

DIFFERENZE E SOMIGLIANZE MITOSI E MEIOSI: In entrambi i processi di divisione il DNA si duplica una volta: la mitosi comporta però solo una divisione del nucleo e produce due cellule diploidi; la meiosi comprende due divisioni del nucleo e produce quattro cellule aploidi.

Nella mitosi i cromatidi fratelli di un determinato cromosoma sono identici; nella meiosi invece, se durante la profase I ha avuto luogo un crossing-over, i cromatidi fratelli possono essere diversi.

Nella meiosi il numero di cromosomi che si dispongono nella piastra metafasica è la metà rispetto al nucleo mitotico.

Nella mitosi ciascun cromosoma si comporta in modo indipendente dal suo omologo; inoltre, durante l'anafase, sono i cromatidi ad essere trascinati ai poli opposti della cellula. Se all'inizio di una divisione mitotica abbiamo un cromosoma C, alla fine in entrambi i nuclei figli ritroviamo un cromosoma C, ciascuno costituito da un singolo cromatidio. Grazie alla duplicazione del DNA, ciascuna cellula figlia si trova ad avere le due serie complete di cromosomi (una di origine paterna e una di origine materna).

Nella meiosi le cose vanno diversamente quando si formano le sinapsi, i cromosomi di origine materna si appaiano ai loro omologhi paterni. Poi, durante l'anafase I, gli omologhi si separano: ciò assicura che ciascun nucleo figlio riceva un rappresentante di ogni coppia. Per esempio, in una cellula umana, alla fine della meiosi I ogni nucleo figlio contiene 23 dei 46 cromosomi di partenza. In tal modo il numero cromosomico si dimezza passando da diploide ad aploide. Inoltre, la meiosi I assicura a ogni nucleo figlio una serie completa di cromosomi.

TEORIA CROMOSOMICA: 1903 Boveri e Sutton.

Mendel aveva affermato che le coppie dei geni si dividono nei gameti durante la meiosi e Sutton e Boveri affermarono che i geni sono localizzati sui cromosomi e che ognuno di questi trasporta un numero elevato di geni. Inoltre vengono ereditati insieme

ESPERIMENTI CON DROSOPHILA DI MORGAN e BRIDGES: Morgan studiò il colore dell'occhio di drosophila, osservò che una particolare mutazione recessiva (gene white), che determinava occhi bianchi, anziché di rosso brillante del gene selvatico, non segregava come atteso secondo il modello proposto da Mendel.

In uno dei ceppi, sul quale stava lavorando da tempo, comparve un moscerino maschio con occhi bianchi. Questo, se incrociato con le sue sorelle, dava una progenie composta esclusivamente da moscerini con occhi rossi (maschi e femmine).

Incrociando tra loro individui di questa G1, Morgan ottenne una G2 composta da 50% femmine con occhi rossi, 25% maschi con occhi rossi e 25% maschi con occhi bianchi.

Reincrociò, dunque, alcune femmine della G1 con il padre con gli occhi bianchi. Da questo incrocio ottenne anche femmine con occhi bianchi.

Avendo a disposizione femmine con occhi bianchi, le usò per fare gli incroci reciproci: femmine con occhi bianchi x maschi con occhi rossi.

Al contrario di quanto osservato dagli incroci di Mendel, il risultato dell'incrocio era diverso: tutte le femmine avevano occhi rossi mentre tutti i maschi avevano occhi bianchi.

Il gene white doveva essere legato ad un fattore che determina il sesso in drosophila.

Bridges: usò un numero elevato di drosophila, incrociando femmine con occhi bianchi x maschi con occhi rossi.

Analizzò la G1, che era quasi interamente composta da femmine con occhi rossi e maschi con occhi bianchi, tuttavia con frequenza molto bassa (1 su 2000), erano presenti anche rare femmine con occhi bianchi e pochi maschi con occhi rossi (sterili): fenotipo eccezionale. Incrociando queste femmine eccezionali con maschi normali (occhi rossi), ottenne progenie in cui il numero di femmine con occhi bianchi e maschi con occhi rossi era molto elevato.

Bridges ipotizzò che ci fosse un'anomalia nei cromosomi X: durante la meiosi, i due cromosomi X dovrebbero separarsi e segregare nelle cellule figlie, tuttavia i due cromosomi X non si sono separati e sono presenti entrambi nella cellula uovo = condizione di non disgiunzione.

2 gameti si formeranno con un cromosoma in più (N+1), e 2 gameti con un cromosoma in meno (N-1) rispetto al normale.

Nel caso l'errore di disgiunzione avvenga in seconda divisione, avremo la migrazione di entrambi i cromatidi fratelli in uno stesso gamete e l'assenza del cromosoma nell'altro.

Il sesso femminile è caratterizzato dalla presenza di due cromosomi X

nelle cellule maschili sono invece presenti XY, Y ha lo scopo di determinare la fertilità e non il sesso come nei mammiferi.

GENI LEGATI AL SESSO: per identificarli dovremmo stabilire se il carattere è dominante o recessivo. Per farlo è necessario osservare le femmine: se il gene è legato al sesso sono le sole a poter essere eterozigoti e quindi a permetterci di stabilire, in base al fenotipo dell'eterozigote quale è l'allele dominante. Nell'uomo, la mutazione non potrà mai essere trasmessa alle generazioni successive attraverso maschi con fenotipo selvatico. Se il carattere è dominante, non è attesa una differenza significativa nella frequenza del carattere nei maschi e nelle femmine; quello che dobbiamo verificare è che tutte le figlie femmine di un maschio con fenotipo mutato abbiano anche esse fenotipo mutato altrimenti l'ipotesi più probabile resta sempre quella di un carattere autosomico.

Nell'uomo ci sono 23 coppie di cromosomi, ma solo una di queste 23 ha la capacità di determinare il sesso; il gene SRY è il gene principale che determina lo sviluppo dell'embrione in direzione maschile. La sua funzione è quella di stimolare lo sviluppo dei testicoli nelle prime settimane. I testicoli produrranno l'ormone testosterone, che è responsabile dell'attivazione di altri geni che porteranno allo sviluppo maschile. Quindi nell'uomo e nei mammiferi, è la presenza del cromosoma Y a determinare il sesso maschile.

DROSOPHILA, DIFFERENZA DI COMPENSAZIONE DEL DOSAGGIO TRA MAMMIFERI E

DROSOPHILA . COMPENSAZIONE DEL DOSAGGIO: la compensazione del dosaggio è un meccanismo che consente di eguagliare la quantità dei prodotti di geni X-linked nel maschio e nella femmina.

Dato che nelle femmine sono presenti due copie del cromosoma X, mentre nei maschi solo uno, ci si aspetterebbe uno sbilanciamento tra i due sessi di tutti i geni presenti su questo cromosoma. Questo sbilanciamento nei mammiferi viene evitato in quanto uno dei due cromosomi X di tutte le cellule di una femmina viene inattivato. Questa inattivazione ha l'effetto di bloccare quasi completamente la trascrizione. In questo modo in entrambi i sessi è presente un solo cromosoma X attivo.

CORPO DI BARR: è il risultato della compattazione e spiralizzazione di uno dei due cromosomi x a seguito della sua inattivazione. Nelle donne con la sindrome del triplo x sono visibili due corpi di barr.

L'inattivazione del cromosoma x inizia sempre da una regione detta centro di inattivazione del cromosoma x, che codifica un RNA non tradotto, che, legandosi allo stesso cromosoma che lo ha prodotto, ne promuove la condensazione e la conseguente trasformazione in corpo di barr. Il gene XIST è l'unico gene che resta attivo anche quando il cromosoma x viene inattivato e contribuisce a mantenere in forma inattivata il cromosoma x anche nelle cellule figlie.

MULLER ESPERIMENTO: Nel 1927 Muller, che lavorava con Morgan, dimostrò che irradiando le drosophile con raggi X si aumentava enormemente la frequenza di mutazione dei geni. Inoltre, Muller fu in grado di dimostrare che esisteva una proporzionalità diretta tra la dose di raggi X e il numero di mutazioni. Egli ne dedusse che le mutazioni si verificavano a carico di entità ben precise, confermando in modo indiretto l'esistenza dei geni.

CROMOSOMA CLB? CARATTERISTICA CHE IMPEDISCE IL CROSSING OVER? E' un particolare tipo di cromosoma costruito da Muller per identificare qualsiasi mutazione letale presente sul cromosoma X. Il cromosoma CLB contiene un'inversione che sopprime il crossing-over (C), una mutazione letale recessiva (L) e il marcatore fenotipico dominante Barr (B). Può essere trasmesso solo alla progenie femminile, mentre i maschi, a causa della mutazione letale, presente su CLB muoiono.

FRANKLIN E WILKINK COME HANNO FATTO A DIMOSTRARE IL NUMERO DI MUTAZIONI DI RAGGI X: utilizzarono la diffrazione dei raggi x mediante la quale un fascio parallelo di raggi x veniva diretto contro le molecole di DNA in cristalli.

Il fascio veniva diffratto dagli atomi secondo uno schema caratteristico.

I raggi x diffratti venivano poi registrati su una pellicola fotografica. Analizzando i diffrattogrammi, Franklin ottenne informazioni riguardanti la struttura atomica della molecola.

Dunque, giunse alla conclusione che il DNA possedesse una struttura elicoidale, caratterizzata da due distinte periodicità (0,34 nm-3,4 nm) lungo l'asse della molecola.

MUTAZIONI CROMOSOMICHE: 4 tipi di mutazioni cromosomiche

Delezione: mancanza di un segmento cromosomico, che può rappresentare la conseguenza di un danno alla struttura del cromosoma (es: introduzione di rotture, generazione di un frammento e ricongiungimento delle due regioni non adiacenti nel cromosoma normale) o può essere generata attraverso eventi di ricombinazione non omologa. A seguito della delezione, il cromosoma dovrebbe apparire più corto di quello normale. Ciò consente di identificare con una buona precisione i confini della regione cromosomica compresa nel segmento deletato. Un altro approccio molto efficace si applica quando i cromosomi omologhi risultano appaiati: in questa circostanza il cromosoma normale non può completare l'appaiamento con il suo omologo. In corrispondenza del tratto deletato, nel cromosoma normale si rende visibile perciò una estroflessione, chiamata ansa da delezione. Le conseguenze potrebbero essere la perdita di un segmento di DNA che presumibilmente contiene diversi geni, genera una condizione di parziale emizigosi.

Duplicazione cromosomica: descrive caso di un cromosoma con un segmento ripetuto in tandem, il meccanismo di origine più probabile è quello del crossing over ineguale, che nell'evento generale crea due prodotti reciproci, ossia un cromosoma con delezione ed uno con duplicazione. La conseguenza genetica prevalente, riguarda gli effetti del dosaggio genico che risulterà sbilanciato. Di conseguenza un sovradosaggio dell'informazione genetica può essere estremamente deleterio e produrre fenotipi mutanti. Tuttavia però le conseguenze di una duplicazione del materiale genetico sono meno gravi di quelle di una delezione (che genera aplo insufficienza). L'eccesso di materiale genetico associato alla duplicazione, non ha sempre valenza negativa, ma può rappresentare un'ottima opportunità per introdurre varianti genetiche.

Inversioni cromosomiche: variazione dell'organizzazione del cromosoma. 2 tipi di inversione:

Pericentrica nel caso in cui il centromero è contenuto nel segmento invertito.

Paracentrica è quando l'inversione non comprende la regione centromerica.

Un'inversione può formarsi a causa della rottura fisica del cromosoma in due posizioni diverse oppure a seguito di un evento di ricombinazione non omologa tra due elementi duplicati dello stesso cromosoma ma orientati in senso opposto.

Inversione cromosomica è considerata una variazione bilanciata, il nuovo orientamento del segmento è comunque responsabile di effetti genetici importanti come per esempio l'effetto posizione che si deve all'influenza del nuovo contesto cromosomico sull'espressione delle sequenze geniche contenute nell'inversione.

Poiché nessun evento di ricombinazione che avviene all'interno della regione invertita è vitale, si afferma che l'inversione sopprime il crossing over. Riflette l'assenza dei genotipi ricombinanti, relativamente alla regione coinvolta in un'inversione, nella progenie di un soggetto portatore in eterozigosi di questa anomalia strutturale. Il vantaggio è che mantenendo in eterozigosi dei ceppi con inversione cromosomica è possibile avere la garanzia che le configurazioni alleliche parentali siano sempre trasmesse come tali alla progenie (ricombinanti NON sono vitali).

Traslocazione: spostamento di materiali verso una posizione cromosomica diversa da quella normale, può coinvolgere due cromosomi (traslocazioni reciproche), ma sono possibili anche traslocazioni unidirezionali. La traslocazione è considerata una variazione bilanciata in quanto non si accompagna a perdita o duplicazione di informazione genetica.

GENETICA BATTERICA:

1. CONIUGAZIONE: TRASFERIMENTO DIRETTO DI DNA DA UN BATTERIO ALL'ALTRO

Lederberg e Tatum da 2 ceppi di Escherichia Coli (A E B). Coltivati separatamente con terreno minimo i batteri non si sviluppavano mentre facendoli crescere assieme riuscivano a mutare.

Dunque venendo in contatto tra di loro erano in grado di scambiarsi informazioni genetiche. Ma ciò fu confermato dopo la scoperta dei Plasmidi, come il Plasmide F. Ha forma circolare ed è una molecola di DNA che contiene i geni necessari per la coniugazione. Questi comprendono funzioni tra cui il trasferimento del materiale genetico da un batterio all'altro.

CONIUGAZIONE BATTERICA: Cellula Donatrice (F+) e Cellula Ricevente (F-)

1° fase: contatto tra le due cellule dà origine al ponte coniugativo

2° fase: enzimi tagliano il plasmide in una specifica regione, chiamata origine di trasferimento, e dando origine a due estremità

3° fase: una di queste estremità, viene usata dalla POLIMERASI BATTERICA per duplicare il DNA di F, usando il filamento intatto come stampo, trasferendo dunque una delle due eliche del DNA che poi verrà duplicata

4° fase: alla fine, entrambi i batteri hanno un FATTORE F: batterio F+ ha conservato il DNA, duplicandolo il Batterio ricevente F- ha acquisito questo dna per coniugazione, quindi anche lui F+

TUTTI I BATTERI RICEVENTI CHE HANNO CONIUGATO DIVENTANO F+

CROSSING OVER CHE SI COMBINA IN MODO SBAGLIATO: HFR

HFR: può accadere che il PLASMIDE F VENGA INGLOBATO NEL CROMOSOMA BATTERICO (hfr) La cellula entra in contatto con la cellula donatrice F-, si forma un PONTE DI CONIUGAZIONE, un frammento del DNA della cellula donatrice si stacca. Nella cellula ricevente, il frammento di DNA integrato nel CROMOSOMA BATTERICO ed avrà luogo una RICOMBINAZIONE BATTERICA.

2. TRASFORMAZIONE: è un processo che consiste nell'assunzione di una molecola di DNA dall'ambiente esterno, il suo trasferimento all'interno del batterio e la successiva acquisizione stabile del cromosoma. Griffith dimostrò che batteri non virulenti R, venivano trasformati in batteri virulenti S, se messi a contatto con batteri S uccisi con il calore.

Avery afferma che le cellule devono trovarsi in un particolare stato, detto di competenza per poter assumere il DNA; devono essere dunque dotate di un apparato per catturare e traslocare il DNA, ma questo apparato non può essere sintetizzato da tutte le specie batteriche.

1° fase: DNA TRASFORMANTE A DOPPIA ELICA è trasportato all'interno del citoplasma

2° fase: UN'ELICA DI DNA VIENE DEGRADATA, l'altro traslocato nel citoplasma dove si associa con proteine batteriche che ne permettono la ricombinazione con il DNA omologo dell'ospite.

Mediante la trasformazione è possibile capire se due geni sono strettamente concatenati o distanti. Quanto più sono vicini due marcatori tanto più probabile è la loro co-trasformazione (trasferimento di due marcatori sullo stesso frammento di DNA)

3. TRASDUZIONE: UN BATTERIOFAGO TRASPORTA INFORMAZIONI GENETICHE DA UN BATTERIO ALL'ALTRO

- Generalizzata: trasferisce qualsiasi tipo di gene

- Specializzata: trasferisce geni specifici

Generalizzata:

BATTERI INFETTATI DA UN FAGO:

IL DNA DELLA CELLULA VIENE FRAMMENTATO E IL DNA VIRALE PRENDERÀ IL CONTROLLO DEL MECCANISMO DI TRASDUZIONE E TRADUZIONE DELLE PROTEINE FORMERANNO DELLE NUOVE PARTICELLE VIRALI MA DURANTE IL PROCESSO POTREBBERO CAPITARE DEGLI ERRORI:

ALCUNI FRAMMENTI DI DNA VIRALE E BATTERICO SI UNISCONO E QUANDO PROTEINE E DNA VERRANNO ASSEMBLATI PER PRODURRE NUOVI VIRUS SARANNO RPRESENTI ALCUNI CHE CONTERRANNO DNA RICOMBINANTE

E QUINDI SI FORMERANNO ALTRETTANTE CELLULE CON DNA RICOMBINANTE CON CROSSING-OVER

Specializzata:

PROFAGO SI UNISCE AL CROMOSOMA BATTERICO:

LA CELLULA PASSA AD UN CICLO LITICO MA IL PROFAGO STACCANDOSI PER FORMARE IL PLASMIDE, TRASCINA UN TRATTO DI CROMOSOMA BATTERICO, SI FORMERÀ QUINDI UN PLASMIDE PIU LUNGO, GRAZIE AL QUALE VERRANNO CREATI NUOVI VIRUS (con DNA ricombinante)

4. SEDUZIONE: In un ceppo Hfr il fattore F può excidersi e generare un ceppo F+. Se però si escinde in maniera errata può incorporare il gene batterico accanto al quale era inserito. In questo caso prende il nome di F'. Il plasmide F' può coniugare e inserire il gene che ha incorporato in un batterio ricevente (seduzione) che diventa F+ e produce un diploide parziale stabile, o merozigote. I ceppi F' sono utilizzati per produrre diploidi parziali stabili. In questo caso non è necessario il doppio c.o. L'uso di elementi F' per creare diploidi parziali stabili viene chiamato seduzione o F-duzione. Alcuni ceppi F' trasportano parti cospicue

(fino ad un quarto) del cromosoma batterico; se vengono usati appropriati marcatori, i merozigoti prodotti possono essere usati in studi di ricombinazione.

REPLICAZIONE FAGI:

CICLO LITICO: avviene quando un fago incontra una cellula batterica. Trovato il batterio da infettare il fago prende contatto attraverso le fibre della coda con gli specifici recettori e inizia l'infezione, iniettando il proprio acido nucleico all'interno del batterio. Unica parte del fago che partecipa all'infezione ed è anche l'unica che porta informazione genetica.

Hershey e Chase: dimostrano che l'informazione genetica è portata dal DNA

1° fase: una volta entrato nel batterio, il dna del fago viene replicato, dando origine a centinaia di copie del genoma

Dopo aver introdotto il DNA nelle teste del fago, viene attaccata la coda, dando origine ai VIRIONI MATURI

3° fase: all'interno del batterio si accumulano così circa un centinaio di fagi

Il ciclo litico di un fago prevede quindi la produzione di enormi quantità di virioni a partire da un singolo evento infettivo, che avviene in tempi molto brevi

CICLO LISOGENICO: Riproduzione del fago limitata ad un singolo genoma/batterio che sfrutta la riproduzione passiva ad opera del batterio stesso.

Il batterio, in seguito alla lisogenizzazione presenta un cambiamento del suo fenotipo dovuto alla presenza del profago all'interno del suo genoma. Questo fenomeno prende il nome di conversione lisogenica.

BENZER: Per il suo esperimento, Benzer scelse come soggetti di studio *Escherichia coli* (diversi tipi di ceppi) e il fago T4. Mescolando questi due microorganismi lo scienziato osservò sulle piastre Petri la formazione di placche, ovvero aree circolari di colore più chiaro. La placca è una zona priva di batteri vivi creata in seguito all'infezione dei fagi che, dopo essersi replicati all'interno della cellula ospite, venivano rilasciati all'esterno. Benzer osservò che miscelando T4 contenenti una particolare mutazione (chiamata da lui mutazione r e localizzata in una particolare regione chiamata rII) con E. coli del ceppo B, queste placche apparivano più grandi e nette. Ciò invece non avveniva nel caso in cui il ceppo usato fosse K(λ). In questo caso i virus non formavano placche e quindi non infettavano il batterio.

Se due mutazioni puntiformi incrociate tra loro non davano ricombinanti selvatici significava che esse erano a carico dello stesso sito.

COME SI CAPISCONO LE RELAZIONI FRA 2 MUTAZIONI FAGICHE: ESPERIMENTO DELLA COMPLEMENTAZIONE: Il test di complementazione (o allelismo) serve a stabilire se due mutazioni colpiscono lo stesso gene oppure due geni differenti.

1: si effettua un'infezione mista in condizioni non permissive, cioè si utilizzano le condizioni in cui ciascun fago mutante da solo non è in grado di crescere.

2: se la contemporanea presenza dei due fagi ripristina la possibilità di crescere, si complementano, facendo in modo che tutte le funzioni vitali siano presenti nel batterio.

3: ciò indica che le mutazioni presenti nei due fagi sono in geni diversi.

4: se i fagi non riescono a crescere neanche in queste condizioni non complementano, perché le mutazioni interessano lo stesso gene e quindi la funzione essenziale rimane mancante nel batterio.

Attraverso questo saggio, Benzer dimostrò che il locus rII conteneva due geni: rIIA e rIIB.

RICOMBINAZIONE: La prova della ricombinazione all'interno di uno stesso gene ci viene data dalla comparsa del ceppo selvatico rII (senza mutazioni). Nel caso infatti fosse possibile un evento di *crossing-over* avremo come prodotti finali un cromosoma doppio mutante e uno senza mutazioni.

Infine il ceppo selvatico era facilmente rilevabile in quanto unico a formare placche su *E. coli*

COSA SONO GLI AUXOTROFI E PROTOTROFI: I microrganismi eterotrofi possono essere invece classificati in:

1. prototrofi: sono quei microrganismi eterotrofi che sono in grado di sintetizzare tutti i composti organici di cui necessitano;

2. auxotrofi: sono quei microrganismi eterotrofi che, in aggiunta ai nutrienti energetici forniti dall'alimentazione, devono necessariamente nutrirsi di uno o più particolari composti organici necessari per la propria crescita in quanto incapaci di sintetizzarli.

QUANTE PROTEINE IN UNA CELLULA UMANA: Le proteine formano le nostre cellule e svolgono in esse la maggior parte del lavoro e si può affermare che sono circa 100.000 per ogni cellula. In questo modo, danno vita al codice genetico.

CODICE GENETICO A TRIPLETTE E COME E' STATO DIMOSTRATO: l'evidenza che il codice genetico è un codice a triplette, ovvero che un gruppo di 3 nucleotidi (un codone) del DNA codifica un amminoacido della catena polipeptidica, venne dall'esperimento di Crick e Brenner:

- trattarono un fago T4 selvatico, con un mutageno, che determina la perdita (delezione) o l'aggiunta (inserzione) di coppie di nucleotidi nel DNA.
- Dopo il trattamento isolarono un mutante che presentava una placca alterata, chiamata placca a lisi rapida, indicata con rII^B
- Effettuarono un secondo trattamento con proflavina e isolarono un certo numero di "revertenti" al selvatico, r⁺.
- Alcuni dei revertenti risultarono da una correzione esatta della mutazione originaria, cioè una delezione per un'inserzione o un'inserzione per delezione.

STRUTTURA DEL DNA: Gli acidi nucleici (RNA e DNA), sono costituiti da catene polinucleotidiche, cioè polimeri chiamati nucleotidi. Ogni nucleotide è costituito da tre componenti (gruppo fosfato, zucchero pentoso e base azotata). Nel caso del DNA lo zucchero è il deossiribosio, mentre nell'RNA è il ribosio. Si distinguono due classi di base azotate, le purine (adenina e guanina) e le piramidine (citosina, timina, uracile).

TRASCRIZIONE DNA RNA: La trascrizione è il processo con cui l'informazione ereditaria viene trasferita dal DNA all'RNA.

1. La trascrizione del DNA in mRNA (messaggero) avviene nel nucleo della cellula ed inizia con il legame di alcune proteine, chiamate fattori di trascrizione, a particolari sequenze di DNA, dette motori.
2. La doppia elica del DNA si apre e le due catene si separano. Utilizzando quindi questa catena come stampo, l'enzima RNA polimerasi, inizierà ad inserire i nucleotidi. Attraverso l'aggiunta di un nucleotide per volta, il filamento di DNA comincia ad allungarsi.
3. La sintesi dell'RNA procede dall'estremità 5' verso quella 3' del gene, producendo una molecola di RNA complementare alla catena stampo del DNA a parte la sostituzione della timina con l'uracile.
4. La trascrizione termina poiché alla fine di ogni gene ci sono particolari sequenze di basi dette terminatori che causano il distacco dell'RNA polimerasi. La molecola di mRNA prodotta va quindi incontro a fenomeni di maturazione consistenti principalmente nell'aggiunta di una coda di adenine all'estremità 3' e nell'eliminazione di sequenze introni che tramite il processo di splicing.
5. A questo punto l'RNA messaggero maturo esce dal nucleo ed emigra nel citoplasma cellulare portando con se le istruzioni per la sintesi proteica.

PERCHE SI E' EVOLUTO IL MECCANISMO DELLO SPLICING: lo splicing è il processo che taglia e riduce l'mRNA durante la maturazione. La parte centrale dell'mRNA è formata da segmenti che sono

chiamati esoni ed introni. L'mRNA immaturo è più lungo di quello maturo, perché sono stati tagliati via gli introni che non servono. Si può avere anche lo SPLICING ALTERNATIVO, in cui vengono tagliati via anche alcuni esoni, in modo da dare più combinazioni da un unico e lungo RNA. Si possono ottenere più varianti, ed un gene può codificare più di una proteina.

TRADUZIONE (o SINTESI PROTEICA): La traduzione è il processo con cui l'informazione genetica, immagazzinata nel DNA, è dapprima trasferita all'mRNA e poi tradotta in proteine. Al processo di traduzione prendono parte diversi componenti tra cui mRNA, ribosomi (rRNA e proteine) e tRNA.

- tRNA: RNA di trasferimento, rappresentano gli adattatori che riconoscono ciascun amminoacido e la sequenza nucleotidica complementare del codone dell'mRNA. Fungono da trasportatori degli amminoacidi ai ribosomi, permettendone il corretto posizionamento nella catena polipeptidica. Il processo si arresta nel momento in cui il ribosoma incontra un codone di stop; a questo punto, il polipeptide sintetizzato viene rilasciato e l'mRNA e i ribosomi si rendono disponibili per un altro ciclo di sintesi proteica.
- mRNA: RNA messaggero, è la molecola di RNA che ha il compito di trasportare l'informazione contenuta nel DNA e fare da stampo per la sintesi delle proteine. Viene sintetizzato dall'RNA polimerasi a partire dal filamento di DNA ed è ad esso complementare. Su di esso si legano in sequenza i vari tRNA, permettendo la polimerizzazione delle proteine con la corretta sequenza amminoacidica.
- Ribosomi: I ribosomi, sede della sintesi proteica, rappresentano la struttura che consente ai vari componenti dell'apparato di traduzione di entrare in contatto.

REPLICAZIONE DNA E QUANTE SONO LE BOLLE DI REPLICAZIONE (tante negli eucarioti ed una nei batteri):

- Durante la sintesi del DNA (replicazione) i due filamenti che costituiscono l'elica vengono srotolati da un enzima (elicasi) e ciascuno dei due filamenti fa da stampo per la sintesi di un filamento ad esso complementare
- Le due eliche di DNA generate dalla replicazione hanno sequenza identica all'elica originaria e contengono ciascuna un solo filamento presente nella doppia elica parentale
- L'enzima che catalizza la sintesi di nuovi nucleotidi è la DNA polimerasi
- La replicazione inizia da punti specifici, le origini di replicazione, in corrispondenza dei quali inizia l'apertura delle due eliche (forchetta di replicazione)
- La polimerizzazione del DNA avviene sempre in direzione 5'-3'
- L'elicasi si muove in una sola direzione, srotolando progressivamente l'elica
- I due filamenti antiparalleli non possono essere duplicati nello stesso modo
- Uno può essere sintetizzato nella stessa direzione in cui si muove l'elicasi, in direzione 5'-3' (filamento guida)
- L'altro non possiede un gruppo ossidrilico 3' al punto di biforcazione, non può essere sintetizzato in maniera continua, in direzione 3'-5' (filamento in ritardo), seguendo l'elicasi
- Il filamento in ritardo viene invece sintetizzato in direzione opposta a quella in cui si muove la forchetta di replicazione, mediante la sintesi progressiva di una serie di piccoli frammenti (frammenti di Okazaki), ciascuno polimerizzato in direzione 5'-3'
- Le estremità dei frammenti di Okazaki vengono ricongiunte mediante formazione di legami covalenti ad opera dell'enzima DNA ligasi

- Le DNA polimerasi DNA-dipendenti sono gli enzimi responsabili della sintesi di polideossinucleotidi in direzione 5'-3'
- Esse necessitano sempre un filamento primer (innesco) per iniziare la sintesi, ovvero sono in grado di aggiungere nucleotidi ad un 3'-OH
- Per dare inizio alla sintesi del DNA sono necessari primer a RNA, sintetizzati dall'enzima RNA primasi

Le bolle di replicazione possono essere molte per quanto riguarda gli eucarioti ma poche per quanto riguarda i batteri. Inoltre il destino della seconda copia duplicata è quello che potrebbe subire mutazioni.

COSA FA IL CODONE DI STOP: Il codone di stop, detto anche codone di terminazione, è una tripletta di basi che non codifica per nessun amminoacido e che blocca quindi la traduzione del filamento di m-RNA (RNA messaggero) in proteina. Tre codoni causano la terminazione della sintesi proteica sono: UAG, UAA, e UGA. Sono stati scoperti attraverso un esperimento in vitro: si preparano dei sistemi in vitro in cui sono presenti tutti e 20 gli amminoacidi, dei quali, solo uno è marcato radioattivamente. A questo punto si introduce il cordone sintetico a sequenza nota. Quando l'amminoacido marcato è quello corrispondente alla tripletta utilizzata la radioattività resta sul filtro. Il codice genetico è stato dunque decifrato. In totale ci sono 61 codoni codificanti, mentre gli altri 3 non specificano amminoacidi ma fungono da segnali di stop (codoni non senso o codoni di stop).

COSA CAMBIA TRA CODONE CODIFICANTE E CODONE DI STOP: la differenza tra un codone codificante e uno di stop è che i primi codificano l'amminoacido e sono 61 su 64 totali; mentre i codoni di stop, non hanno la capacità di codificare nessun amminoacido e rappresentano i restanti 3 su 64 totali. (es. $400 \times 3 + \text{anticodone} = 1200 + 3 = 1203$)

COME DOVREBBE ESSERE ANTICODONE DI UGA: ACU

RETROMUTAZIONE E SOPPRESSIONE: è possibile che un fenotipo mutante possa revertire al fenotipo selvatico per mezzo di una seconda mutazione. Troviamo le mutazioni di andata (dal selvatico al mutante) e mutazioni di ritorno (dal mutante al selvatico). Il ripristino del fenotipo selvatico può avvenire secondo diverse modalità:

1. La prima mutazione viene cancellata da una seconda mutazione che re-introduce la sequenza originale: RETROMUTAZIONE.
2. Una seconda mutazione avviene in un sito adiacente a quello in cui è avvenuta la prima, sostituendo un amminoacido compatibile con la funzionalità delle proteine: REVERSIONE. La reversione, al contrario della retromutazione, ripristina il fenotipo originale ma non il genotipo, in quanto la seconda mutazione non avviene esattamente nel sito mutato. Inoltre, è la base fondante del test di AMES.
3. SOPPRESSIONE: una seconda mutazione annulla l'effetto fenotipico della prima. Possono avvenire all'interno dello stesso gene in cui è avvenuta la prima (soppressione INTRAGENICA), oppure in un gene diverso (soppressione INTERGENICA).

PARLA DEI TIPI DI MUTAZIONE GENETICHE: Mutazioni nei geni che codificano per le proteine della riparazione del DNA causano lo sviluppo di tumori. Il cancro è una malattia genetica, causata dall'accumulo di mutazioni in varie classi di geni. Gli agenti cancerogeni sono anche mutageni.

Le mutazioni genetiche sono cambiamenti nelle sequenze di nucleotidi che compongono il DNA. Le mutazioni possono presentarsi in: cellule germinali, ossia ovuli e spermatozoi, come alterazioni permanenti e trasmissibili dai genitori ai figli; o cellule somatiche (del corpo), che si verificano spontaneamente ad un certo punto della vita. Questo tipo di mutazione non viene trasmesso ai figli.

Le mutazioni, inoltre, vanno suddivise in:

- **Dominanti:** causano un cambiamento visibile anche quando sono presenti su una singola copia del gene.
- **Recessive:** devono essere presenti in doppia copia per causare la malattia o, comunque, manifestare il loro effetto. In presenza di una singola copia del gene mutato, ereditata quindi solo da uno dei genitori, le mutazioni recessive possono essere presenti nel DNA senza produrre alcun effetto. Una persona deve ereditare due copie del gene mutato, una dalla madre e una dal padre, per essere affetta da una malattia genetica causata da una mutazione recessiva. In presenza di una singola copia della mutazione si parla di portatori sani.

Esistono mutazioni cosiddette letali, ossia incompatibili con il normale sviluppo di un embrione, feto, neonato. Sebbene non dimostrato, alcune forme di sterilità vengono associate alla presenza di mutazioni.

COSA SUCCEDA QUANDO UN DANNO VIENE RIVELATO, SE CI SONO ENZIMI CHE RIPARANO IL DANNO: Tuttavia il DNA è soggetto ad errori di replicazione, poiché il meccanismo è ad alta fedeltà ma non perfetto, ed è soggetto a danni, dovuti all'azione di agenti ambientali fisici o chimici:

- Radiazioni ionizzanti
- Luce ultravioletta
- Composti mutageni (agenti alchilanti, ...).

Le cellule normali sono dotate di tutta una serie di meccanismi per la rilevazione di errori (incorporazione di nucleotidi errati) e danni al DNA e per la riparazione del DNA. I difetti nel sistema di rilevazione o di riparazione del DNA causano tumori e patologie genetiche. Inoltre, Le DNA polimerasi DNA-dipendenti hanno la funzione di correzione di bozze.

QUALI DANNI PUO SUBIRE IL NOSTRO GENOMA E CHE CONSEGUENZE: può subire delle variazioni nel numero dei cromosomi:

- Un cambiamento del numero dei cromosomi che non coinvolge l'intero assetto è definito **aneuploidia** (una cellula con un cromosoma in più o in meno è detta aneuploide). Le aneuploidie si generano a causa della non-disgiunzione meiotica.
- Un cambiamento del numero normale dell'intero assetto dei cromosomi di una cellula è definito **poliploidia** (Una cellula con tre assetti cromosomici è detta triploide; una con quattro, tetraploide)

MALATTIE GENETICHE DA ALTERAZIONI CROMOSOMICHE (TURNER):

- **Monosomia (2n-1):** è la perdita di un singolo cromosoma, ha effetti deleteri e turba il bilanciamento genico. Inoltre porta in emizigosi mutazioni deleteri. Nell'uomo la monosomia per un autosoma è rara: gli embrioni non si sviluppano e vengono perduti precocemente durante la gravidanza. Un esempio di monosomia nella specie umana è LA SINDROME DI TURNER (XO): gli individui affetti hanno un solo cromosoma X e non hanno il cromosoma Y. Sono femmine con caratteristiche poco sviluppate e presentano tratti di sterilità. La frequenza è di 1/5000 femmine nate. Queste persone presentano cellule senza corpi di Barr.
- **Trisomia (2n+1):** è l'acquisto di un singolo cromosoma. Un esempio di trisomia nella specie umana è la SINDROME DI KLINEFELTER (XXY): è un errore di disgiunzione alla meiosi, per cui si è formato un gamete che ha un cromosoma sessuale in più. Queste persone sono fenotipicamente maschi e non hanno problemi di rilievo fino alla pubertà, in seguito però mostrano una ridotta fertilità. La frequenza è di 1 ogni 1000 nati di sesso maschile. Queste persone presentano cellule con un corpo di Barr.
- **Trisomia 21 (o sindrome di Down):** La sindrome di Down è causata da una copia in eccesso del cromosoma 21. La più comune trisomia in un neonato è la trisomia 21 (tre copie del cromosoma 21, il cromosoma umano più piccolo). È possibile che un embrione presenti trisomie di qualsiasi cromosoma, tuttavia un cromosoma supplementare più grande determina con maggiore probabilità un aborto spontaneo o la morte in utero.
- **Triplo X:** le persone affette hanno un cariotipo in cui sono presenti 3 cromosomi X, queste sono femmine e non mostrano caratteristiche fenotipiche diverse dal normale.

- **Doppio Y:** è presente un cromosoma Y soprannumerario. È dovuto ad un evento di non disgiunzione durante la seconda divisione meiotica maschile.

ONCOSOPPRESSORI: I geni onco-soppressori codificano proteine che:

- Inibiscono il ciclo cellulare
- Attivano l'apoptosi (Se il danno è eccessivo, o non è riparabile, la cellula va in APOPTOSI, ovvero morte cellulare)

La mancanza di queste proteine causa la perdita del controllo della divisione cellulare. La proteina Rb è un importante oncosoppressore che regola l'espressione di geni essenziali per l'innescamento della fase S (nella mitosi).

COME SI FA AD ISOLARE I GENI (REPLICA PLATING): il replica plating è una procedura per l'isolamento di mutazioni temperatura-sensibili.

- Questo processo prevede una coltura di cellule di lievito che viene fatta crescere per alcune generazioni in un terreno di crescita liquido, dopo aver sottoposto la coltura al trattamento con agenti mutageni, così da aumentare la frequenza di mutazione.
- Dopodiché, un cilindro coperto da un velluto sterile viene appoggiato sulla piastra madre e su di esso rimangono le impronte delle colonie.
- Le cellule sul velluto vengono poi depositate su due piastre: una incubata alla temperatura permissiva (28 gradi), l'altra a temperatura restrittiva (37 gradi).
- Dopo uno o due giorni, si paragonano le due piastre: le colonie crescono a 28 gradi ma non a 37 gradi.

PARLA DEL TEST DI EIMS (REVERSIONE): le finalità di questo test sono quelle di poter classificare più accuratamente e rapidamente i potenziali agenti mutageni. È un test di reversione, ovvero l'evento in base al quale un allele mutato può ripristinare la sua funzione normale a seguito di una seconda mutazione. La strategia di questo test per l'identificazione dei composti mutageni, si basa sulla reversione di mutazioni his- in mutanti di salmonella.

I batteri messi a contatto con il potenziale mutageno vengono seminati in piastre di terreno minimo per selezionare i revertenti prototrofici.

Un numero di colonie più elevato di quello rinvenuto sulle piastre di controllo (senza mutageno), permette di concludere che la sostanza induce mutazioni.

L'aggiunta di estratto di fegato di ratto permette di metabolizzare la sostanza in esame, rendendo le condizioni del test più simili a quelle presenti nell'organismo umano.

RUOLO DEI TUMORI: I tumori sono patologie che hanno origine in una cellula la cui crescita va fuori controllo moltiplicandosi a dismisura. In una cellula normale vi sono numerosi geni che controllano i meccanismi che vigilano sul processo di crescita delle cellule garantendone il corretto funzionamento. Tuttavia, questi meccanismi della cellula possono smettere di funzionare perché i relativi geni di riferimento hanno accumulato nel tempo una serie di errori chiamati "mutazioni".

Le mutazioni possono avvenire sia per esposizione ad agenti cancerogeni (per esempio il fumo) sia per cause legate all'invecchiamento.

Accumulare mutazioni genetiche nel proprio DNA è infatti un fatto naturale che avviene gradualmente nel corso della vita di una persona. Perché una cellula diventi una cellula tumorale occorre che abbia accumulato numerose mutazioni e ciò è tanto più probabile che avvenga quanto più anziano è l'individuo.

L'esposizione ad agenti cancerogeni non fa che aumentare la velocità con cui avviene questo processo.

Una caratteristica fondamentale di tutte le cellule tumorali è l'instabilità genomica causata da:

- mutazioni che controllano l'integrità del genoma

• mutazioni somatiche acquisite durante lo sviluppo del tumore

L'instabilità genomica causa la perdita oppure l'acquisizione di informazione genetica, che possono contribuire direttamente all'insorgenza di tumori. Ad esempio, in individui eterozigoti per un gene oncosoppressore (come individui Rb/rb), la perdita della copia dell'allele di tipo selvatico Rb in una cellula (perdita di eterozigosi, o loss of heterozygosity, LOH) porta l'allele mutante rb in uno stato di emizigosi. In questa cellula si manifesterà il fenotipo causato dalla perdita della funzione di Rb.

EMIZIGOSI: la variante è presente sull'unica copia esistente del gene. Si pensi ad esempio al cromosoma X nei maschi. I maschi, a differenza delle femmine, non hanno due cromosomi X, ma un solo cromosoma X e un cromosoma Y. Tutti i geni del cromosoma X di un maschio saranno quindi presenti in singola copia. In questo caso, una variante della sequenza si dirà non eterozigote, ma emizigote. Si dirà emizigote anche qualsiasi variante di un gene autosomico la cui seconda copia sia andata perduta a seguito di una delezione.

TELOMERI E TELOMERASI? IN QUALI CELLULE: I telomeri sono le parti terminali dei cromosomi e sono costituiti dalla ripetizione continua di brevi sequenze di nucleotidi (le unità di base del DNA) per evitare il problema della perdita di una porzione di DNA (che altrimenti potrebbe essere importante). I telomeri hanno la funzione di proteggere i geni dall'erosione, che si verifica nei cicli di replicazione del DNA.

C'è un meccanismo basato sull'azione dell'enzima telomerasi, che compensa l'accorciamento progressivo dei telomeri, aggiungendo nuove sequenze ripetute. La telomerasi però è attiva solo nelle cellule germinali (spermatozoi e cellule uovo), nelle cellule staminali e in modo patologico nelle cellule tumorali, non quindi nelle cellule somatiche, che costituiscono quasi del tutto un organismo. La telomerasi è più attiva durante lo sviluppo embrionale quando si ha maggior replicazione rispetto al resto della vita.

EQUILIBRIO TASSO DI MUTAZIONE OTTIMALE: il tasso di mutazione è la probabilità che una copia di un allele muti in qualche altra forma allelica in una generazione. Per la specie umana, è stato stimato che ad ogni generazione, ogni individuo erediti 1-4 nuove mutazioni. Ci deve essere un equilibrio tra: accuratezza del macchinario replicativo-effetto degli agenti mutageni ambientali-efficienza dei sistemi di riparazione.