale si formano due forcelle di replicazione.

DNA polimerasi

DNA → due filamenti destrorsi e antiparalleli, quindi se uno ha polarità $5' \rightarrow 3'$, l'altro avrà polarità $3' \rightarrow 5'$

La DNA polimerasi agisce sempre lungo filamenti con polarità $5' \rightarrow 3'$, legando il gruppo fosfato del nucleotide estraneo alla catena in posizione $5'$ al gruppo ossidrilico del nucleotide già presente nella catena, in posizione $3'$. Si nota una diversa velocità di replicazione in base al filamento preso in considerazione:

- Filamento leader: polarità $5' \rightarrow 3'$, la DNA polimerasi procede linearmente e velocemente (replicazione continua)
- Filamento tardivo: polarità $3' \rightarrow 5'$, la DNA polimerasi procede alla replicazione attraverso piccole porzioni di DNA (*frammenti di Okazaki*), mantenendo il verso $5' \rightarrow 3'$ (replicazione discontinua)



La replicazione del DNA viene detta **semidiscontinua**.

Nelle cellule eucariotiche sono state individuate più di 15 DNA polimerasi diverse, e rispetto alla replicazione del DNA procariote, la velocità di replicazione è molto più lenta (1/10).

Estrazione, purificazione ed elettroforesi

Estrazione

L'estrazione del DNA da una qualunque cellula avviene in quattro passaggi:

1. Cellule devono essere disgregate per lasciare solo il DNA → vengono messe in una soluzione contenente un *detergente* (rottura della membrana cellulare), un *sale* (mantenimento della struttura del DNA) e una sostanza (EDTA^{5-}) che sottrae ioni Mg^{++} (cofattori dell'enzima DNAasi)
2. Le proteine cellulari vengono denaturate usando *fenolo* e separate dal DNA tramite centrifuga
3. DNA viene fatto precipitare introducendo un alcol (separa il DNA dall'acqua) e tramite centrifuga si raccoglie sul fondo
4. Il DNA viene ridisciolto in acqua e conservato

Per analizzare la macromolecola di DNA estratta, può essere necessario isolarne e frammentarne porzioni specifiche: *elettroforesi* → processo che sfrutta la carica negativa del DNA in soluzione e che, tramite un campo elettrico, ne permette la frammentazione (i frammenti si muovono dal catodo all'anodo).

La soluzione in cui è immerso il DNA è una soluzione acquosa contenente *ioni* (conducibilità elettrica), gel di *agarosio* o *poliacrilammide* (in base alla precisione richiesta), uno o più *coloranti* (per visualizzare l'andamento).

Per visualizzare il DNA esso deve essere marcato con *bromuro di etidio* (nel caso del gel di agarosio), che se irradiato da raggi UV permette la fluorescenza della molecola.

Fusione o denaturazione

DNA → doppia elica = grande rigidità, grandezza molecola + rigidità = facile frammentazione se manipolata

In natura la struttura del DNA è mantenuta stabile dalle deboli interazioni tra i due filamenti (ponti a idrogeno e forze di impilamento, tra le quali le ultime conferiscono maggiore stabilità.

Denaturazione: separazione delle due eliche di DNA tramite la rottura dei ponti a idrogeno; possono essere usati agenti chimici o fisici, il più usato è l'aumento della temperatura

Restrizione e ligazione

Esonucleasi → enzima che taglia il DNA alle estremità del filamento

Endonucleasi → enzima che taglia il DNA in sequenze specifiche all'interno della molecola, funziona anche su DNA circolare

Entrambi questi enzimi agiscono sulle sequenze polinucleotidiche, a livello dei legami fosfodiesterici:

- Esonucleasi → generano nucleosidi monofosfati (partendo dalle estremità della molecola, procedono "tagliando" nucleotide per nucleotide
- Endonucleasi → generano frammenti polinucleotidici

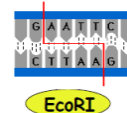
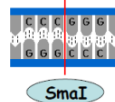
Tra i due enzimi, le endonucleasi ricoprono un ruolo fondamentale nell'ingegneria genetica, in particolare le endonucleasi *di restrizione* → recidono il DNA in sequenze specifiche (solitamente 2-4 per enzima), e si possono dividere in due tipologie in base a dove viene effettuato il taglio:

- Tipo I: tagliano a una certa distanza rispetto alla sequenza riconosciuta
- Tipo II: tagliano in corrispondenza delle sequenze riconosciute, ma in zone *palindrome* del DNA (stessa sequenza di nucleotidi in 5'→3')

Enzima	Organismo di origine	Sequenza consenso	Taglio
EcoRI	<i>Escherichia coli</i>	5'--GAATTC--3' 3'--CTTAAG--5'	5'--G AATTC--3' 3'--CTTAA G--5'
BamHI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	5'--GGATCC--3' 3'--CCTAGG--5'	5'--G GATCC--3' 3'--CCTAG G--5'
HindIII	<i>Haemophilus influenzae</i>	5'--AAGCTT--3' 3'--TTGAAA--5'	5'--A AGCTT--3' 3'--TTGAA A--5'
TaqI	<i>Thermus aquaticus</i>	5'--TCGA--3' 3'--ACGT--5'	5'--T CGA--3' 3'--ACG T--5'
AluI	<i>Arthrobacter luteus</i>	5'--AGCT--3' 3'--TCGA--5'	5'--AG CT--3' 3'--TC GA--5'

Gli enzimi di restrizione possono agire in due modi:

1. Taglio simmetrico → genera *estremità nette*
2. Taglio asimmetrico → genera *estremità coesive*, che possono sporgere in 5' o 3'



Congiunzione → appaiamento di nuovi frammenti di DNA a quelli recisi per mezzo dell'enzima DNA ligasi, che catalizza la formazione di legami fosfodiesterici tra nucleotidi e legami covalenti nella molecola.

La coniugazione sarà più efficace nei filamenti con estremità coesive (il riappaiamento è spontaneo) piuttosto che in quelli con estremità piatte, e il risultato che si ottiene è detto *DNA ricombinante*

Ibridazione

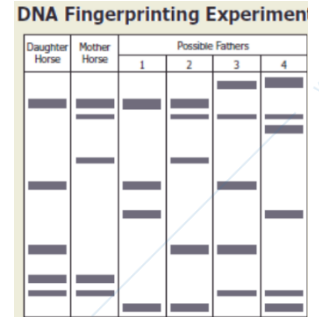
Raffreddando lentamente o normalizzando il pH di una soluzione contenente DNA denaturato è possibile farlo tornare alla forma originale, processo utile *nell'ibridazione*

DNA ibrido → DNA ottenuto denaturando e rinaturando in una stessa soluzione DNA appartenenti a due individui diversi. La quantità di DNA ibrido ottenuta sarà tanto maggiore quanto sono maggiori le sequenze in comune tra i due filamenti di DNA (prodotti ibridazione: DNA1, DNA2, DNA12)

Southern blot hybridization

Metodo di studio del DNA che sfrutta l'ibridazione, diviso in 6 passaggi:

1. Il DNA genomico viene estratto dall'individuo che si vuole studiare e tagliato con enzimi di restrizione
2. DNA genomico sottoposto ad elettroforesi su gel per frammentare la molecola
3. I frammenti vengono denaturati e fissati su una membrana di nitrocellulosa
4. La membrana viene inserita in una soluzione contenente una sonda DNA marcata con ^{32}P (DNA sonda = DNA esogeno che può appartenere alla stessa specie (sonda omologa) o a una specie diversa (sonda eterologa) rispetto all'individuo di partenza)
5. Se tra sonda e DNA genomico ci sono sequenze uguali, i filamenti si ibrideranno
6. La lastra viene sottoposta a radiazioni che "attivano" il radiofosforo nel DNA sonda



Reazione a catena della polimerasi (PCR)

Tecnica che permette di amplificare un frammento di DNA, chiamato *target*

La reazione avviene a partire da una **coppia di oligonucleotidi**, detti *primer* (costituiti da DNA a differenza dei filamenti stampo della replicazione del DNA, in cui sono composti da RNA), composti da 10-25 nucleotidi

Procedimento (I ciclo):

1. Denaturazione del filamento target (95°C) per appaiamento dei primer con le loro sequenze complementari
2. Temperatura ridotta per permettere l'ibridazione tra primer e target
3. Estensione dei primer tramite DNA polimerasi Taq (termoresistente)

Il procedimento rimane questo, ma dal secondo ciclo verranno a formarsi copie dei precedenti primer estesi, quindi un frammento più corto che terminerà in corrispondenza della fine del primer

La PCR è un meccanismo molto specifico, e dipende dalla lunghezza e sequenza dei filamenti primer

Sequenziamento dei genomi

Genoma → insieme del DNA di un organismo

Il genoma può essere sequenziato (ricerca dell'ordine in cui sono disposte le basi azotate) in 3 passaggi:

1. DNA genomico viene frammentato
2. I frammenti vengono clonati tramite vettori plasmidici
3. Viene assemblata virtualmente la sequenza di DNA dei singoli cromosomi, sovrapponendo le sequenze contigue (maggiore è il numero di frammenti che si ripetono, maggiore è la complessità nel sequenziare)

Il risultato di questo processo è un frammento cromosomico sequenziato; tuttavia, attualmente c'è più interesse nello studiare la *funzione* dei geni (genomica funzionale) piuttosto che la *struttura* (genomica strutturale)

RNA

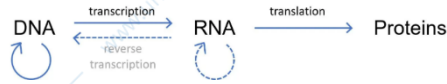
Acidi ribonucleici

RNA → coinvolto nella sintesi proteica, si forma a partire dal DNA (esso non partecipa attivamente alla sintesi proteica)

- Si forma grazie all'azione della RNA polimerasi
- Trasporta l'informazione genetica per produrre proteine nel citoplasma a partire dal nucleo

- Contiene uracile al posto della timina

Dogma centrale della biologia molecolare:



Caratteristiche:

- No complementarità tra basi ($n_{uracile} \neq n_{adenina}$ e $n_{citosina} \neq n_{guanina}$)
- Struttura a filamento singolo (ma può ripiegarsi su se stesso se c'è complementarità tra le basi)

Trascrizione:

- *RNA polimerasi* → lega i ribonucleosidi formando catene poliribonucleotidiche, nelle quali i ribonucleotidi sono legati con legami fosfodiesterici 5' → 3'
- Le basi presenti sull'mRNA sono complementari a quelle presenti sul filamento di DNA usato per la trascrizione, e se il DNA venisse denaturato, quel filamento potrebbe ibridizzarsi con quello di RNA
- Solo un filamento di DNA viene usato nella trascrizione (quello più pesante); tuttavia ci sono organismi in grado di trascrivere con entrambi i filamenti, ma solo una viene usata per trascrivere uno specifico gene (*un gene codifica una sola catena polipeptidica*)

Nella trascrizione, i filamenti di DNA si possono definire in due modi:

- *Filamento stampo* → filamento sul quale viene trascritto l'mRNA complementare
- *Filamento senso* → filamento con sequenza di geni uguale a quella dell'mRNA

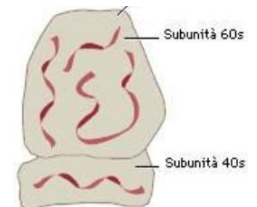
Tipi di RNA

- rRNA (RNA ribosomale) → costituisce i ribosomi, luogo di sintesi delle proteine
- mRNA (RNA messaggero) → trascrive il messaggio genetico dal DNA ai ribosomi
- tRNA (RNA di trasferimento) → traduce il codice dell'mRNA in aminoacidi
- Piccoli RNA → intervengono nella regolazione dell'espressione genica

RNA ribosomale

Costituisce i ribosomi, strutture composte da 2 subunità, di diversa grandezza in rapporto 2:1 per la quantità di proteine ed RNA contenuto

Non trasporta informazioni geniche traducibili in aminoacidi, è solo il "luogo" della sintesi proteica



RNA messaggero

Trasporta il messaggio genetico dal nucleo della cellula ai ribosomi nel citoplasma

Possiede due importanti sequenze nucleotidiche alle estremità, entrambe non traducibili in aminoacidi:

- *Leader* (5' UTR) → sequenza alla quale si lega il *cap*, una molecola di 7-metil guanilato tramite legame 5'-5' trifosfato
- *Trailer* (3' UTR) → aggiunta di una coda poli-A (150-200 nucleotidi contenenti adenina)

Una volta terminata la traduzione, l'mRNA viene immediatamente demolito e sostituito, in un processo che viene detto *turnover*

Northen blot → processo analogo al southern blot, ma usato per determinare la presenza di uno specifico mRNA

RNA di trasferimento

Alla cellula non è sufficiente avere un mRNA in un ribosoma per sintetizzare proteine → gli aminoacidi molto spesso non sono in grado di legarsi chimicamente alle basi azotate del mRNA

È necessario un adattatore → **tNRA**

Caratteristiche:

- Specifico per ogni aminoacido
- Composto da 80 nucleotidi
- Forma a doppia elica per complementarità tra le basi (tranne in 3 lobi)
- Estremità 5' → -CCA, estremità 3' → -G

Per legare l'aminoacido al tRNA è necessaria l'azione dell'enzima *aminoacilsintetasi*, in un processo che comprende due reazioni:

1. Aminoacido + ATP → aminoacido ≈ AMP (aminoaciladenilato) + P ≈ P
2. Aminoacido ≈ AMP + tRNA → **aminoacido ≈ tRNA** + AMP

Infine, la molecola si stacca dal complesso

I tre lobi presenti nel tRNA svolgono una funzione precisa:

- Primo lobo: sito del legame tra il tRNA e la superficie del ribosoma
- Secondo lobo: tritico di basi che costituiscono l'*anticodone*, sede dei legami e idrogeno con l'mRNA complementare
- Terzo lobo: sito del legame con l'enzima aminoacilsintetasi

Piccoli RNA

Intervengono nella regolazione genica, spesso inibendo la trascrizione (es. cellula sotto infezione)

Principali piccoli RNA:

- siRNA (*small interfering RNA*), coinvolti nei processi di silenziamento genico
- miRNA (*micro RNA*), coinvolti nei processi di silenziamento genico

Entrambi questi piccoli RNA si formano a partire da RNA a doppia elica (dsRNA)

Altri piccoli RNA:

- snRNA (*Small nuclear RNA*) → splicing e funzionalità dei telomeri
- snoRNA (*Small nucleolar RNA*) → formazione RNA
- piRNA (*RNA piwi-associati*) → silenziamento genico

Sintesi proteica

Sequenza aminoacidica finale → *colineare* al mRNA stampo (ad una sequenza nucleotidica corrisponde uno specifico aminoacido)

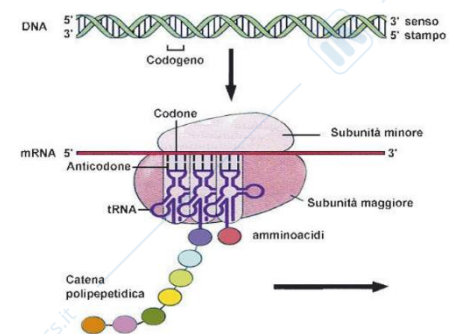
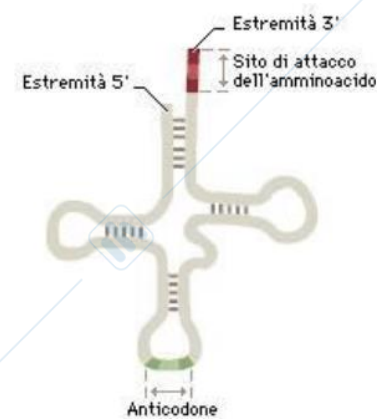
Ogni aminoacido viene codificato da una *tripletta* (4 lettere (ACGT)³ = 64 combinazioni a fronte delle 20 necessarie)

- Triplette nel DNA: *codogeni*
- Triplette nel RNA: *codoni* (1 tripletta = codone = 1 aminoacido), una catena di codoni permette di formare una catena di aminoacidi, legati tra loro mediante legami peptidici

Momenti più complessi nella traduzione: inizio e fine, un errore nella

lettura della sequenza nucleotidica potrebbe comportare la formazione di una proteina diversa da quella richiesta

Aminoacido iniziale: metionina (eucarioti) o N-formil-metionina (f-met) (procaroti):



- Non è quasi mai presente nella proteina finale; quindi, viene rimossa o modificata
- Codificata dalla tripletta **5' AUG 3'**, specifica per i 2 tRNA con anticodone **3' UAC 5'**, uno dei quali è coinvolto nella formazione di f-met nei procarioti

Inizio traduzione (procarioti)

1. Formazione del *complesso d'inizio* → **IF3 + 30S** (IF = fattore d'inizio, 30S = subunità minore del ribosoma)
2. Legame tra complesso d'inizio e mRNA → **IF3 + 30S + mRNA**
3. Formazione complesso "energetico" → **IF2 + tRNA + f-met + GTP** (guanosintrifosfato)
4. Unione dei due complessi → **IF3 + 30S + mRNA + IF2 + tRNA + f-met + GTP + IF1**
5. Unione delle subunità → **30S + 50S = ribosoma 70S + GDP + P** (rimozione IF1, IF2, IF3)
6. Complesso pronto per la traduzione

Ribosoma:

- Sito A (aminoacidico) → legame con il tRNA con le basi complementari (servono 2 IF e GTP)
- Sito P (peptidico) → legame con il tRNA per la f-met
- Sito E (exit) → sito di distacco del mRNA
- Si sposta in direzione 5' → 3' (*traslocazione*) e si allunga fino al codone di STOP nel mRNA

Inizio traduzione (eucarioti)

Simile al processo che avviene nei procarioti, ma con qualche differenza:

1. Il messaggio ereditario passa dal nucleo al citoplasma
2. mRNA subisce una maturazione → eliminazione introni, aggiunta coda poli-A e CAP
3. mRNA traducibile a partire dall'estremo 5' (nei procarioti può iniziare su qualunque tripletta)
4. Degradazione mRNA lenta

Codice genetico

Codice genetico → corrispondenza tra triplette e aminoacidi

La lettura può subire variazioni se vengono aggiunti nucleotidi alla sequenza base → ES. CAT CAT CAT ≠ CAT CGA TCA, in questo caso la sequenza è *sfasata*

- Se vengono aggiunti 1 o 2 nucleotidi, la sequenza rimane sfasata (*frame shift*)
- Se vengono aggiunti 3 nucleotidi la sequenza ritorna in fase e, se il tratto sfasato è ridotto, il gene rimane funzionale

		Second letter				
		U	C	A	G	
First letter	U	UUU Phenylalanine UUC UUA Leucine UUG	UCU Serine UCC UCA UCG	UAU Tyrosine UAC UAA Stop codon UAG Stop codon	UGU Cysteine UGC UGA Stop codon UGG Tryptophan	U C A G
	C	CUU Leucine CUC CUA CUG	CCU Proline CCC CCA CCG	CAU Histidine CAC CAA Glutamine CAG	CGU Arginine CGC CGA CGG	U C A G
	A	AUU Isoleucine AUC AUA AUG Methionine; initiation codon	ACU Threonine ACC ACA ACG	AAU Asparagine AAC AAA Lysine AAG	AGU Serine AGC AGA Arginine AGG	U C A G
G	GUU Valine GUC GUA GUG	GCU Alanine GCC GCA GCG	GAU Aspartic acid GAC GAA Glutamic acid GAG	GGU Glycine GGC GGA GGG	U C A G	

L'aggiunta o rimozione di un nucleotide può essere dovuto a una o più mutazioni, in particolare

- Se si verificano 2 mutazioni diverse, il gene potrebbe funzionare (aggiunta + delezione)
- Se si verificano 2 mutazioni uguali, il gene rimane sfasato (aggiunta + aggiunta)

Caratteristiche codice genetiche

- Organizzato a **triplette**
- **Degenerato** → un aminoacido può essere sintetizzato da più triplette (UAA, UGA, UAG sono STOP)
- **Senza punteggiatura** → viene letto di tre basi in tre basi *non sovrapponibili*, ES. 5' AGCUUAGAG 3' **non** si legge AGC-GCU-CUU-UUA... ma AGC-UAA-GAG o GCU-UAG-AC... o CUU-AGA-C..., in base al *reading frame*
- **Universale** → uguale per tutte le specie esistenti (eccezioni per codici mitocondriali e nucleari di alcune specie procariote ed eucariote inferiori)

Può essere necessario modificare (correggere) l'mRNA per cambiare la composizione della proteina o rendere funzionale un mRNA difettoso → *gene editing*

REGOLAZIONE

Il gene

Gene → segmento di DNA che codifica per una catena polipeptidica o per un RNA specifico

- Per esprimersi deve essere trascritto e tradotto
- Non tutte le regioni di DNA vengono trascritte, alcune hanno lo scopo di regolazione

Promotore

Sequenza nucleotidica non trascritta con lo scopo di inizializzare il processo di trascrizione (sito di attacco della RNA polimerasi). I promotori differiscono tra loro per il tipo di legame con la polimerasi, la stabilità che danno al complesso e l'efficienza del processo.

Il promotore è formato da brevi sequenze nucleotidiche, in particolare:

- Procarioti → 6 nucleotidi (TATAAT) che distano 10 unità dal primo nucleotide che viene trascritto
- Eucarioti → TATA box (-35 dal primo nucleotide trascritto) e CAAT (-100 unità dal primo nucleotide trascritto)

Segnale di STOP → sequenze G-C seguite da A-T

Anche la RNA polimerasi varia da procarioti ad eucarioti:

- RNA polimerasi procariotica → possiede le subunità capaci di legarsi al promotore
- RNA polimerasi eucariotica → deve formare un complesso legandosi a fattori di trascrizione (proteine) per legarsi al promotore

Splicing

Negli eucarioti il trascritto iniziale è più grande della catena polipeptidica finale → la maggior parte del DNA non viene espresso. Questo avviene perché l'mRNA va incontro a maturazione dopo la trascrizione, attraverso un processo che ha lo scopo di eliminare gli *introni* (regioni non codificanti per un aminoacido)

Splicing → processo di rimozione di introni e legame tra gli esoni (porzioni codificanti per un aminoacido)

Splicing alternativo → la grandezza delle regioni rimosse può variare (eliminazione di un esone tra due introni, conservazione di introni nell'mRNA maturo...), conferisce grande variabilità al numero di proteine che vengono prodotte

Funzione degli introni:

1. Conferiscono maggiore variabilità
2. Regolano alcuni processi della trascrizione
3. Contengono geni per la sintesi di piccoli RNA catalitici

Regolazione dell'espressione genica

La regolazione dell'espressione genica varia molto in base all'organismo che consideriamo, se procariote o eucariote

Procarioti

La regolazione dell'espressione genica nei procarioti avviene a livello degli *operoni* (successione di geni con funzioni correlate), nei quali la produzione di proteine varia a seconda delle condizioni interne ed esterne alla cellula; in base all'azione degli enzimi specifici riconosciamo due tipi di operoni: inducibili e repressibili.

- **Inducibili** → la trascrizione è impedita da un repressore normalmente legato all'operone, che può essere inattivato legandosi a uno specifico *substrato* (come il lattosio nell'operone *lac*). Repressore + inibitore = complesso inattivo
- **Repressibili** → il repressore è di norma inattivo, ma si può attivare attraverso l'intervento di un *corepressore* (come il triptofano nell'operone *trp*). Repressore + corepressore = complesso attivo (no sintesi proteica)

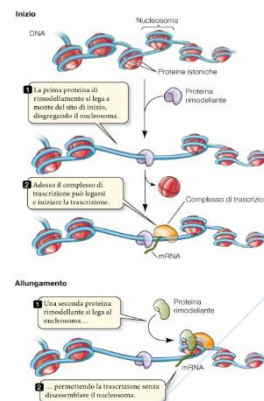
La produzione degli mRNA che codificano per enzimi inducibili e reprimibili è sotto il controllo di *geni regolatori* → geni che codificano per un prodotto (RNA o proteina) che esercita un controllo sulla sintesi proteica.

Eucarioti

La regolazione negli eucarioti è più complessa a causa dell'organizzazione del DNA (*cromatina*), alla necessità di maturazione del mRNA e della separazione spaziale tra trascrizione e traduzione; per questo riconosciamo che la regolazione genica eucariotica può avvenire su più livelli: *stato della cromatina, trascrizionale, post-trascrizionale, traduzionale e post-traduzionale*.

Stato della cromatina

Nel nucleo il DNA è organizzato in modo compatto e le molecole si legano a molecole proteiche specifiche, chiamate *istoni*, il complesso DNA-istoni è detto *nucleosoma*, l'insieme dei nucleosomi forma la *cromatina*. Un fattore importante nella regolazione dell'espressione genica a livello della cromatina è la *metilazione*, processo reversibile che consiste nella formazione di un legame tra gruppi metile e citosine sul DNA che rende impossibile l'avvio della trascrizione (le proteine per la trascrizione non riescono a legarsi ai siti metilati) → Campo di studio dell'*epigenetica* (cambiamenti ereditabili indipendenti da modificazioni del DNA).



Regolazione trascrizionale

Il controllo trascrizionale avviene ad opera di proteine capaci di legarsi ai promotori del DNA, esercitando un *controllo positivo* (attivazione) o *negativo* (disattivazione) sui geni della regione considerata. L'azione di tali proteine permette alla cellula di gestire molti stimoli interni ed esterni alla cellula.

Regolazione post-trascrizionale

Il controllo a livello post trascrizionale avviene a sua volta su più livelli, riguarda:

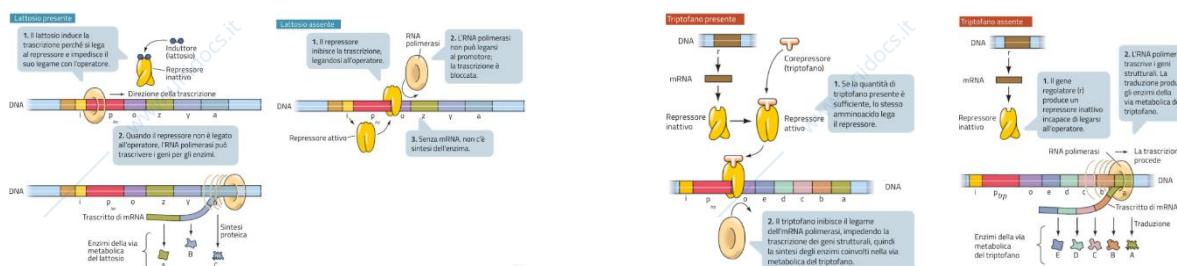
- Aggiunta selettiva di *guanosina metilata* all'estremità 5' del trascritto (**CAP**)
- Aggiunta selettiva di *adenine* all'estremità 3' del trascritto (**coda poli-A**)
- Maturazione del mRNA tramite splicing e *splicing alternativo* (importante per l'espressione del gene)
- Degradazione del mRNA
- RNA editing → modificazione delle basi azotate del trascritto (C in U e A in I (inosina))
- *Silenziamento genico* → meccanismo che avviene ad opera dei piccoli RNA, che legandosi specificatamente a molecole di mRNA lo tagliano in due, impedendo la sintesi proteica; se il silenziamento avviene ad opera di miRNA parliamo di *RNA interference*, se avviene ad opera di siRNA parliamo di *silenziamento genico post trascrizionale*.

Il silenziamento genico può avvenire anche a livello trascrizionale tramite il legame tra il piccolo RNA e una regione del promotore del DNA, a livello traduzionale tramite il legame con la regione 3' non tradotta e a livello della cromatina (i piccoli RNA possono alterarne la forma).

Regolazione traduzionale

La regolazione traduzionale dipende da diversi fattori:

- Presenza di specifici fattori di inizio
- Presenza di specifici fattori di allungamento e terminazione
- Capacità dei ribosomi di legarsi a specifiche molecole di RNA
- Concentrazione delle molecole di tRNA



- Azione dei piccoli RNA specifici

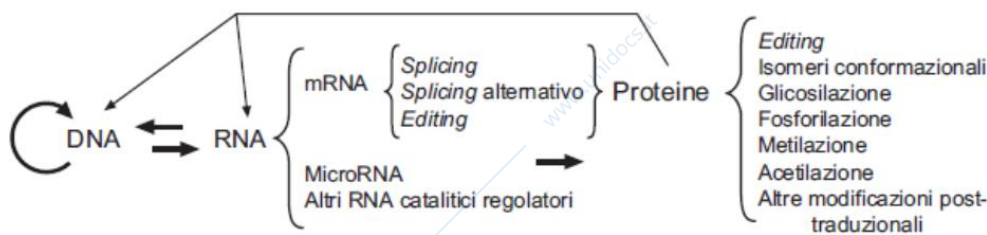
La cellula è in grado di regolare l'espressione genica andando ad influenzare uno o più di questi fattori.

Regolazione post-traduzionale

Consiste nella modificazione delle proteine appena sintetizzate per renderle funzionali, ad esempio attraverso il taglio di un'estremità della catena (*peptide segnale*, permette il trasporto della proteina verso uno specifico comparto cellulare), la sostituzione di alcuni aminoacidi con altri (*editing*) o l'aggiunta di aminoacidi alle estremità della catena, che possono rendere la vita della proteina più lunga o più corta.

- Catabolismo delle proteine → controllo sulla degradazione delle proteine attraverso la via *ubiquitina-proteasoma*. Il proteasoma è un grande complesso proteico composto da un **nucleo** e una **parte regolatoria** (riconoscimento del substrato proteico da degradare), mentre l'ubiquitina è una proteina composta da 76 aminoacidi, espressa universalmente da tutte le cellule eucariotiche. Il processo di degradazione è altamente specifico.

“Nuovo” dogma della biologia molecolare (schema)



Organizzazione del materiale ereditario (eucarioti)

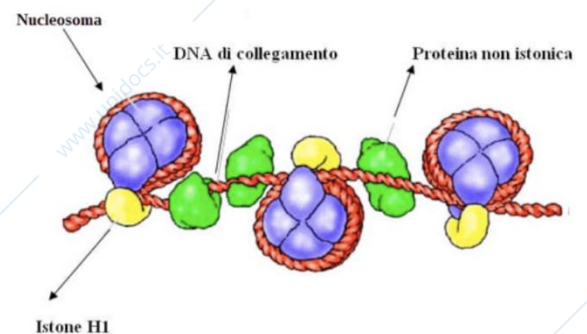
L'informazione genetica è contenuta nel nucleo sotto forma di *chromosomi*, che nel loro complesso costituiscono il *genoma nucleare*. Essi raggiungono il loro massimo grado di condensazione (e quindi sono evidenti) solo durante la divisione cellulare, in condizioni normali si trovano in una condizione di distensione.

Informazione genetica negli eucarioti → presente anche in mitocondri e plastidi, non solo nel nucleo

Cromatina e cromosomi

Cromatina: unità fondamentale dei cromosomi, costituita da:

- DNA
- Proteine → *Istoniche* (basiche) e *non istoniche* (acide)
- RNA
- Ioni Ca ed Mg



Istoni

Proteine basiche a basso peso molecolare, eguagliano la massa di DNA nel cromosoma.

Basicità → deriva dall'elevato contenuto di aminoacidi basici (*lisina* e *arginina*); in base alla quantità di lisina e arginina dividiamo gli istoni in 5 classi: H1 (LISINA), H2A (lisina), H2B (lisina), H3 (ARGININA), H4 (ARGININA).

L'interazione tra istoni e DNA da origine al *nucleosoma* (unità fondamentale della cromatina), un complesso proteico nel quale il DNA (148 coppie di basi) si avvolge attorno a 8 proteine istoniche (H2A, H2B, H3, H4 X2).

Il filamento di DNA che collega un nucleosoma all'altro è detto *DNA linker*. La proteina H1 è esterna al nucleosoma e ricopre un ruolo fondamentale nell'organizzazione del DNA nel nucleo.

Proteine non istoniche

Natura molto eterogenea e quantità molto variabili in base alla cellula (in quelle spermatiche non sono presenti)

Stato della cromatina

Abbiamo detto che la cellula possiede diversi meccanismi che impediscono o favoriscono la trascrizione di geni senza alterazione del codice genetico, in particolare modificando il sito di attacco della RNA polimerasi. Tali modificazioni possono essere:

- Acetilazione → aggiunta di un gruppo acetile in corrispondenza delle code istoniche, attiva la trascrizione
- Metilazione → aggiunta di un gruppo metile alle citosine del DNA, reprime la trascrizione
- Fosforilazione → aggiunta di un gruppo fosforico nelle regioni N-terminali delle proteine istoniche
- Ubiquitinazione → aggiunta di ubiquitina alle lisine di H2A e H2B, funge da repressore genico

Enzimi coinvolti nei processi: *metiltransferasi, acetiltransferasi, deacetilasi, demetilasi*

Impacchettamento DNA

Processo fondamentale nell'organizzazione della cellula, avviene in tre stadi:

1. Nucleosomi → la loro formazione riduce di molto lo spazio occupato dal DNA
2. *Fibra fondamentale* → struttura a spirale che si ottiene grazie all'azione della proteina H1, che promuove la compattazione dei nucleosomi
3. *Anse della fibra fondamentale* → si formano dall'interazione tra fibra fondamentale e *scaffold* (impalcatura proteica); tale legame dipende dalla presenza di lunghe sequenze A e T (*SAR*, scaffold attachment region), le stesse responsabili del legame DNA - matrice nucleare durante interfase (*MAR* in questo caso)

Struttura e morfologia cromosoma eucariotico

Ogni specie possiede un numero preciso di cromosomi con una specifica morfologia. L'insieme di questi due aspetti (numero e morfologia) si dice *cariotipo*, ed è possibile studiarlo tramite il *cariogramma*, ovvero una foto dei cromosomi metafasici (molto evidenti) raggruppati tra *omologhi* (cromosomi con stesse dimensioni, morfologia e posizione dei geni (*locus*)).

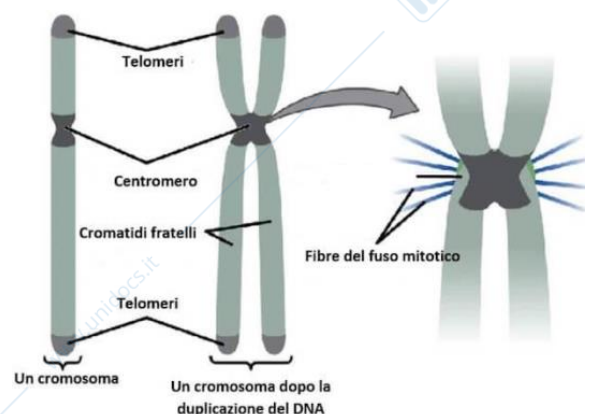
Numero cromosomico → dipende dalla specie e in base al tipo di cellula lo distinguiamo in *numero somatico* e *gametico*

- *Numero somatico* → numero di cromosomi nelle cellule somatiche: $2n$ (1n madre + 1n padre)
- *Numero gametico* → numero di cromosomi nelle cellule gametiche: n

Per quanto riguarda le cellule gametiche, ogni cromosoma materno trova un proprio omologo in uno di origine paterna.

Caratteristiche strutturali cromosomi:

- **Centromero** → viene detto *costrizione primaria* o *cinetocoro* e ricopre un ruolo fondamentale nelle divisioni cellulari, permettendo l'*allineamento metafasico* del cromosoma tramite l'interazione con i *microtubuli*. I frammenti cromosomici privi di centromero vengono quasi sempre eliminati dalla cellula. Il centromero può trovarsi non esattamente al centro del cromosoma, ma questo non ne altera le funzionalità (in alcune specie l'attività centromerica è su tutto il cromosoma, quindi anche in seguito a una rottura i frammenti non vengono eliminati dalla cellula)
- **Organizzatore nucleolare** → Viene detto *costrizione secondaria* e possiamo definirlo come un'appendice del cromosoma, che ha il compito di codificare mRNA per la formazione del nucleolo e sintesi dell'rRNA (formazione dei ribosomi). Non è presente in tutti i cromosomi



- **Telomeri** → estremità del cromosoma, impediscono il legame con altri cromosomi o frammenti attraverso la presenza di brevi sequenze di DNA ripetute. I telomeri sono mantenuti dall'enzima telomerasi
- **Cromomeri** → inspessimenti del cromosoma che si formano durante la profase meiotica (in alcuni casi anche mitotica). La loro formazione è controllata da geni
- **Satelliti** → Estensione della costrizione secondaria

Eterocromatina

Forma compatta della cromatina che può essere temporanea (durante le divisioni cellulari, dette fasi *euromatiche*, perché finito il processo l'eterocromatina torna *euromatina*, la forma più libera della cromatina) o permanente anche durante l'interfase del ciclo cellulare (si dicono zone *eterocromatiche*). Dividiamo quindi l'eterocromatina in due categorie:

- *Eterocromatina costitutiva* → eterocromatina costante, contiene pochi geni e non codifica. Presente quasi sempre in corrispondenza dei centromeri, telomeri ed organizzatore nucleare
- *Eterocromatina facoltativa* → eterocromatina transitoria, la sua formazione riguarda processi reversibili (metilazione DNA, modificazione degli istoni). ES corpo di Barr

Eterocromatina VS euromatina → grado di spiralizzazione e condensazione, composizione chimica (contenuto DNA e proprietà) e caratteristiche genetiche

Cromosomi particolari

Nascono da numerose duplicazioni del DNA senza che avvenga la divisione del nucleo → se le catene di DNA rimangono nello stesso cromosoma parliamo di *politenia*, quindi di *cromosomi politenici*. I principali sono:

- *Cromosomi giganti* → cromosomi molto despiralizzati ed estesi, presentano una struttura a bande e sono formati dai due omologhi. A livello delle bande possiamo trovare dei rigonfiamenti temporanei, detti *puffs*, sede della sintesi di mRNA (una volta sintetizzato, i puffs regrediscono)
- *Cromosomi a spazzola* → Presenti negli oociti di molti vertebrati e invertebrati. L'asse del cromosoma è costituito da una serie di cromomeri avvolti ad elica, ed essi si diramano le *anse* (simili ai puffs, sede di sintesi di mRNA), che regrediscono una volta terminata l'attività trascrizionale.