

## MITOSI E MEIOSI (Cap.2 pag.36-40)

Le cellule non sono obbligate a dividersi, possono rimanere in uno stato quiescente chiamato G<sub>0</sub>, come ad esempio i neuroni.

Quando c'è l'input a proliferare, si assiste alla divisione della cellula.

Si assiste a una fase di accrescimento S in cui si ha la duplicazione del DNA, l'accrescimento delle dimensioni della cellula, la duplicazione degli organelli. I cromosomi sono schematizzabili come filamenti abbastanza lassi, legati da una porzione centromerica (fase G<sub>1</sub>).

Nella fase G<sub>2</sub> i cromosomi sono ancora nella fase rilassata, si completa la fase S e c'è un controllo per verificare che il procedimento sia avvenuto correttamente. Se così non è, la cellula va incontro ad apoptosi. Se la duplicazione del DNA è avvenuta correttamente, la cellula va incontro a divisione mitotica.

La *ploidia* si riferisce al numero n, dove si intende quanti sono i cromosomi nel loro set aploide. Negli umani sono 23, quindi la nostra ploidia è 2n con 46 cromosomi totali (*diploidia*).

Le cellule in divisione sono sempre diploidi, la differenza sta nel contenuto di DNA. Nella fase G<sub>2</sub> abbiamo un contenuto doppio di DNA dovuto alla duplicazione della fase S, che poi si dimezza dopo la mitosi.

Per *interfase* si intendono la fase G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>, ovvero tutte le fase eccetto la mitosi.

La mitosi si suddivide in vari stadi:

- Profase: i cromosomi cominciano a condensarsi, la membrana nucleare comincia a disgregarsi e si forma il fuso mitotico
- Metafase: i cromosomi si allineano lungo la piastra equatoriale, i centromeri sono legati dal fuso
- Anafase: i cromosomi migrano verso i poli opposti dalla cellula, tirati dal fuso
- Telofase: si ha la divisione della cellula, la formazione della membrana nucleare, il rilassamento della cromatina

Per quanto riguarda la meiosi, questa è costituita da due divisioni successive (divisione riduzionale).

Nella meiosi I presenta un momento critico durante la profase I, quando i cromosomi cominciano a condensare e a diventare visibili come filamenti. A questo stadio avviene un processo di ricombinazione.

La profase I si suddivide in sottofasi:

-Leptotene: cromosomi visibili in filamenti

-**Zigotene**: i due cromosomi omologhi si appaiano (non sono identici, ma si somigliano molto). I cromatidi fratelli vengono appaiati ad altri due cromatidi fratelli formando un complesso di 4 cromatidi detto complesso *sinaptonemale*, definita anche *tetrade*. Verifica che la procedura avvenga correttamente. Si formano le cosiddette sinapsi

-Pachitene: la cromatina si compatta ulteriormente, i cromosomi omologhi tendono a scollarsi in alcuni punti

-**Diplotene**: la cromatina è condensata, si ha una desinapsi. I due cromosomi omologhi sono tenuti insieme tramite chiasmi, dove avviene una ricombinazione tra i due cromosomi omologhi mediante un processo definito *crossing-over*. Non abbiamo più i cromatidi fratelli, ma i cromatidi omologhi/ricombinati. Non è cambiato l'ordine dei geni. Genera variabilità.

Abbiamo a questo punto la metafase I, dove i cromatidi si allineano lungo la piastra equatoriale.

Durante l'anafase I, si separano i cromosomi omologhi (costituiti da due cromatidi) e migrano verso i poli della cellula. Durante la telofase I si ha la divisione della cellula, una parziale de-condensazione della cromatina (rilassamento).

Si ha l'inizio della seconda divisione, a partire dall'interfase II.

Durante la metafase II, i centromeri delle coppie di cromatidi si allineano lungo la piastra equatoriale di ciascuna cellula figlia. Durante l'anafase II i cromatidi si separano perché vengono tirati ai poli opposti della cellula. A causa del crossing over e del riassortimento indipendente, ogni nuova cellula avrà un suo peculiare corredo genetico. La quantità di DNA è a questo punto dimezzata e i cromosomi sono 23, e rimane dimezzata fino al momento della fecondazione quando la quantità di DNA torna ad essere normale e i cromosomi sono 46. Si ha quindi la telofase II in cui la cellula si separa.

Alla fine della meiosi si hanno quindi quattro cellule figlie con 23 cromosomi (n) e una quantità di DNA dimezzata rispetto al solito. Nelle femmine, 3 di queste 4 cellule (oociti) vanno incontro ad apoptosi, mentre nei maschi sono 4 cellule (spermatozoi) perfettamente funzionanti.

Cosa succede, come e perché avviene la ricombinazione fra i cromatidi? Esistono tanti modelli che sono stati proposti. Un modello cerca di spiegare dei fatti.

La ricombinazione è un processo voluto dagli organismi, è indirizzato e regolato da proteine ed enzimi che sono coinvolti attivamente in questo processo.

La prima cosa che succede nel chiasma, è la rottura di una delle due eliche del DNA. I due lembi dei cromosomi omologhi vengono incrociati e rilegati. Le due emieliche vengono fatte scorrere per un certo tratto (20-200 nucleotidi circa), il DNA ricombinato in questo modo non è perfettamente appaiato e prende il nome di *DNA eteroduplex* (viene considerato come una mutazione genica e si cerca di eliminare o di cambiare la base scorretta e sostituita con la base corretta, definito *conversione genica*). La struttura a croce prende il nome di *struttura di Holliday*.

Il DNA eteroduplex si forma in tante circostanze nelle varie fasi dei cicli cellulari. È fenomeno tipico della meiosi. Le due emieliche che formano il DNA eteroduplex non sono perfettamente complementari, infatti si ha un mismatch delle basi azotate, ovvero degli disappaiamenti: due regioni appaiate per via della loro omologia, non perfettamente complementari. Si può avere un cromatidio ricombinante completo oppure un cromatidio con un pezzo ricombinato. La cellula si porta dietro il DNA eteroduplex per un certo periodo di tempo non molto lungo. Ci sono i sistemi di riparazione di DNA che vigilano sulla fedeltà delle repliche che la cellula fa, soprattutto durante la fase S, che fanno in modo che il DNA eteroduplex venga riparato. Questo processo prende il nome di *conversione genica*.

**ALLELE:** va di pari passo con gene. Un locus è una determinata posizione all'interno del cromosoma. Un locus può essere un punto, una regione. Un gene è una porzione del DNA che codifica per una proteina. Un allele è una sequenza del gene di DNA che specifica per una data proteina.

Il materiale genetico deve avere un contenuto di informazione, deve avere delle proprietà strutturali che consentano una replicazione fedele da cellula a cellule e, inoltre, deve essere molto stabile con le generazioni.

#### STRUTTURA DEL DNA.

Il DNA è una molecola costituita da una base azotata (adenina, guanina, citosina, timina), da un gruppo fosfato e da uno zucchero (deossiribosio).

Citosina e Timina costituiscono una classe definita *pirimidine*, presentano un anello eterociclico.

Adenina e Guanina costituiscono una classe definita *purine*, presentano un doppio anello condensato.

Quando la base è legata al deossiribosio costituisce un deossinucleoside, prende un nome diverso: deossiadenosina, deossiguanosina, deossicitidina e deossitimidina.

Se al complesso è legato anche il fosfato si ha un deossinucleotide: deossiadenosina monofosfato, difosfato, trifosfato a seconda del numero di fosfati presenti.

Regola di Chargaff: in tutti gli organismi, esistono delle regole sempre mantenute. La quantità molecolare di A e T è la stessa, così come per C e G.

Adenina si appaia con Timina, Citosina si appaia con Guanina. Il rapporto tra purine e pirimidine è 1.

Nel 1953, Watson e Crick spiegarono la struttura a doppia elica del DNA.

L'ossatura della struttura a doppia elica è costituita dallo zucchero e dal fosfato, mentre i pioli sono costituiti dalle interazioni delle basi azotate. Adenina e Timina presentano un doppio legame a idrogeno, mentre Citosina e Guanina presentano un triplo legame a idrogeno. I due filamenti di DNA hanno una testa e una coda (5' e 3'), e sono tra loro antiparalleli (testa-coda).

Il DNA, quando deve essere aperto per replicazione, si dice che viene denaturato. La denaturazione avviene

a livello del doppio legame tra Adenina e Timina (più facile rispetto al triplo tra Citosina e Guanina) mediando l'uso di calore superiore ai 95 gradi, oppure mediante delle soluzioni basiche a pH 10. La cellula, per aprire il DNA, utilizza degli enzimi, ovvero dei catalizzatori proteici.

#### REPLICAZIONE PROCARIOTA

Il cromosoma batterico è circolare e vi è un unico sito di inizio per la replicazione.

DnaA box: sono sequenze del DNA e fornisce il sito di riconoscimento per proteine che innescano tutto il processo di replicazione.

Vi sono particolari proteine che riconoscono regione ricche in A-T.

Le Single Strand Binding Proteins aprono la regione di DNA che deve essere replicato, seguito dall'azione dell'enzima elicasi che aprono la struttura del DNA ulteriormente.

Il filamento di DNA ha una testa e una coda. La testa è 5' e il senso di allungamento va dal 5' al 3'. Il gruppo fosfato forma la testa, poi abbiamo il deossiribosio con l'OH legato al C3' che crea un legame covalente con il nuovo deossinucleotide che sta entrando. Il nuovo ha tre P, due fosfati (pirofosfato) vengono rimossi.

Reazione irreversibile. La DNA pol allunga il filamento verso il 3' ma scorre dal 3' verso il 5'. E' la principale responsabile della fedeltà della replicazione.

DNA pol. I (processività 20bs/sec). Ha attività esonucleasica 5'>3' e 3'>5'.

DNA pol. II

DNA pol. III, la più importante. Ha una processività di 1000bs/sec. Ha attività esonucleasica 3'>5'.

DNA pol. IV

DNA pol. V

Tutte hanno un'attività di correzione di bozze (proof reading): sono in grado di accorgersi di un errore e tornare indietro idrolizzando il legame covalente e ripartire in modo tale da aggiungere le basi corrette.

Le esonucleasi sono enzimi che idrolizzano ed eliminano i nucleotidi partendo dalla testa o dalla coda. Le endonucleasi, invece, sono come delle forbici che tagliano nettamente i nucleotidi. Agiscono tutte sul filamento in costruzione, ovvero sul templat.

Esiste un fenomeno detto tautomeria: lo stesso composto, per una breve frazione della propria vita, presenta una struttura leggermente modificata dovuta allo spostamento di legami o atomi all'interno della molecola. Il tutto ritorna al normale poi. E' il caso della citosina, che può presentarsi nella sua forma imminica, forma più instabile rispetto alla forma base. Nel caso della timina, essa può assumere una forma enolica per un breve periodo di tempo dovuta allo spostamento di un atomo di idrogeno. Queste sono fonti di errore della DNA polimerasi, possono comportare delle mutazioni. DNA Mismatch repair: corregge gli errori dopo la replicazione del DNA.

Filamento stampo costituito dalle due emieliche antiparallele. La replicazione è semiconservativa. Un filamento parte con il 5' e l'altro con il 3'. L'enzima elicasi permette di aprire piano piano tutti i legami idrogeno che ci sono all'interno della molecola di DNA grazie anche alle Single Strand Binding Proteins. La DNA pol che il replisoma contiene è in grado di polimerizzare in direzione 5'>3' e lo legge in direzione 3'>5'. Uno dei due filamenti (leading strand) non ha problemi di replicazione perché via via che si apre la forca di replicazione è agevolato, la DNA pol può sintetizzare il filamento nascente nella direzione giusta. Il problema si presenta per l'altro filamento, la DNA polimerasi va nella direzione opposta. La direzione di questo filamento (lagging strand) fa sì che questo venga replicato in maniera discontinua, c'è bisogno tutte le volte di ripartire. La DNA pol deve trovare un innesco perché non può iniziare da sola la replicazione, ha bisogno di un OH a cui agganciarsi. La RNA primasi produce un primer di RNA, ovvero un pezzetto di RNA che è in grado di fornire quell'ossidrile al 3' su cui può agganciarsi la DNA polimerasi. E' poco fedele ma è piuttosto rapida, non presenta attività di correzione. Si crea un pezzetto di ibrido DNA-RNA di 20-25 nucleotidi che da l'innesco per la replicazione fedele. L'RNA primasi è attaccata alla primasi. Si creano dei

frammenti di DNA, detti frammenti di Okazaki, che vengono cuciti in seguito. La DNA pol I ha una bassa processività ma ha attività esonucleasica in avanti; rimuove 20-30 paia di basi di RNA. Subentra DNA ligasi che con una molecola di ATP spesa come energia, riesce a fare sì che si crei un legame covalente fra le basi. I due filamenti procedono alla stessa velocità ed il processo è coordinato. La fedeltà di errori delle DNA pol, attraverso la correzione di bozze e le DNA Mismatch Repair, è di circa 10<sup>-10</sup> (10<sup>-10</sup>).

**REPLISOMA EUCARIOTA: nucleosomi struttura del DNA (Cap.12 pag. 439-444)**

Un filamento di DNA svolto può arrivare a 2m.

Un virus può arrivare a 100nm, un batterio a 1µm, una cellula animale a 10µm, una cellula vegetale a 100µm.

Il nucleosoma è l'unità di base della cromatina, la cromatina è l'assemblaggio del DNA con le sue proteine. Negli eucarioti, il DNA è sempre accompagnato da proteine, diversamente da ciò che accade nei procarioti. Il DNA è arrotolato intorno a 8 proteine, e il sistema è tenuto insieme da un'altra proteina detta H1. Queste proteine si chiamano istoni. Gli istoni sono, in totale, 9. Le altre proteine sono uguali a due a due. C'è una forte interazione ionica tra il DNA (polianione perché i P sono carichi negativamente) e le lisine e le arginine delle proteine. Le proteine istoniche sono tra le più conservate tra quelle conosciute; è stimato che la frequenza di mutazione è veramente molto bassa.

La collana di perle è la base della cromatina. La compattazione forma la fibra di DNA di circa 30 nm, è avvolta in un solenoide. Lo spessore del nucleosoma è di 10 nm. Quando viene arrotolato, lo spessore diventa di 30 nm (si trova in una cellula interfascia). La cromatina viene compattata in maniera ordinata. Subentrano le proteine dello scaffold, un'ossatura proteica che tiene la cromatina in posizione. Lo scaffold viene spiralizzato per compattare e condensare ulteriormente la cromatina. Forma delle anse di circa 300nm. Lo scaffold viene più volte spiralizzato su sé stesso arrivando a uno spessore di 700nm (durante la metafase di vedono bene).

Il nucleosoma prevede 1 e  $\frac{3}{4}$  di giro della cromatina intorno alle proteine istoniche. Ci sono 146 paia di base dentro il nucleosoma. Quando la cellula decide di andare incontro a condensazione estrema è perché entra in metafase e deve poi dividersi.

**REPLICAZIONE EUCARIOTA**

Vi sono delle differenze. Il cromosoma è lineare e non circolare, la quantità di DNA da replicare è dell'ordine dei 3 miliardi, il DNA non è libero ma deve essere svolto. Vi è la presenza di enzimi che allontanano il DNA dagli istoni e poi di legarli nuovamente dopo che la forza replicativa ha svolto il suo lavoro.

Come avviene la divisione degli istoni? La replicazione del DNA è semiconservativa, abbiamo due templati che formano una doppia elica figlia identica. Alla cellula eucariotica non basta replicare fedelmente il DNA, ma anche le informazioni epigenetiche che facciano rimanere la cellula nello stato di differenziamento in cui si trova. Es. gli eritroblasti che poi maturano in eritrociti. Per mantenere questo livello di specializzazione è garantito da segnali epigenetici. L'informazione epigenetica è un'info che mette dei segnali chimici sopra la sequenza di DNA in modo tale che certi geni debbano essere spenti ed altri debbano essere espressi. Si aggiungono gruppi chimici sul DNA e anche sulle proteine istoniche. Se un locus deve essere letto ed espresso per creare dei geni, bisogna che sia in una cromatina lassa. Quello che viene aggiunto sul DNA viene letto dai macchinari cellulari specifici, quello sugli istoni definisce se la cromatina è più o meno condensata. La capacità di trasmettere queste informazioni fedelmente durante le replicazioni è fondamentale. L'ottamero istonico è formato da proteine identiche a due a due. Subisce modificazioni chimiche che trasmettono l'informazione di restare chiusi. 4 proteine vanno su una cellula figlia e le altre 4 sull'altra cellula figlia. Arrivano 4 nuove proteine istoniche "vergini" che vengono istruite. Appositi macchinari enzimatici leggono l'istruzione chimica che c'è e la riproducono sugli istoni vergini, pertanto si

perpetua anche l'informazione di tipo epigenetico. PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) ha vari ruoli e si trova deregolato nei tumori, vi sono proteine che porgono istoni di nuova sintesi al replisoma come CAF-1.

L'origine di replicazione vera e propria non è molto diversa rispetto ai procarioti. Vi è una regione ricca in AT e una o più sequenze consensus. La proteina ORC è in grado di riconoscere il sito d'inizio (sequenza d'origine) e reclutare il replisoma. Si forma così la bolla replicativa e la replicazione può avvenire. Vi sono tante bolle di replicazione lungo il cromosoma che cominciano coordinate e, a volte, si fondono. Complessità del replisoma, presenza del nucleosoma, numerosità delle bolle di replicazione sono le principali differenze tra le repliche procariote ed eucariote.

## TELOMERI

Porzioni terminali dei cromosomi. L'RNA primasi inserisce un pezzetto, DNA pol I rimuove i filamenti di RNA e procede con la loro chiusura. C'è sempre un filamento che fuoriesce in seguito a una replicazione, in fondo non si riesce a replicare l'ultimo pezzetto. Ad ogni ciclo cellulare, il DNA di una cellula figlia è destinato ad accorciarsi in quanto si degrada. Al ciclo successivo, le due cellule figlie avranno protrusioni nel cromosoma e di generazione in generazione viene loro assegnato un accorciamento dei telomeri. La parte erosa dei telomeri diventerebbe talmente elevata da rendere la cellula incompatibile con la vita, andando in senescenza morendo. Meccanismo di salvaguardia. Siamo programmati affinché le cellule, a una certa, muoiano.

La linea germinale è trattata in maniera diversa da quella somatica, presenta un fenomeno di ripristino dei telomeri. La telomerasi è l'enzima chiave di questo processo, cercando di ripristinare la lunghezza dei telomeri. Le cellule tumorali sfruttano la telomerasi e per questo non vanno incontro a morte naturale, sono dette immortali. La telomerasi è una ribonucleoproteina, molecola nucleare contenente al suo interno RNA. I nostri telomeri sono costituiti da sequenze ripetute, quella umana conosciuta è TTAGGG ed eventualmente una purina può essere sostituita dall'altra purina (TTGGGG). La telomerasi sfrutta la protrusione per aggiungere il suo pezzo di RNA e mantenere la lunghezza del telomero.

L'allungamento avviene in varie fasi. Nelle prime fasi si allunga il filamento che è già lungo (quello che protrude) attraverso polimerizzazione che usa come innesco il 3' che protrude e come sequenza di stampo l'RNA che sta al suo interno. Vengono aggiunte e allungate le protrusioni usando come template il filamento di RNA presente all'interno dell'RNA polimerasi. Questo avviene in vari cicli e solo dopo che si è ragionevolmente allungato, si procede con la ri-sintesi dell'altro filamento. Ricomincia poi il processo di RNA primasi, DNA polimerasi e così via e viene fatto sul 3' che è stato allungato. Questo bilancia l'erosione. Il 3' che fuoriesce non è libero, ma c'è una struttura ben orchestrata con proteine di varia natura che fa sì che il filamento venga incappucciato.

## EREDITA' A SINGOLO GENE (cap.2)

Intorno al 1850/1860 Mendel ha gettato le basi della genetica pur senza avere gli strumenti per identificare le basi molecolari. E' stato possibile delineare delle congetture che ci fosse effettivamente la presenza di geni, incrociando piante e osservandone la progenie.

Le leggi di Mendel spiegano solo una parziale parte dell'eredità, quella più semplice, il resto fu scoperto successivamente. La genetica dei caratteri complessi è una tipologia di eredità piuttosto complessa (altezza, pressione arteriosa, tumori, etc...). I geni che sono responsabili di queste determinate caratteristiche non sono ancora stati esplorati completamente.

All'epoca vi era l'idea dell'eredità per mescolamento. Questo modello funzionava principalmente per caratteri che variano con continuità come il peso, l'altezza, il colore dei capelli e così via. Non spiegava però per quale motivo ci fosse una comparsa di caratteri originari, ovvero caratteri parentali.

Gli esperimenti di Mendel sono un paradigma di corretta metodologia scientifica.

1. Materiale sperimentale adatto allo studio (scelta dei tratti da considerare, etc...)

2. Accurato disegno di studio
3. Ampia raccolta di dati, la variabilità è da tenere in considerazione
4. Formulazione di un'ipotesi, un modello, un meccanismo
5. Utilizzo di metodi statistici per dimostrare l'accordo con l'ipotesi
6. Verifica dell'ipotesi con altri esperimenti: il risultato deve tornare secondo la previsione

#### CALCOLO DELLE PROBABILITA'

-Caso AND: moltiplicazione quando ho la parola "e". Es. probabilità di ottenere due sei lanciando due dadi:  $1/6 \times 1/6 = 1/36$

-Caso OR: addizione quando ho la parola "o". Es. probabilità di ottenere due sei o due cinque:  $1/36 + 1/36 = 1/18$

Un'altra cosa importante da dire è quella di avere gli strumenti matematici adeguati per capire se un certo dato che io formulo come ipotesi realmente sia concorde con la mia ipotesi. Questo aspetto si basa su test statistici, come ad esempio il test del Chi quadrato dove si osserva la differenza fra i dati attesi e quelli ottenuti.

ANALISI STATISTICA: TEST DEL CHI-QUADRATO serve a verificare se i risultati ottenuti in un dato esperimento si discostano dai risultati attesi soltanto per effetto del caso. Le domande da porsi sono:

-la differenza osservata è casuale?

-l'ipotesi zero è confermata?

L'ipotesi zero è l'ipotesi che io faccio di base per quello che deve capitare nella maniera più semplice.

#### PROCEDURA

1. Formulare un'ipotesi semplice su cui costruire un'attesa precisa (Es. ipotesi zero: assortimento indipendente).
2. Calcolare il chi-quadro.
3. Stimo p(chi-quadro): che probabilità ho di osservare quei dati se ho una ipotesi, ovvero se i dati sono in accordo con l'ipotesi.
4. Rifiutare o accettare l'ipotesi zero

Il metodo del chi-quadro consente di determinare qual'è la probabilità che la discrepanza tra i risultati ottenuti in un esperimento ed i risultati attesi sia dovuta al caso. Se la probabilità è alta rispetto a una soglia di accettazione, allora l'ipotesi di partenza è corretta. Se la probabilità è bassa, l'ipotesi va scartata.

Il modello di Mendel prevedeva lo studio del *Pisum sativum*, pisello odoroso. Questa pianta aveva delle caratteristiche semplici e di facile studio.

-Facile reperibilità

-Vasta gamma di forme e colori

-Possibile autoimpollinazione e impollinazione incrociata

-Basso costo

-Facilità di coltivazione

-Poco spazio

-Tempi generazionali brevi

-Elevata progenie

I caratteri che Mendel studiò furono principalmente 7. Seme liscio e rugoso. Colore giallo o verde. Colore petali viola o bianco. Forma del baccello liscio o rigonfiato. Baccello verde o giallo. Fiori terminali o assiali. Rami lunghi o corti.

FENOTIPO: sinonimo di carattere. Tutto ciò che è osservabile, misurabile. Può essere l'insieme di caratteri oppure un solo carattere. La quantità di globuli rossi presenti in circolo è anch'esso un fenotipo. La Sindrome di Down è un fenotipo. Fenotipo ha un'accezione piuttosto ampia.

-Che tipo di controllo è stato utilizzato? Rimuovere le antere della pianta ricevente per evitare che ci possa essere autoimpollinazione, etc...

**PRIMA LEGGE DI MENDEL:** legge della dominanza. Esistono dei caratteri che, incrociandosi, spariscono per una o più generazioni. Questi caratteri vengono definiti "recessivi", mentre quelli che permangono vengono detti caratteri "dominanti". Si partiva sempre da linee pure, ovvero piante che di generazione in generazione producevano sempre il solito carattere o fenotipo (es. petalo viola o petalo bianco). La generazione di partenza viene definita generazione parentale, P, F<sub>0</sub>. Le generazioni successive vengono definite generazioni filiali F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub> e così via a seconda della quantità di incroci tra le generazioni.

La teoria prevedeva:

1. Esistenza di "geni" (natura particolata dell'eredità)
2. I geni sono presenti a coppie
3. Principio di segregazione gametica
4. Contenuto dimezzato di geni nei gameti
5. Casualità della fecondazione

**ALLELE:** una variante di un determinato gene. Un gene specifica per il colore del seme, gli alleli sono delle varianti omologhe ma non identiche.

**DOMINANZA:** un carattere dominante (lettera maiuscola) che continua a manifestarsi e a prevalere sull'altro carattere durante le varie generazioni.

**GENOTIPO:** costituzione allelica dell'individuo (Y/Y, y/y omozigosi, Y/y eterozigosi).

-I due membri di una coppia genica si separano finendo nei gameti, metà dei quali riceve un membro, l'altra metà riceve l'altro membro.

-I due alleli di un dato locus segregano nei gameti, metà dei gameti porteranno un allele e l'altra metà porterà l'altro allele.

La genetica è la scienza che studia l'ereditarietà, come le variazioni sono trasmesse da una generazione all'altra.

La genetica molecolare è lo studio di come il DNA trasporta le informazioni genetiche e di come le cellule utilizzano queste informazioni.

L'incrocio tra due linee pure (seme giallo e seme verde) della generazione parentale P porta a un ibrido nella generazione F<sub>1</sub> (semi gialli ma che portano anche i geni dei semi verdi). Le piante ibride della F<sub>1</sub> venivano autofecondate producendo la progenie della generazione F<sub>2</sub>. Questi semi della F<sub>2</sub> presentavano in proporzione 3:1 colori gialli e verdi. I gialli potevano dare origine a piante che producevano semi gialli e piante che presentavano semi verdi.

$\frac{1}{4}$  semi gialli,  $\frac{1}{4}$  semi verdi,  $\frac{1}{2}$  linea ibrida gialla (eterozigote) a livello genotipico.

gialli : verdi = 3:1 a livello fenotipico.

Si disegna il quadrato di Punnett per calcolare i caratteri delle varie generazioni, fecondazioni, autofecondazioni, etc...

**TEST CROSS:** è un incrocio sperimentale tra un individuo con fenotipo dominante ma genotipo sconosciuto e un individuo con fenotipo recessivo (che può essere solamente omozigote) che ha lo scopo di determinare il genotipo del primo individuo.

Dal punto di vista molecolare... un locus genico è la posizione all'interno di un cromosoma dove si trova un determinato gene. Si hanno due copie di uno stesso gene, detti alleli. Le differenze nella segregazione si basano sulle differenze nelle sequenze del DNA di questi particolari loci genici.

**CHI-QUADRATO**

Y/y x y/y (Giallo eterozigote x verde)

Otengo 55 gialli e 65 verdi. Il valore atteso è 60, ovvero la metà dei semi totali (120).

1. H<sub>0</sub>: la ratio è 1:1. Mi aspetto 60 gialli e 60 verdi.
2. Misurare la probabilità che per solo effetto del caso osservi i numeri dell'esperimento data per vera H<sub>0</sub>.

Formula Chi-quadrato statistico:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(o_i - e_i)^2}{e_i}$$

(Osservate-Attese) ^2/Attese. Più il valore è basso e più significa che le osservate e le attese sono simili. Il termine gradi di libertà significa che i numeri sono liberi di variare in una somma. In una somma con due addendi, se un addendo è 50 e la somma totale è 120, significa che l'altro addendo deve essere 70, il che significa che esiste solo un grado di libertà per il primo addendo. I gradi di libertà incidono sul parametro in un certo modo, alterando il calcolo probabilistico. Il parametro del Chi-quadrato mi definisce un'area della curva di distribuzione del chi-quadrato. Tutta l'area vale 1, il parametro che trovo mi definisce il valore dell'area che stavo cercando.

Se io ho una probabilità inferiore del 5%, la differenza tra osservate e attese ha una probabilità molto piccola e quindi devo rifiutare l'ipotesi zero H<sub>0</sub>.

#### ANALISI ALBERI GENEALOGICI

Probando: il primo della famiglia a cui viene scoperto un determinato fenotipo.

I tipi di eredità sono 7:

- Autosomica recessiva
- Autosomica Dominante
- Recessiva legata all'X
- Dominante legata all'X
- Legata all'Y
- Casi di co-dominanza (Dominanza Intermedia)
- Mitocondriale/Citoplasmatica

#### CARATTERI AUTOSOMICI RECESSIVI

I portatori non presentano un determinato carattere.

Fenilchetonuria, Albinismo e Fibrosi Cistica sono le principali malattie autosomiche recessive presenti.

La fenilchetonuria, che attraverso la fenilalanina idrossilasi viene convertita in Tirosina, in questo caso è convertita in Acido fenilpiruvico che è neurotossico per il nostro organismo. Ai neonati viene effettuato uno screening per la fenilchetonuria e, nel caso di positività, viene imposta una dieta povera di fenilalanina.

#### CARATTERI AUTOSOMICI DOMINANTI

-Nanismo Acondroplastico è la principale malattia genetica di questo tipo. Acondroplasia significa che non si sviluppano per bene alcuni tessuti cartilaginei, soprattutto quelli che risiedono nelle epifisi delle ossa lunghe degli arti.

-Sindrome di Marfan è un'altra sindrome nota per il suo carattere autosomico dominante. Si presenta con petto carenato, aracnodattilia, dislocazione del cristallino, cedimento dell'aorta, allungamento degli arti.

-Corea di Huntington è una malattia di tipo neurologico degenerativo che ha un esordio dopo una certa età (40-50 anni). Corea è da intendere come danza, o meglio come tremore (Ballo di San Vito) in quanto esordisce con disturbi comportamentali o di carattere, come l'incapacità di muoversi normalmente.

Se una persona è portatrice, solitamente comincerà a svilupparla intorno ai 40-50 anni nel 50% dei casi.

**PENETRANZA**: percentuale di persone che sviluppano un determinato fenotipo avendo un determinato genotipo. Il tratto c'è o non c'è.

**ESPRESSIVITA'**: presenza del fenotipo che si esprime con modi e gradi diversi di espressività. Si definisce per colore che ce l'hanno: può essere di grado basso, medio o alto.

-Esadattilia: i soggetti presentano 6 dita invece che 5.

-Piebaldismo: i soggetti presentano chiazze di depigmentazione soprattutto sulle gambe e sulla schiena.

## APLOSUFFICIENZA ENZIMATICA

Abbiamo un individuo affetto da fibrosi cistica (probando). Non ci sono cure per la FC.

I genitori sono entrambi eterozigoti, portatori della malattia.

Posso avvalermi di un sito di restrizione, ovvero un sito che può essere sensibile all'azione di endonucleasi di restrizione. Funzionano come delle forbici che tagliano pezzi di DNA di circa 4-5 nucleotidi. Una sequenza può essere palindromica e quindi venire riconosciuta dal sito di restrizione, oppure non essere palindromica e quindi non venire riconosciuta. Si utilizzano delle sonde (es. biotina), ovvero pezzi di DNA complementari a determinate sequenze, che marciano determinate sequenze di DNA. Prima digerisco il DNA, lo taglio a pezzetti con le endonucleasi, lo faccio correre in un gel di agarosio. Il gel, sostanza gelatinosa, fa da setaccio molecolare: è un polimero di zuccheri che a seconda della percentuale di concentrazione fa migrare il DNA verso il polo positivo mediante un campo elettromagnetico. Il setaccio rallenta i frammenti più grandi di DNA mentre i pezzi più piccoli migrano velocemente. Ho una serie di bande di dimensioni differenti, le bande le posso trasferire su filtri di nitrocellulosa (Southern Blotting). Sul gel viene posto il filtro e viene effettuato un trasferimento in verticale e quindi il DNA si trova ad appiccicarsi al filtro di nitrocellulosa.

Utilizzo la sonda e vedo dove si attacca, vedendo anche su quale banda si attacca e la dimensione.

Se il taglio non avviene, abbiamo un'unica banda ad alto peso molecolare; se il taglio avviene, si hanno più bande di minor peso molecolare. Il sito di restrizione cade nel punto in cui si ha una mutazione.

A livello di RNA, cosa vedo? Niente di importante (Northern Blotting). A livello di proteine potrei vedere che la variante della mutazione mi ha introdotto una qualche modifica biochimica, per esempio un amminoacido al posto di un altro oppure l'introduzione di un codone di stop. La proteina può migrare in un gel in maniera differente (Western Blotting). Qualora ci fosse un codone di stop, la proteina è più corta e nel Western migrerebbe più velocemente, andando più in basso.

Quando si parla di dominanza/recessività bisogna considerare cosa succede nell'eterozigote. Quando un allele domina sull'altro bisogna andare a vedere cosa succede a livello molecolare/biochimico.

Nel caso della Fenilchetonuria, se io sono eterozigote, non mi si accumula la fenilalanina perché c'è un enzima che provvede alla trasformazione dalla fenilalanina alla tirosina. Una copia è sufficiente. Gli enzimi sono i catalizzatori delle reazioni, ovvero quelle molecole che accelerano le reazioni chimiche, non alterandone l'equilibrio termodinamico. Una reazione chimica si può rappresentare con una sorta di grafico di energia di attivazione. Gli enzimi abbassano l'energia d'attivazione, per esempio catturando le molecole reagenti e facendo in modo che reagiscano tra di loro e formino altre molecole (prodotti). Creano le condizioni perché avvenga una reazione, ma possono essere riutilizzati per altre reazioni.

Gli enzimi accelerano il processo per cui la fenilalanina si trasformi in tirosina, e anche avere una sola copia permette questa reazione. Avere una copia è una condizione sufficiente per cui si può ottenere la reazione richiesta, senza che il fenotipo indesiderato si manifesti.

## EREDITA' LEGATA AL SESSO

Il cariotipo è presentato in maniera che si abbia un gruppo di autosomi e un paio di cromosomi sessuali. La forma ad X si riferisce alla metafase, l'unico momento in cui i cromosomi possono vedersi in questa forma. Molti studi che riguardano la segregazione dei cromosomi sessuali cominciarono con lo studio di *Drosophila melanogaster* (moscerini della frutta). Le femmine sono XX, i maschi XY.

Nel cromosoma Y umano vi sono pochi geni, e sono quei geni che si occupano di differenziazione testicolare, produzione di testosterone con conseguente differenziamento dei caratteri sessuali primari e secondari, ultimando con il morfotipo maschile.

Mammiferi:

-XXY: maschio

-XXXY: maschio

-XO: femmina

Drosophila:

- XXY: femmina
- XXXY: femmina
- XO: maschio

Il cromosoma Y presenta 3 porzioni principali nel mammifero: una componente detta Regione di Omologia (pseudo-autosomica), presenta geni omologhi che permette l'appaiamento alla profase della divisione meiotica (presenta un chiasma). La seconda componente di geni che sono espressi solo nell'Y e la terza componente costituita da DNA altamente ripetuto (junk) che costituisce il centromero e l'eterocromatina centromerica/costitutiva. L'X ha la regione pseudo-autosomica. Il maschio porta una copia sola e viene detto emizigote.

Carattere Occhio Bianco

Carattere Occhio Rosso: wild-type

### CARATTERI RECESSIVI LEGATI ALL'X

Visibili preferenzialmente nei maschi che nella loro emizigosi svelano direttamente l'allele.

Daltonismo (cecità ai colori), Distrofia Muscolare di Duchenne (DMD), Emofilia, Femminilizzazione testicolare sono i principali.

### CARATTERI DOMINANTI LEGATI ALL'X

-Ipofofosfemia resistente a vitamina D

-Sindrome di Rett che colpisce le femmine, i maschi muoiono in utero

-Sindrome di AICARDI, agenesi del corpo calloso con i due emisferi che lavorano separatamente

-Lyonizzazione, inattivazione del cromosoma X. Una delle due copie dell'X va incontro ad inattivazione perché la cromatina si condensa ed è inaccessibile, detta corpo di Barr. L'inattivazione viene poi ereditata nelle successive generazioni. Le femmine si possono definire mosaici.

Esempi sono le gatte tartarugate, la gatta calica.

### ASSORTIMENTO INDIPENDENTE

Le piante che differiscono per due caratteri sono dette diibridi.

Nelle generazioni prime si trovano quasi sempre linee pure (es. RRyy x rrYY).

Solitamente, la generazione F1 viene autofecondata. Il rapporto atteso nella F2 era 9/16 per il doppio dominante, 3/16 per ognuno dei caratteri un dominante e uno recessivo e 1/16 per il completo recessivo.

Questi rapporti andavano valutati statisticamente, basandosi sull'ipotesi nulla che i loci fossero indipendenti. Combinazione di rapporti semplici.

Si fa il test del chi quadrato anche per i diibridi nello stesso modo.

### BASI CROMOSOMICHE DELL'ASSORTIMENTO INDIPENDENTE

I geni stanno sui cromosomi, con la base che i cromosomi sono fatti di DNA. Le basi cromosomiche dell'eredità dovevano trovare una logica sulla base degli esperimenti di Mendel.

Si pensò che cromosomi diversi portassero geni diversi, anche se vi erano più geni dei cromosomi osservabili. I cromosomi, prima della fase S (interfase), si trovano in forma libera. I cromatidi fratelli sono visibili nella profase, dove i cromosomi e i centromeri si sono replicati ma non si sono ancora divisi.

Aa e Bb. Può succedere che A segreghi con B, ma anche con b. Similmente, a può segregare sia con B che con b.

In realtà, c'è quasi sempre un chiasma obbligatorio. Quando un cromosoma è grande, possono essercene anche 2/3/4. Quando due loci genici sono sullo stesso cromosoma, ma sono sufficientemente distanti tra di loro,

può avvenire che i cromosomi si allineino alla profase e si può avere un chiasma in modo che ci sia la ricombinazione almeno di uno dei due cromosomi omologhi. Una volta avvenuto il chiasma, alla prima meiosi si ha una segregazione dei cromosomi ricombinati. O c'è una segregazione indipendente perché stanno su cromosomi diversi, oppure perché stanno sufficientemente lontani dal punto di vista della ricombinazione e al loro interno avviene uno dei chiasmi obbligatori.

#### SINTESI DI LINEE PURE

Ibrido Yy. Se si autofeconda,  $\frac{1}{4}$  YY,  $\frac{1}{2}$  Yy,  $\frac{1}{4}$  yy (prima legge di Mendel).

Se io volessi sintetizzare una linea green, solo  $\frac{1}{4}$  di questa generazione sarebbe utile. Se io autofecondo il prodotto della F1, ottengo  $\frac{1}{4}$  YY,  $\frac{1}{4}$  yy, e per quanto riguarda l'ibrido autofecondato ottengo  $\frac{1}{8}$  YY,  $\frac{1}{4}$  Yy,  $\frac{1}{8}$  yy. Riduco la quota di eterozigosi se continuo ad autofecondare. Si incrociano fratelli e sorelle provenienti da linee pure, fino a che non si riesce quasi del tutto a sradicare l'eterozigosi.

#### EREDITA' EXTRA-NUCLEARE

I mitocondri sono una reminiscenza ancestrale. Ha le caratteristiche di DNA procariota e subisce divisione in maniera indipendente dal nucleo, generando mitocondri figli.

Fino a poco fa, si sapeva che era la madre a donare l'eredità mitocondriale (matrilineare). Qualche eccezione esiste a questa regola e qualche mitocondrio può entrare insieme alla testa dello spermatozoo. Non vi è ricombinazione tra genomi mitocondriali secondo gli studi che sono stati effettuati fino ad ora, e si ritiene che il genoma mitocondriale venga propagato nei figli dalla madre. Vi è però un'evoluzione del genoma mitocondriale, generando diversità tra diversi discendenti a seconda di mutazioni minori. Se ci fosse ricombinazione, le mutazioni dei vari genomi mitocondriali potrebbero anche sussistere insieme, ma non si potrebbe ricavare un albero evolutivo. Abbiamo una doppia dinamica: gli spostamenti migratori e un'evoluzione a livello di mutazioni. Ogni tot generazioni si crea un nuovo derivato rispetto al genitore. Si parla di aplotipo, ovvero una combinazione di alleli (o mutazioni).

E' stata osservata la presenza di rami verdi, bianchi e maculati/variegati all'interno della stessa pianta (Mirabilis jalapa). E' stata la prima manifestazione di **Eteroplasmia**. Si basa sul fatto che, durante la citodieresi, c'è già un numero sufficiente di cloroplasti, e il processo di segregazione degli organuli permette alle cellule figlie un corredo abbastanza completo. Potrebbero esserci delle mutazioni nei cloroplasti che non gli permettono di assorbire la clorofilla. Se vi è una eteroplasmia, ovvero una variegazione del DNA del cloroplasto, può succedere che una delle cellule figlie abbia un ridotto numero di cloroplasti insufficiente a manifestare una colorazione, producendo una pianta variegata con chiazze. Il fenomeno può amplificarsi nella produzione degli ovociti. Si possono avere ovuli con pochissimi cloroplasti e ovuli con cloroplasti completi.

Il DNA mitocondriale subisce stress ossidativo e i sistemi di riparazione sono deboli, producendo mutazioni. Gli organi che risentono della disfunzione mitocondriale sono quelli che utilizzano più energia: retina, cuore, cervello, muscoli, apparato gastro-intestinale, cervello. Vi è un cross-talk tra i geni nucleari e quelli mitocondriali. Le proteine, una volta sintetizzate, possono essere trasportate nel mitocondrio per svolgere determinate funzioni. I mitocondri sono anche coinvolti nell'apoptosi cellulare. I geni mitocondriali hanno funzione di regolazione di embriogenesi, crescita di cellule/tessuti.

#### PENETRANZA ED ESPRESSIVITA'

Penetranza incompleta: si esprime in %, definita come la quota di individui che presentano il fenotipo atteso. Il fenotipo c'è o non c'è.

Espressività variabile: quanto il fenotipo viene espresso (chiaro, medio, scuro).

## INTERAZIONI GENICHE

Capire come gli alleli di uno stesso locus e come due loci genici possono interagire tra di loro.

Un'interazione è quella relativa a due alleli dello stesso locus genico, detta **aplosufficienza**. Il classico esempio è quello degli enzimi del metabolismo. Una mutazione sulla sequenza del DNA può tradursi in una disfunzione delle proteine prodotte.

-**Dominanza per aplosufficienza**: meccanismo non legato agli enzimi. La quota piena produce il fenotipo adeguato, la quota eterozigote dimezzata produce aplosufficienza per cui una dose è sindromica, mentre due dosi di mutazione sono letali. Esempio Sindrome di Alagille.

-**Dominanza negativa**: il wild-type produce catene funzionali che dimerizzano, mentre averne anche una sola copia di mutante produce catene che sono per metà funzionali e per metà mutate e non funzionali. Solo  $\frac{1}{4}$  del prodotto genico produce catene funzionali che ha attività. Esempio Osteogenesis imperfecta, produce fragilità estrema delle ossa variabile nei diversi individui senza minare la fertilità.

-**Dominanza per guadagno di funzione (gain of function)**: come nel nanismo acondroplastico. I condrociti devono produrre collagene e poi smettere di crescere nelle ossa. Devono svilupparsi e poi si devono fermare, questo controllo è dovuto a una disinibizione. L'inibizione, che non ci dovrebbe essere dopo un certo momento, continua ad esserci lo stesso perché l'inibitore non ferma il processo. Mantiene la funzione attiva anche quando la funzione dovrebbe fermarsi, è una mancanza di assenza. Tiene inibiti i condrociti. Le gain of function si contrappongono alle loss of function.

La proteina mutante mantiene l'attività biologica.

-**Dominanza negativa con guadagno di funzione**: esempio Sindrome di Li Fraumeni (molteplici tipi di cancro all'interno di un nucleo familiare), coinvolgimento della p53 che si occupa di ciclo cellulare e funzioni antitumorali della cellula (come apoptosi). La p53 è un tetramero ed un fattore di trascrizione. Basta l'eterozigosi per causare la sindrome. Non si trovano delle loss of function. Basta una catena delle 4 mutante e il fattore di trascrizione nel suo complesso già conferisce una deregolazione. P53 wild-type attiva geni soppressori tumorali e induce il differenziamento con perdita della staminalità.

-**Dominanza incompleta**: l'eterozigote presenta un tratto intermedio tra le due linee pure. Es. piante a petali Viola (Dominante), Bianchi (Recessivo), Rosa (Eterozigote).

-**Codominanza**: il fenotipo dell'eterozigote permette di vedere entrambe le caratteristiche dei due genitori di linea pura. Un classico esempio è il sistema dei gruppi sanguigni ABO, in cui IA e IB sono codominanti e producono il fenotipo IAIB.

Fenotipi (tipo sangue)	Genotipo
Tipo A	$I^A I^A$ or $I^A i$
Tipo B	$I^B I^B$ or $I^B i$
Tipo AB	$I^A I^B$
Tipo O	$i i$

## QUANTITATIVE TRAIT LOCI

Un carattere quantitativo è un carattere fenotipico variabile in modo continuo, come ad esempio l'altezza di una pianta. Un QTL è una regione del DNA associata ad un particolare carattere quantitativo. E' strettamente associata ad un gene che determina il carattere fenotipico in questione o partecipa nella sua determinazione. Normalmente, un carattere quantitativo è determinato dalla somma dell'azione di più geni. Di conseguenza, quindi, più QTL che possono trovarsi anche su cromosomi diversi, possono essere

associati ad un singolo carattere. Per quanto riguarda l'altezza di una pianta, ad esempio, il numero di QTL può fornire informazioni sull'architettura genetica del carattere: può indicare se l'altezza della pianta è determinata da molti geni in cui l'effetto di ogni gene è di portata limitata, oppure se è determinata da pochi geni che hanno un effetto più marcato.

I QTL, quindi, identificano una particolare regione del DNA come contenente un gene che è associato ai tratti posti sotto esame.

Si parla di eredità poligenica, in cui il risultato sommativo dell'espressione di due o più geni determina un unico carattere fenotipico. Molti caratteri umani, come l'altezza, il colore degli occhi, il colore della pelle e così via variano all'interno della popolazione senza presentare chiare suddivisioni proprio a causa dell'elevata quantità di geni coinvolti la cui minima variazione comporta un lieve cambiamento fenotipico. Le differenze tra i vari individui sono rappresentate da una curva a campana, il cui apice rappresenta i valori medi dei caratteri presi in considerazione, come ad esempio l'altezza. Caso opposto alla pleiotropia, in cui un singolo gene agisce su più caratteri.

Considerando un modello di ereditarietà poligenica (l'altezza), si riscontrano le seguenti caratteristiche:

- I geni che controllano il carattere non sono associati, quindi assortiscono indipendentemente
- Il carattere è controllato da tre geni, ciascuno dei quali può presentare due forme alleliche (A, a, B, b, C, c)
- Ogni allele dominante contribuisce in egual misura al fenotipo, mentre gli altri alleli recessivi non danno alcun contributo
- L'effetto che ciascun allele dominante esercita sul fenotipo è piccolo ed additivo

#### PRINCIPI GENERALI PER L'EREDITA' POLIGENICA

1. Tra individui esiste una gradazione continua nel grado di espressione del carattere
2. Quanto maggiore è il numero di loci, tanto più la variazione è continua
3. Al crescere del numero di loci, la proporzione di genotipi estremi nella progenie diminuisce
4. I caratteri poligenici tendono a mostrare generazioni F1 con valori intermedi rispetto alle linee pure parentali
5. La variabilità fenotipica in F2 di solito è maggiore di quella in F1 e gli estremi sono determinata dalla generazione parentale (F0)

Tre loci A, B, C che interagiscono tra loro in maniera additiva. Ogni locus può avere due alleli, quello recessivo non aggiunge nulla al fenotipo mentre quello dominante aggiunge al fenotipo e determina in parte le caratteristiche.

Se i geni che controllano un carattere sono due, le classi fenotipiche in F2 sono cinque, ciascuna delle quali ha 4, 3, 2, 1, o nessun allele dominante. Man mano che aumenta il numero di geni che controllano un carattere, i fenotipi finiscono con il sovrapporsi distribuendosi in modo continuo. Con l'aumentare dei loci che controllano un carattere, aumenta il numero di classi fenotipiche. Con l'aumentare del numero delle classi le differenze tra esse diminuiscono.

Fenocopia: copie di un fenotipo. Stesso fenotipo dato da genotipi diversi.

#### BEADLE e TATUM

Ciclo replicativo di *Neurospora crassa* (muffa pane), ciclo asessuale basato su dispersione e germinazione di spore. C'è anche la via sessuale, due sessi diversi di queste spore vengono in contatto e si fondono formando un'entità diploide (zigote). Lo zigote produce meiosi.

Il wild-type di *N. Crassa* è definito anche prototrofo, in grado di sintetizzare una serie di composti a partire da terreno minimo (fonte di carbonio e sali). Vive senza bisogno di additivi. A un dato momento, i conidi, ovvero i contenitori che sono sempre nella fase vegetativa, sono stati mutagenizzati con radiazioni ionizzanti. Erano mutanti per alcune varianti metaboliche. Vengono messi in coltura quelli mutagenizzati con quelli di sesso opposto in modo che ci fosse la meiosi con le spore figlie del concepimento. Le spore

figlie sono state chirurgicamente aperte e messe in coltura in provette separate in terreno completo (ricco di aminoacidi tale per cui se c'è una disfunzione metabolica non la seleziono). Diedero vita alle ife, al micelio, etc. La logica prevede che si vedano mutanti metabolici. Prendo da ciascuna provetta una quota e la metto in terreno minimo (fonte di carbonio e Sali). Se avessi un mutante disfunzionale che non riesce a produrre qualche elemento, non dovrei vederlo crescere. L'assenza di crescita su terreno minimo è indice di mutante metabolico, cresce solo in terreno completo. Riprendo la provetta madre che cresce in terreno completo e la testo in varie condizioni. La dissemino in terreno completo (controllo positivo) e un'altra parte in terreno minimo (controllo negativo). Aggiungo anche in terreno minimo con addizione di vitamine e in terreno minimo addizionato con aminoacido e vedo che nell'ultimo caso non cresce.

Risemino in terreno minimo con i vari aminoacidi separatamente e vedo che non cresce in assenza di arginina, quindi è diventato auxotrofo per l'arginina. La biosintesi dell'arginina avviene in passaggi, deriva dalla citrullina e prima ancora dall'ornitina. Ornitina (enzima A) → Citrullina (enzima B) → Arginina (enzima C). Le varie fasi sono controllate da enzimi. Hanno studiato la catena biosintetica.

Ogni mutante considerato, ha un blocco specifico in un punto della catena metabolica: alcuni sull'enzima A, altri sul B e altri ancora sul C.

Furono fatti esperimenti di complementazione.

Beadle e Tatum capirono che i geni codificano per funzione. Qui avevano trovato il parallelismo tra un gene ed un enzima. Dimostrarono che a ogni ceppo corrispondeva una mutazione in uno specifico punto della catena metabolica, quindi ad un enzima. Ogni mutante per un particolare gene corrispondeva a un mutante per una particolare proteina.

### Un gene → un enzima

Oggi si sa che il gene non corrisponde solo ad un enzima, ma anche a una catena polipeptidica, a un mRNA e così via. Non si capiva come un gene potesse esprimersi in un determinato carattere.

**COMPLEMENTAZIONE GENICA:** individuo A ha un difetto e individuo B ha un difetto. Siccome i geni sono su loci diversi, uno complementa l'altro e si ha un fenotipo normale.

Wild-type: petali blu

Mutanti \$, £, yen: petali bianchi

Sono coinvolti uno o più loci per il fenotipo bianco? Faccio un test di complementazione.

Incrocio yen e \$, nella F1 trovo complementazione: gli ibridi presentano petali blu. Il difetto stava in due geni diversi. Incrocio yen e £, nella F1 c'è complementazione. Incrocio \$ e £, non complementano. In qualche modo, sono mutanti nello stesso gene.

Il modello metabolico può prevedere un precursore 1, che con un enzima 1 produce un precursore 2 che attraverso l'enzima 2 produce il fenotipo blu.

Complementazione in famiglie: sordità, malattia recessiva. La complementazione si può effettuare anche sperimentalmente, soprattutto per quanto riguarda i sistemi a livello nucleotidico. Il modello sperimentale sono i pazienti di Xeroderma pigmentosum, in cui i bambini sviluppano fotofobia e facilità ad ustionarsi all'esposizione al sole. Alta incidenza di tumori della pelle; vi sono dei deficit nella riparazione del DNA.

Un gruppo di complementazione è un gruppo di campioni che non complementano tra di loro perché hanno lo stesso difetto nello stesso gene.

Serpente corallo con strie arancioni, nere e rosse. Abbiamo un gene che codifica per il pigmento nero e un gene che codifica per il pigmento arancione. Qualora ci fosse un mutante sul nero, abbiamo fenotipo arancione; se fosse sull'arancione, avremo un fenotipo nero. Il doppio mutante sarebbe albino.

Considerando due linee pure Arancione e Albino produrrebbe tutte le varietà, producendo fenotipo 9:3:3:1. Quando due geni sono nella stessa linea metabolica a produrre il pigmento.

Biosintesi viole → (A) → V1 → (B) → V2

Se avessimo blocco su A, non si vedrebbe niente, e così nemmeno se il blocco fosse su B.

**EPISTASI**

Bianco (enzima 1) - Magenta (enzima 2) - Blu. Se ho un blocco nell'enzima 1, mi fermo al bianco. Si dice che il gene del bianco è epistatico sul magenta, e che il magenta è ipostatico sul bianco. Un gene maschera l'altro → Epistasi recessiva

Errori congeniti del metabolismo: fenilchetonuria (fenilalanina x tirosina), albinismo (tirosina x melanina), cretinismo (tirosina x tironina), tirosinosi, alcaptonuria...

**SOPPRESSIONE:** interazione tra loci, due molecole che interagiscono. Supponiamo ci sia una proteina dimerica, e il dimero è dato m e s (entrambi wild-type). Una prima mutazione può produrre un cambiamento conformazionale di una delle due proteine in modo che non ci possa più essere interazione tra le due, e quindi il dimero è inattivo. La doppia mutazione può ripristinare l'interazione. Può esserci anche una soppressione intragenica, all'interno di uno stesso gene; non deve riguardare per forza due geni diversi.

tRNA soppressore. C'era un virus su E. coli (batteriofago). Mutazione del virus in cui non si produceva un certo tipo di proteina. E. coli, il ceppo in questione, permetteva l'infezione perché aveva una mutazione nel tRNA.

**GENETICA BATTERICA** (capitolo 5)

Geni vicini tra di loro. Il modello più semplice è costituito da virus e batteri, che presentano un unico cromosoma.

L'organismo modello è Escherichia coli, presenta cromosoma circolare con circa 4000 geni. Le modalità con cui un batterio può ricevere DNA e fare ricombinazione sono svariate: la trasformazione, che prevede l'assorbimento/internalizzazione di frammenti di DNA nel protoplasma, la coniugazione e la trasduzione.

Terreno minimo: Sali, tampone (pH entro range definito), fonte di carbonio (tipicamente glucosio).

Arg<sup>-</sup>: incapaci di crescere senza aggiunta di arginina, lac<sup>-</sup>, bio<sup>-</sup>, str<sup>®</sup>: resistenza alla streptomina.

**TRASFORMAZIONE BATTERICA:** esperimento di Griffith. Cellule ceppo R (rough) e S (smooth).

C'è una struttura a posta che lega e internalizza il DNA trasformandolo in singola elica, facilitando il processo di ricombinazione. Il filamento di DNA omologo al cromosoma ospite trova dei punti dove viene ricombinato. Gli eventi di ricombinazione devono essere due. La trasformazione può far capire se due geni sono vicini oppure lontani. Supponiamo che un ceppo ricevente sia bio<sup>-</sup>, arg<sup>-</sup>, leu<sup>-</sup>; viene sottoposto a trasformazione perché gli si danno delle frattaglie di un ceppo che è bio<sup>+</sup>, arg<sup>+</sup>, leu<sup>+</sup>. Ci sono dei frammenti di DNA che possono venire internalizzati, e il ceppo può diventare +. Questi ceppi li faccio crescere in terreno minimo per vedere se diventano +.

**CONIUGAZIONE BATTERICA**

Esperimenti indicavano che c'è un ceppo batterico (A<sup>-</sup>) che ha auxotrofia per met<sup>-</sup>, bio<sup>-</sup>. In terreno minimo non cresce. Un altro ceppo (B<sup>-</sup>) è speculare, auxotrofo per thr<sup>-</sup>, leu<sup>-</sup>, thi<sup>-</sup>. Videro che quando si mescolavano, queste colonie diventavano capaci di crescere in terreno minimo.

Ceppo A e B fisicamente impossibilitati a mescolarsi, con filtro sottile che li collega.

Il ceppo A fu reso resistente alla streptomina e poi veniva mescolato col ceppo B. Messi insieme, venivano piastrati in terreno minimo e veniva aggiunta la streptomina. Le cellule miscelate crescevano. Il ceppo A era donatore e il ceppo B ricevente, coniugati tra di loro mediante un pilo.

Ceppo donatore A: fertile, str(s)

Ceppo ricevente A: sterile, str<sup>®</sup>

Messe insieme, diventano tutte resistenti alla streptomina e diventano fertili (1/3). Si postulò ci fosse come un agente infettivo, un fattore F di fertilità a carattere infettivo. I donatori vengono detti F<sup>+</sup>, i riceventi F<sup>-</sup>. Le cellule F<sup>+</sup> hanno un plasmide che le rende donatrici, però nel fare questa operazione si vede che di gran lunga il fattore F è quello che viene donato altamente e preferenzialmente. Una cellula F<sup>+</sup>

produce il pilo che permette di donare il plasmide stesso e quindi il fattore F di fertilità. La frequenza con cui un batterio F- incubato con F+ fa sì che i batteri F-, con altissime frequenze, diventano F+ e quindi in grado di donare anche loro.

Il fattore F viene donato con una frequenza di almeno 30%, mentre i marcatori cromosomici come met, bio, arg vengono donati con una frequenza di 10(-7) circa. Si scoprì la presenza di ceppi che potevano trasmettere il marcatore che sta sul cromosoma a frequenze molto superiori, e sono detti ceppi Hfr. Questi ceppi, incrociati con F-, non sono in grado di produrre alta frequenza di donazione del fattore F. Il fattore F, di tanto in tanto, si integra nel cromosoma e quindi il cromosoma si allunga. Il ceppo F+ può diventare Hfr, non in grado di trasmettere il fattore F, ma pezzetti di cromosoma.

La coniugazione con Hfr è utile per la mappatura genetica perché trasmettono segmenti di cromosoma batterico. Il fattore F diventa il punto d'inizio della trasmissione e la trasmissione avviene con il meccanismo a cerchio rotante, per cui una parte del filamento viene trasmessa normalmente. Si ha una replicazione del DNA con la bolla di replicazione che si apre e nel procedere con la replicazione in realtà viene passato il plasmide come template. Il ricevente si trova a fare una sintesi da template ed esce un singolo filamento. Il fattore F non viene trasmesso per intero, ma solo la parte finale. La trasmissione del cromosoma può avvenire in tempi lunghi.

Una volta finita la coniugazione, abbiamo gli ex-coniuganti e i due genomi che non hanno ancora ricombinato sono detti endogenote ed esogenote (non intero). Il filamento è convertito in doppia elica e specifici enzimi convertono l'esogenote con l'endogenote. Il donatore è wild-type e prototrofo e il ricevente è auxotrofo per qualcosa e poi diventa prototrofo.

Coniugazione interrotta: il ceppo Hfr donatore è sensibile alla streptomicina, mentre il ricevente è sensibile. Vogliamo vedere solo cosa succede alle cellule riceventi che sono auxotrofe.

Tra esogenote ed endogenote un singolo evento di ricombinazione non è sufficiente in quanto non sarebbe vitale. Vi è bisogno di due eventi affinché il DNA esogenote sia inserito nell'endogenote.

Vi è un secondo modo in cui si potrebbe sfruttare la ricombinazione e mappare, e cioè quello di non interrompere la ricombinazione e dare il tempo ai batteri di completarla.

Il ricevente è auxotrofo leu-, arg-, met-; il donatore è prototrofo leu+, arg+, met+. Il trucco consiste, per poter misurare le distanze di ricombinazione, nel fare una selezione in primo luogo per il marcatore ultimo ad entrare. Io so che Hfr prima fa entrare met, poi arg, poi leu. Selezione le cellule riceventi in un terreno privo di leucina, rendendo possibile la crescita a quei batteri che hanno incorporato/sostituito il leu mutante con quello wild-type. Se crescono, saranno anche arg+ e quindi l'evento di ricombinazione è avvenuto dopo arg. Poi faccio un'altra piastra per vedere se saranno anche met+.

La quantità di ricombinanti dipende dalla distanza fisica tra i marcatori. Se ho geni molto vicini, è improbabile che vi sia un evento di ricombinazione che me li separa. Osservo frequenza di ricombinazione molto bassa.

Il fattore di fertilità può fare una terza cosa. Videro che, quando si mette un ceppo fertile, portatore del fattore F e sensibile alla streptomicina, a incubare con un ricevente resistente alla streptomicina e lac-, veniva acquisita la capacità di vivere in un terreno dove il lattosio era l'unica fonte di Carbonio, oltre ad essere diventati resistenti alla streptomicina. Videro anche che, quando perdevano la fertilità, perdevano anche la capacità di crescere in sola presenza di lattosio. Si dimostrò che il fattore F era diverso, portava su di sé anche lac, fu chiamato F'. Si è capito che avveniva, raramente, un fenomeno. Il fattore F fa diventare Hfr quando ci sono delle piccole regioni di micro-omologia e permettono l'integrazione di F nel cromosoma del batterio. Ci possono essere dei motivi per cui F si scinde, operazione reversibile. Può accadere che F sia integrato in prossimità di un gene (lac) e quando viene scisso si porti dietro il gene.

### **RICOMBINAZIONE NEI FAGI**

Una volta che più di una copia di fagi diversi viene inoculata in E. coli, può subire ricombinazione. Se ho due fagi diversi con genomi diversi, una volta inoculati nella cellula possono ricombinare tra di loro essendo omologhi. Dopo la ricombinazione, si può avere una mutazione cis o trans con il wild-type nella configurazione opposta. La distanza tra le mutazioni può essere mappata sulla sequenza di ricombinazione. Andranno in cis più facilmente se sono più lontani.

In una piastra, si mette un tappeto di E. coli e poi si aggiungono i virus a diverse concentrazioni. Si formano placche di lisi chiare corrispondenti ai batteri morti. Vi sono diversi fenotipi riconoscibili in base alle placche: vi sono ceppi più virulenti di altri e possono formare delle placche più grandi per lisi rapida, quelli meno virulenti formano placche più piccole con lisi lenta.

“Mutante”: h-r+, infetta ceppo 1 con lisi rapida (placche grandi)

“Wild-type”: h+r-, infetta più ceppi differenti con lisi lenta (placche piccole)

Studio la distanza tra questi due geni in base alla ricombinazione. Le mutazioni ora sono in trans, per ricombinazione posso avere una nuova particella virale che avrà tutto in cis. Faccio avvenire una co-infezione e vado a vedere il risultato: quante sono rimaste uguali e quante hanno ricombinato. La frequenza di queste ricombinanti mi dà la distanza. Per calcolare la frequenza di ricombinazione si fa la frazione fra le placche ricombinanti e le placche totali (misurata in centi Morgan).

### **TRASDUZIONE**

Lederberg e Zinder nel 1951 scoprirono che la ricombinazione genetica avveniva anche nella *S. typhimurium* utilizzando ceppi auxotrofi LA-3 met- ist- e LA-22 phe- trp-. Si scoprì l'esistenza di fagi. Si distingue la trasduzione in generalizzata e specializzata.

**-GENERALIZZATA:** in seguito a un'infezione di una cellula batterica, il virus provoca la rottura del materiale genetico della cellula stessa e sfrutta i suoi componenti per produrre molte copie di sé. Al termine di questo processo, detto ciclo litico, alcuni frammenti di DNA del batterio possono finire nel capsido delle nuove particelle fagiche in assemblaggio. I virioni con DNA virale e batterico escono dalla cellula dopo averne provocato la lisi.

Le particelle fagiche sono autoassemblanti, e si assemblano intorno al DNA fagico. Per caso, dei frammenti del DNA della cellula batterica che sono dimensionalmente simili a quelli fagici, possono inserirsi nel capsido fagico. Una volta inoculato, vi sono eventi di ricombinazione con conseguente incorporazione del DNA batterico in quello fagico. La co-trasduzione è tanto più alta quanto più i due geni sono vicini tra di loro.

**-SPECIALIZZATA (gene specifica):** quando un virus attacca una cellula batterica, il suo DNA può inserirsi nel cromosoma diventando in grado di duplicarsi con esso. Questa condizione viene detta lisogenia e il batterio è detto lisogenico. Il DNA virale può, in seguito a stimoli, fuoriesce dal cromosoma.

Hfr x F- (infettato da fago lambda). Il fago non ammazza il batterio, il suo genoma si integra nel cromosoma batterico e diventa quiescente. I geni tardivi che entrano alla fine sono i geni repressori della lisi, ma dato che c'erano solo i geni precoci all'inizio c'era l'induzione zigotica. Il fago lambda ha dei siti di attacco all'interno del cromosoma batterico; uno conosciuto è tra gal e bio.

## ASSOCIAZIONE GENETICA E DISTANZE DI MAPPA

Le leggi di Mendel non possono valere sempre.

Geni associati: il primo test che si fa è quello del chi-quadro. Alcuni caratteri non mostrano segregazione indipendente. Morgan formulò la teoria cromosomica dell'eredità: i geni stanno su cromosomi e quando sono vicini c'è associazione. Eccezione alle leggi di Mendel.

Linea parentale:

-wild-type: ali lunghe e corpo grigio

-mutante: ali corte e corpo nero

In F1 la progenie è wild-type per ali lunghe e corpo grigio. Per la F2, si va a fare un test cross con un organismo recessivo. Si osservano tutte e quattro le classi fenotipiche.

I fenotipi attesi sono tutti 1:1:1:1 secondo il quadrato di Punnett. In caso di associazione, è probabile vedere classi diverse. I ricombinanti sono quelli meno rappresentati.

Morgan ipotizzò che occasionalmente segmenti cromosomici durante la meiosi venissero scambiati tra gli omologhi in un fenomeno che definì crossing-over. Coppie di geni che tendono a co-segregare alla meiosi sono definiti associati oppure in linkage. La frequenza dei ricombinanti la prendo come misura della distanza tra i geni.

Si definisce unità di mappa genetica come l'intervallo nel quale avviene l'1% di crossing-over. Più i geni sono lontani e più aumenta il numero di ricombinanti, e quindi di crossing-over. Quando la distanza è eccessiva le due categorie centrali (ricombinanti) hanno lo stesso numero delle categorie parentali. La frazione dei ricombinanti è la metà dei totali e avremo 50 centi Morgan, quindi i due loci sono indipendenti e avremo il rapporto 1:1:1:1.

Si fa primo l'H0 dell'indipendenza con il test del chi-quadro. Se rifiuto l'H0, calcolo la distanza di mappa (ricombinanti/totali).

## LINKAGE GENI SULL'X

sc+/sc+ (femmina) x +f/y (maschio) geni associati che stanno sul cromosoma X.

Gli individui di F1 saranno tutti wild-type per quanto riguarda le femmine. Per i maschi, invece, ereditano sc+ dalla madre e dal padre l'Y. Si incrociano e si cerca di calcolare la distanza di mappa mediante il test cross. Prendo la femmina eterozigote sc +, prendo il maschio sc +/Y. Guardiamo solo i maschi perché la progenie femminile non è interessante.

## REINCROCIO A 3 PUNTI

st: scarlatto

e: ebano

ss: setole corte

Incrociato con wild-type +++

## GENETICA DI POPOLAZIONE

### EQUILIBRIO DI HARDY-WEINBERG

Requisiti per parlare di "popolazione all'equilibrio":

-Gli incroci tra individui della popolazione devono essere casuali

-Tutti i genotipi hanno la stessa vitalità (fitness). Non ci deve essere un allele che da un vantaggio/svantaggio

-Completa possibilità di accoppiamenti, no sottopopolazioni, no limitazioni (geografiche, etniche, religiose)

-Le stime funzionano tanto meglio quanto più grande è la popolazione

Una popolazione si può caratterizzare con 3 indicatori: la frequenza del fenotipo, la frequenza del genotipo, la frequenza dell'allele (quanti A e a ci sono). E' importante stabilire se una popolazione è

all'equilibrio o meno, vedendo se ogni generazione presenta la stessa frequenza genotipica e fenotipica. Se così non fosse, vorrebbe dire che quel carattere è soggetto a selezione naturale o artificiale. Posso stimare quale sia la probabilità di quanti portatori possono esserci all'interno di una popolazione.

La popolazione è all'equilibrio quando, di generazione in generazione, non cambiano le frequenze genotipiche e di conseguenza anche quelle fenotipiche.

AA →  $p^2$

Aa →  $2pq$

aa →  $q^2$

All'equilibrio  $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ .

Quando non c'è equilibrio... supponiamo vi sia una selezione in cui aa è letale. Si rifanno i calcoli e si vede che l'equilibrio non è stato mantenuto (i numeri di partenza non sono uguali agli ultimi calcolati).

### EFFETTI DELLA SELEZIONE GENICA

Selezione contro omozigosi recessiva, ad esempio.

AA = 14, Aa = 13, aa = 3 (morti).

Nella generazione successiva, ho un aumento degli individui con occhio scuro e una diminuzione degli individui con occhio chiaro e, parzialmente, anche degli eterozigoti.

### DERIVA GENETICA CASUALE (RANDOM GENETIC DRIFT)

Effetti casuali che si verificano quando le popolazioni sono piuttosto piccole. Deriva genetica: variazione delle frequenze genotipiche della popolazione, dovuta unicamente al caso.

Si usa la formula della distribuzione binomiale.

### REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA NEI PROCARIOTI ED EUCARIOTI (Cap. 11-12)

#### OPERONE LAC

Jacob e Monod, 1965. Per esprimere dei geni, occorre che vi sia una regolazione.

Il batterio deve adattarsi all'ambiente e, a seconda delle fonti di nutrimento, adeguare il proprio set di enzimi. La fonte principale è il glucosio perché è lo zucchero con cui spende meno energia. In assenza, può nutrirsi anche di saccarosio, lattosio, galattosio, arabinosio. Il primo attrezzo che ha il batterio, è il sensore per capire quale fonte c'è nei dintorni.

Il batterio agisce sulla base degli operoni: il pathway metabolico è costituito da più enzimi e non da uno solo per poter digerire il lattosio. Un operone è un'unità trascrizionale che ha una componente di regolazione e i geni strutturali in catena che servono tutti per un determinato processo. Sono tutti co-regolati. L'operone è un'unità poli-cistronica, riguarda quante proteine sono espresse dentro un unico mRNA. Un unico mRNA, trascritto a partire dalla struttura, contiene 3 geni.

Tra i geni strutturali, abbiamo il sensore definito PERMEASI: una proteina/poro che permette l'eventuale ingresso del lattosio se presente nell'ambiente attraverso specifici canale. Poi abbiamo l'enzima chiave: B-GALATTOSIDASI che scinde il dimero lattosio, producendo una molecola di glucosio e una di galattosio.

Vi è un gene esterno all'operone, detto  $\text{LacI}$ , che sintetizza per il repressore Lac, il quale tiene spento l'operone legandosi a un OPERATORE. E' una sequenza che sta tra il PROMOTORE e i GENI STRUTTURALI. Il promotore è una sequenza che sta a monte di un gene e favorisce il reclutamento della RNA polimerasi in modo tale che possa legarsi e cominciare l'attività di trascrizione producendo mRNA. Se c'è un repressore, l'mRNA non si esplica. Il repressore Lac, legandosi

all'operatore, impedisce la trascrizione. Una volta che il lattosio è entrato nell'ambiente protoplasmatico del batterio, può legarsi al repressore e indurre un cambiamento conformazionale (o allosterico) della proteina. Il repressore ha una tasca specifica per poter legare il lattosio. Qualora il legame con il lattosio avvenisse, si stacca dal DNA e non riesce più a legare l'operatore.

Con il lattosio, l'operone si accende e l'attività trascrizionale aumenta di 1000 volte. Non appena si comincia ad avere la formazione di mRNA, i ribosomi possono legarsi e comandare la traduzione delle proteine. Vi sono delle sequenze dette IRES (Internal Ribosomes Entry Sites), per cui il ribosoma riconosce dei punti dove attaccarsi e comincia la traduzione di proteine come la permeasi, la B-galattosidasi, transacetilasi.

Il lattosio viene anche definito INDUTTORE perché induce l'espressione dell'operone. Induttori migliori del lattosio sono X-gal e IPTG, i quali rimangono sempre a concentrazioni costanti.

Studiarono come funzionasse l'operone grazie alla presenza dei diploidi parziali e dei mutanti. I mutanti sono lac-, che hanno deficit e non sono in grado di far funzionare bene l'operone (o rimane sempre indotto, o non riesce ad indurre, o non riesce a produrre tutti gli enzimi).

La possibilità di avere dei ceppi E. coli F', coloro che hanno sul fattore di fertilità F un pezzetto di cromosoma batterico. Utilizzando la coniugazione, è possibile creare un diploide parziale, ovvero un ceppo ricevente che abbia il normale set dell'operone lac sul cromosoma batterico e, inoltre, una seconda copia arrivata grazie al fattore F.

Il repressore possiede 4 subunità (multimerico), ogni subunità lega l'induttore. Il repressore si lega al DNA, nell'operatore e, in presenza di induttore, il repressore non lega più l'operatore.

L'operatore è una sequenza palindromica.

**MUTAZIONI POLARI:** mutazioni con polarità. Nel caso degli operoni, hanno visto che, se nella seconda proteina (Y) c'è una mutazione, può venire letta come codone di stop. L'mRNA viene distrutto/degradato, viene prodotta solo la B-galattosidasi, ma non la permeasi e la transacetilasi. Se c'è una mutazione non-senso, si crea un innesco che degrada l'mRNA successivo al filamento. L'operone lac ha anche regolazioni superiori. SE ho il glucosio, spengo l'operone lac. Tutto sta nel bilancio energetico del batterio: ATP (Adenosina Trifosfato).

Quando c'è poco ATP, c'è tanto cAMP e viceversa. La proteina CAP risente del catabolita (prodotto di reazione dell'ATP), ovvero dell'cAMP e forma con esso un complesso che stimola o meno la trascrizione dell'operone lac. Sito di legame palindromico. Si lega in cima al promotore e crea un sito dove l'RNA polimerasi può legarsi.

### **OPERONE ARABINOSIO**

Molecola che prima di essere digerita, ha bisogno di una serie di conversioni che impiega una grande spesa energetica. Non viene usato dal batterio a meno che non ci sia altro.

Segue le stesse logiche dell'operone lattosio in quanto ha struttura simile. Abbiamo due sistemi che funzionano, abbiamo 3 geni strutturali (chinasi, isomerasi, epimerasi), abbiamo un operatore, un iniziatore e fuori c'è un gene di controllo detto proteina AraC.

AraC ha un sito che fa più cose: lega il sito iniziatore e l'operatore. Forma una specie di ansa che blocca il tutto (struttura a forcina), chiusura del DNA in modo che l'RNA polimerasi non ha accesso al sistema. Ha anche un sito di legame che fa da sensore per l'arabinosio, il quale subentra e fa modifiche allosteriche che permettono il distacco dell'operatore. L'operatore viene staccato, viene meno l'inibizione. Vi è lo stesso meccanismo di controllo dell'cAMP a partire dal gene crp. Cap-cAMP si lega ad AraC che è legato all'arabinosio. Questo permette l'inserzione dell'RNA polimerasi sul promotore. AraC fa da repressore e da stimolatore.

**ATTENUAZIONE.** Non c'è un corrispettivo nel mondo eucariotico, regolazione nell'operone triptofano (trp). Vi è un repressore che si lega al promotore impedendo la trascrizione. Quando c'è

triptofano, questo non basta. Si osservano mRNA corti e poco funzionali, mentre senza triptofano si ha la completa espressione dell'operone. Vi è una sequenza detta attenuatore tra il promotore e il resto; questa sequenza è subito prima la prima metionina che regola l'inizio della traduzione del primo gene. Una volta che la trascrizione è partita, l'attenuazione è controllata dalla sequenza leader. La sequenza leader, letta dal 5' al 3', ha una serie di triplette che formano le strutture secondarie dell'mRNA messaggero (arricciate). Sono regione pseudo-palindromiche.

Quando l'mRNA si è formato, vi sono dei residui all'interno del ribosoma dove può inserirsi. Il ribosoma traduce una sequenza detta regione leader, ricca di triplette che codificano per il triptofano. Fanno una piccola trascrizione test per vedere se il triptofano c'è ed è sufficiente. Se ci sono alti livelli di trp, il ribosoma procede spedito e fa sì che la velocità con cui il ribosoma copre le sequenze 1 e 2 è più veloce della formazione della forcina 2-3. Si forma la forcina 3-4, e questo è un segnale strutturale che blocca la trascrizione, facendo staccare la RNA polimerasi. Questa è l'attenuazione, in quanto significa che abbiamo trp a sufficienza e non avviene la formazione dei geni strutturali. Se il ribosoma va lento e c'è poco trp, si dà modo alla polimerasi di procedere e si forma la forcina 2-3, ma non la 3-4.

### **TRASCRIZIONE NEGLI EUKARIOTI**

Lievito. Regulone Galattosio. Vi sono 6-7 geni co-regolati che si appaiano tutti insieme quando è presente il galattosio come unica fonte di carbonio. Non sono tutti in un'unica unità poli-cistronica: sono 6-7 geni strutturali distinti in loci diversi ma co-regolati. L'elemento fondamentale è Gal4, che si presenta in forma dimerica e ha 3 componenti: DNA binding domain, un linker domain e un dimerization domain e il transactivation domain (stimola attivazione in trans) e il dominio che lega l'effettore Gal80.

Gal4 da l'innescò per l'attivazione della trascrizione. I cis active elements sono definite sequenze UAS (upstream activation sequences) stanno a monte del gene. L'effettore è Gal80, che da solo non fa niente. Gal3 lega l'ATP e si attiva, questo complesso stimola Gal80 che a sua volta stimola Gal4 che stimola la trascrizione. Gal4 lega la proteina TBP che lega il TATA box e facilita l'inizio della trascrizione. A questo contribuiscono una cascata di proteine che permettono l'attaccamento della RNA polimerasi.

### **REGOLAZIONE DELLA LASSITA' CROMATINICA**

Ottamero istonico (H1+ 8 proteine interne). Proteine cariche positivamente che si legano al DNA poli-anionico.

Il nucleosoma, con il suo ottamero e l'istone H1.

Uno dei momenti di controllo importante è basato sul fatto che il nucleosoma, con il suo ottamero, interagisce con il poli-anione che è il DNA. Questa cosa si regola a livello di metilazione: il donatore di metile è il coA acetilato attraverso l'enzima HAT (histone acetyl-transferase). Scompaiono le cariche positive a seguito della acetilazione di un residuo di lisina nelle proteine nucleosomali. Vi è anche la de-acetilazione che fa sì che perdendo gli acetili si ricostituiscano le cariche positive. Abbiamo la regolazione della quantità di carica delle lisine, abbiamo una minore interazione con il DNA e una maggiore forza di legame. Abbiamo una cromatina più accessibile perché il DNA è più accessibile alla RNA polimerasi.

S-adenosin-metionina è un donatore di metile ma non modifica la carica positiva, piuttosto crea dei segnali che regolano l'accesso ai fattori di trascrizione. Sono come delle molecole segnale che non alterano la forza di interazione. Il codice istonico è un codice epigenetico e si può tramandare da generazione a generazione, insieme alle varie metilazioni e acetilazioni presenti. Il mantenimento non è così fedele perché possono esserci errori. La frequenza di mutazione del codice epigenetico è molto maggiore rispetto a quella del DNA, perché non ci sono tutti quei sistemi di fedeltà.

Quando abbiamo le metilazioni, abbiamo dei segnali che indicano ai macchinari dei fattori di

trascrizione se e come si devono legare, mentre le acetilazioni corrispondono a un meno stretto legame tra DNA e proteine istoniche.

Se il gene non deve essere trascritto, si creano dei segnali di metilazione degli istoni che non permette l'accesso a un determinato tratto cromatinico.

Un complesso molto importante che rimodella la cromatina è un complesso multiproteico detto SWI-SNF che consumando energia riesce ad aprire e chiudere la cromatina. Viene rimodellata la cromatina, resa più lasso, viene fatto ruotare il rocchetto e viene ri-bloccato sull'istone, scoprendo dei siti che possono reclutare fattori di trascrizione. Difetti del complesso portano a difetti del ciclo cellulare, nel differenziamento, nella regolazione della trascrizione, nell'immunità e anche nell'ambito tumorale.

Enhancer: sequenza cis di DNA, lega una serie di complessi e interagisce con la regione a monte del gene dell'interferone B e grazie all'attività acetil-transferasica riduce le cariche positive. Grazie poi al complesso SWI-SNF ruota il rocchetto esponendo il TATA box e cominciando la trascrizione mediante la RNA polimerasi.

#### ANATOMIA DEL GENE EUCARIOTA

Aspetti molecolari collegati al fenotipo.

Transcription Start Site (TSS). L'mRNA ha la sequenza complementare del template. Il template non è il filamento stampo. Il filamento di DNA corrispondente all'mRNA è quello che non viene usato come stampo.

...