

# Genetica

La malattia deve essere classificata a partire dall'evento che la causa, e non deve essere dato per scontato che la stessa malattia abbia la stessa cura per tutte le persone; questo sia perché la stessa malattia può avere una causa diversa e sia perché la farmacocinetica del farmaco può essere diverso da persona a persona a causa del diverso patrimonio genetico. Ad oggi, grazie alla farmacogenetica, è possibile personalizzare le terapie sulla base delle caratteristiche personali del paziente. Questo è possibile sia attraverso biopsie, ma anche a partire dal DNA estratto dai linfociti del sangue.

## Il codice genetico



Nel nostro DNA possediamo 2 copie di ogni gene, questo perché nasciamo dall'unione di 2 cellule aploidi (cioè con una sola copia di ogni cromosoma): un ovulo e uno spermatozoo. Quando lo spermatozoo riesce a fecondare la cellula uovo, essa diventa uno zigote, che conterrà 2 copie di ogni cromosoma. Successivamente questa cellula inizierà a moltiplicarsi diventando morula, embrione, feto etc. fino ad un organismo adulto, in cui le cellule comunque saranno in continua riproduzione per rimpiazzare quelle morte, danneggiate o che vengono perdute.

Le cellule possono essere danneggiate anche a causa di agenti esterni (sostanze che modificano il DNA, radiazioni ionizzanti), ma esistono meccanismi atti ad allontanare le sostanze tossiche, come pompe attive, e meccanismi di controllo e correzione delle mutazioni genetiche, che di solito sono in grado di riparare il DNA mutato. In caso il danno al DNA non sia riparabile si attivano forme di morte cellulare programmata, come l'apoptosi, atte a proteggere l'organismo.



Il codice genetico è organizzato in cromosomi, cioè lunghe sequenze di DNA. I cromosomi contengono i geni, sequenze nucleotidiche di DNA che codificano la sequenza primaria di un prodotto genico finale, come un polipeptide. I geni sono quindi dei manuali di istruzioni per produrre le proteine necessarie alla vita della cellula, e contiene anche delle parti che non codificano direttamente la proteina (intron), ma determinano quanto quel gene deve venire espresso, in quale momento, da quali cellule, grazie a quali stimoli, quali parti sono necessarie per produrre una proteina o un'altra etc. Negli esseri umani solo l'1-2% del genoma codifica proteine, quindi il 98-99% del genoma non codifica direttamente proteine, ma contiene tra le altre cose geni non codificanti e sequenze regolatorie.

Il codice genetico è uguale in tutte le cellule (ed è uguale per il 99,5% tra tutti gli esseri umani), ma esistono all'interno del nostro organismo numerosi tipi di cellule con differenze strutturali e funzionali. Questo è possibile grazie alla regolazione epigenetica, cioè alla possibilità che all'interno della cellula non tutti i geni vengano letti, ma la cellula userà solo quelli necessari. Alcuni geni vengono espressi sempre da tutte le cellule (ad esempio quelli per il metabolismo del glucosio), mentre altri geni sono tessuto-specifici.

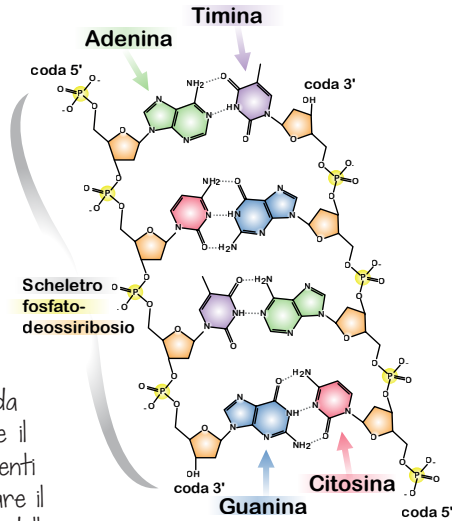
Le cellule somatiche si dividono per mitosi (ogni cellula figlia ha lo stesso numero di cromosomi della cellula madre), mentre le cellule della linea germinale si riproducono per meiosi (ogni cellula figlia contiene la metà dei cromosomi della cellula madre). Le informazioni per la mitosi sono contenute su geni diversi da quelle per la meiosi, e quindi le cellule che fanno parte della linea germinale hanno attivi solo i geni per la meiosi, mentre le cellule somatiche solo quelli per la mitosi.



Il DNA (acido desossiribonucleico) è un polimero formato da due catene polinucleotidiche che si avvolgono l'una attorno all'altra formando una doppia elica. Contiene le istruzioni genetiche per lo sviluppo, il funzionamento, la crescita e la riproduzione di tutti gli organismi. I nucleotidi del DNA sono molecole formate da una base azotata (citosina [C], guanina [G], adenina [A] o timina [T]), uno zucchero (desossiribosio) e un gruppo fosfato. I nucleotidi dell'RNA (acido ribonucleico) sono simili, ma lo zucchero è il ribosio e l'uracile [U] sostituisce sempre la timina [T].

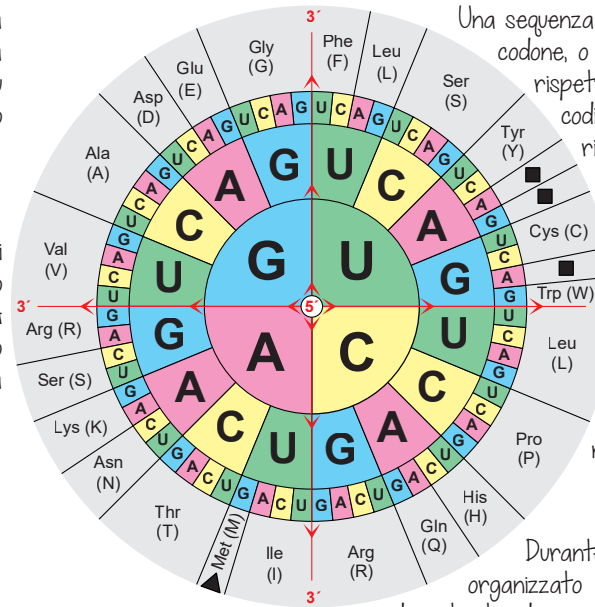
I legami formati tra zucchero e gruppo fosfato sono legami fosfodiesterici tra il 3° carbonio di uno zucchero e il 5° carbonio dello zucchero adiacente. Pertanto, qualsiasi filamento di DNA ha un'estremità alla quale è presente un gruppo fosfato ( $-PO_4^{3-}$ ) attaccato al carbonio 5' di uno zucchero e l'altra estremità con un gruppo ossidrilico ( $-OH$ ) legato al carbonio 3' di uno zucchero. In una doppia elica di un acido nucleico, la direzione dei nucleotidi in un filamento è opposta alla loro direzione nell'altro filamento: i filamenti sono antiparalleli.

I nucleotidi sono uniti l'uno all'altro in una catena da legami covalenti tra lo zucchero di un nucleotide e il fosfato del successivo. Le basi azotate dei due filamenti sono legate insieme con legami idrogeno per formare il doppio filamento, secondo la regola di appaiamento delle basi (A con T e C con G).



Il codice genetico sono le regole utilizzate universalmente da tutti gli esseri viventi (tranne alcuni batteri che hanno delle variazioni) per tradurre le informazioni contenute nel materiale genetico in proteine. Nel DNA e nell'RNA le informazioni sono scritte sotto forma di nucleotidi, che grazie alle diverse basi azotate permettono di creare una sequenza universalmente riconosciuta e tradotta allo stesso modo da quasi tutti gli esseri viventi (esistono eccezioni per alcuni microorganismi).

Un solo nucleotide non sarebbe in grado di codificare un amminoacido, dato che le proteine sono formate da 20 diversi amminoacidi. Neanche 2 nucleotidi sarebbero sufficienti, perché le possibili configurazioni sarebbero  $4^2 = 16$ . Sono quindi necessari 3 nucleotidi per codificare in modo univoco un amminoacido, potendo creare  $4^3 = 64$  configurazioni diverse.



Una sequenza di 3 nucleotidi è l'unità codificante, e viene chiamata codone, o tripletta. Dato che esistono più combinazioni possibili rispetto agli amminoacidi, alcuni amminoacidi vengono codificati da più codoni, quindi il codice genetico è ridondante, o degenerato.

Oltre alle triplette che codificano un amminoacido, esistono anche delle triplette di stop (UAA, UAG, UGA), che non codificano nessun amminoacido e causano il termine della sintesi proteica. Esiste anche una tripletta di start, che indica qual è la posizione da cui inizierà la lettura (ma da solo non è in grado di far partire il processo di traduzione). Il codone di start è AUG, e corrisponde all'amminoacido metionina.



Durante la maggior parte del ciclo cellulare il DNA è organizzato in cromatina, un complesso DNA-proteine, e solo durante la divisione cellulare la cromatina condensa nei cromosomi. L'organizzazione in cromatina serve per evitare che il DNA si aggrovigli e per regolare l'espressione genica e la replicazione del DNA. Esistono due tipi di cromatina. L'eucromatina è la forma di DNA meno compatta e contiene geni che sono frequentemente espressi dalla cellula. L'eterocromatina è la forma più compatta e contiene DNA raramente trascritto. Questo significa che la compattezza della cromatina indica la disponibilità dei geni ad essere trascritti, quindi l'eucromatina è la parte di DNA disponibile epigeneticamente e viceversa. Al microscopio elettronico l'eucromatina appare di colore più chiaro dell'eterocromatina.

Nelle persone con più di un cromosoma X, come le femmine 46XX, uno dei 2 cromosomi, o tutti tranne uno nel caso ce ne siano di più, viene quasi completamente inattivato nel corpo di Barr, per far sì che il corredo genetico sia uguale a quello delle persone con un solo cromosoma X, come i maschi 46XY.



Per arrivare dal DNA ad una proteina si passa attraverso 2 fasi:

- 1. La trascrizione da DNA a mRNA (RNA messaggero), che avviene nel nucleo grazie al complesso enzimatico RNA polimerasi II (l'RNA polimerasi I sintetizza l'rRNA, l'RNA che forma i ribosomi, mentre l'RNA polimerasi III sintetizza il tRNA, l'RNA transfer, una molecola che ad una estremità ha l'anticodone corrispondente alla tripletta e dall'altro lato l'amminoacido corrispondente alla tripletta, permettendo quindi il trasporto del corretto amminoacido al ribosoma).
- 2. La traduzione da mRNA a sequenza polipeptidica, svolta dai ribosomi con l'ausilio del tRNA, che trasporta gli amminoacidi corrispondenti al codone.

## L'epigenetica



Come abbiamo visto la presenza di un gene non implica che esso verrà trascritto, né quando e in che misura. La regolazione dell'espressione genica avviene attraverso numerosi meccanismi. Ad esempio i segnali intracellulari possono indicare alla cellula di cosa ha bisogno, o i recettori specifici per un ormone possono indicare alla cellula la necessità di compiere delle attività (es. la duplicazione) che necessitano della sintesi di alcune proteine.

Ogni gene ha una sezione di DNA che permette il legame con l'RNA polimerasi II e quindi l'inizio della trascrizione; questa sezione si chiama promotore ed è posizionata a monte del sito di inizio della regione di trascrizione. Alcuni promotori sono specifici per un singolo fattore di trascrizione, mentre altri non sono specifici.



Gli ormoni, una volta che raggiungono la membrana cellulare, interagiscono con dei recettori (proteine transmembrana), causandone una modifica conformazionale e la trasmissione del segnale all'interno della cellula, fino al nucleo, attraverso delle reazioni a cascata. Una volta che il segnale sarà arrivato al nucleo modifica un fattore di trascrizione (ad esempio attraverso la fosforilazione) causandone una modifica conformazionale e attivandolo. L'attivazione del fattore di trascrizione comporta una maggiore affinità per uno specifico promotore.

In pratica i fattori di trascrizione rendono possibile l'attacco (il reclutamento) dell'RNA polimerasi II e di conseguenza la trascrizione del DNA in RNA. Questo viene fatto in vari modi, come stabilizzando il legame del DNA con l'RNA polimerasi II o acetilando le proteine istoniche, e quindi indebolendone l'associazione con il DNA e rendendolo più accessibile alla trascrizione. Questo può essere anche fatto con l'ausilio di enzimi.

Esistono anche specifiche sequenze di DNA, chiamate enhancer, che venendo spazialmente in contatto con il promotore, interagiscono con esso permettendo l'inizio della trascrizione. Gli enhancer si possono trovare anche molto lontani lungo la sequenza di nucleotidi dal promotore con cui interagiscono, in alcuni casi anche su altri cromosomi, ma tridimensionalmente si troveranno vicini, dato il complesso ripiegamento del DNA causato dai nucleosomi (le unità di cromatina composte da 8 proteine istoniche + il DNA che le circonda).

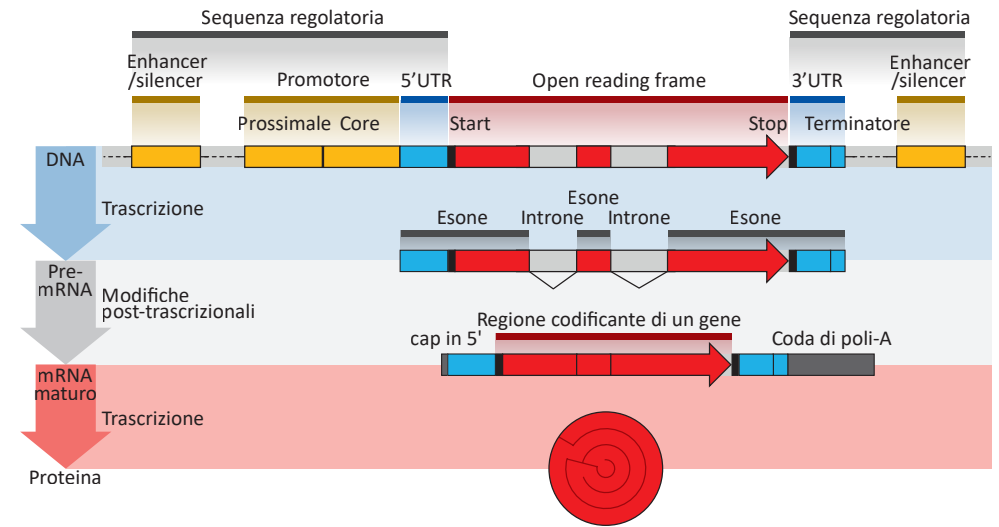
Una volta che la macchina di trascrizione entra in contatto con il promotore ne riconosce una specifica zona, la TATA box, formata da una sequenza di Timina, Adenina, Timina, Adenina... e, creando una bolla di replicazione può iniziare la trascrizione. L'apertura della bolla è facilitata dal fatto che nelle coppie di basi AT ci sono solo 2 legami idrogeno. Il riconoscimento della TATA box avviene grazie al TBP (TATA Binding Protein).



L'RNA polimerasi II sintetizza il pre-mRNA, cioè la copia del DNA inclusi gli introni, che non saranno tradotti nella proteina finale. Questo comporta che il pre-mRNA deve maturare prima di poter venir tradotto. Durante la traduzione è l'RNA polimerasi II che scorre sul DNA, seguendone l'andamento e ruotandoci attorno, in modo da non causare attorcigliamenti.

La maturazione del DNA consta di 3 fasi:

- ♡ Splicing: eliminazione delle sequenze introniche
- ♡ Capping: aggiunta di un nucleotide alterato all'estremità 5'
- ♡ Poliadenilazione: aggiunta di una serie di adenine all'estremità 3'



Queste 3 operazioni non avvengono per forza dopo la fine della sintesi dell'RNA, ma già mentre l'RNA viene sintetizzato. Per esempio appena parte la sintesi già viene eseguito il capping, che ha lo scopo di proteggere l'RNA dalle endonucleasi, enzimi che scompongono l'RNA.

La poliadenilazione serve anche per impedire all'RNA di essere degradato, ma in questo caso ne rallenta solo la degradazione, quindi la quantità di adenine aggiunte indica il tempo di permanenza di quell'RNA, questo perché le adenine al termine fungono da bersagli che vengono man mano rimossi prima di arrivare all'mRNA. La poliadenilazione avviene dopo che la sintesi dell'RNA è terminata. A questo punto la RNA polimerasi II può tornare indietro e ripetere la sintesi fino a quando il fattore di trascrizione rimarrà attivo e attaccato al promotore.

L'eliminazione degli introni è indispensabile per avere l'mRNA maturo che verrà tradotto in una proteina. L'inizio dell'introne è segnalato dalla presenza di sequenze specifiche GU. Grazie a queste sequenze l'inizio dell'introne viene tagliato. Una volta tagliato, l'introne forma un'ansa e si lega con la sua estremità libera ad una specifica sequenza alla fine dell'introne, causandone il taglio da parte delle proteine dello splicing subito dopo, in AG.

Uno dei meccanismi che permette ad un gene di codificare più isoforme di una proteina è lo splicing alternativo, cioè l'aggancio dell'inizio di un introne (GU) alla fine di un altro introne più avanti, causando anche l'eliminazione di uno o più esoni. Alternativamente il gene può contenere diversi esoni tra cui scegliere.

Un altro meccanismo che porta alla formazione di isoforme diverse di una proteina a partire dallo stesso gene è la presenza di siti di start alternativi all'interno di introni.

# Le mutazioni genetiche



Una mutazione ad un gene può causare direttamente la formazione di una proteina alterata se avviene su un esone. Se avviene in un introne può comunque avere effetti negativi sulla vita, come un'alterazione del codice dello splicing, soprattutto se avviene in corrispondenza delle giunzioni introne-esone. Questo impedisce la corretta maturazione dell'mRNA portando alla creazione di una proteina errata.

Una mutazione del codone di stop fa sì che la trascrizione non si arresti dove dovrebbe, ma più avanti, quando incontrerà un altro codone di stop. Questo mRNA alterato conterrà sequenze che non dovrebbero esserci.

Dato che alle estremità dell'mRNA ci sono dei codici specifici che controllano il capping e la poliadenilazione, una mutazione in queste zone può compromettere la stabilità dell'mRNA causandone l'immediata degradazione.

Una mutazione al promotore o all'enhancer, anche se non ha direttamente effetto sulla proteina finale, può alterare l'espressione del gene impedendo che venga trascritto in mRNA.

Dato che alcuni amminoacidi corrispondono a più di un codone, come la leucina che viene tradotta da 6 diverse triplette, saranno molto frequenti nella proteina finale, mentre altri, codificati da un solo codone, saranno più rari. Gli amminoacidi tradotti da più di una tripletta sono più resistenti agli errori, perché è più probabile che la mutazione di una singola base continui a tradurre per lo stesso amminoacido.

Non tutte le differenze all'interno di un gene saranno patologiche, e quando una differenza non lo è si parla di polimorfismo.

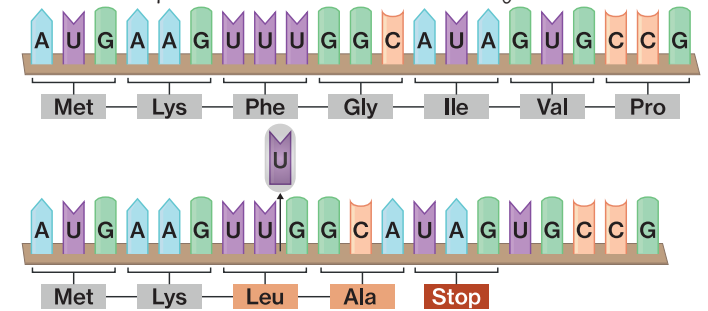


Le mutazioni del DNA che riguardano il codice amminoacidico possono essere di vari tipi:

	Codone	Silente	Non senso	Neutra	Missenso
DNA	5' AAG 3' 3' TTC 5'	AAA TTT	TAG ATC	AGG TCC	ACG TGC
mRNA	5' AAG 3'	AAA	UAG	AGG	ACG
Proteina	Lys	Lys	STOP	Arg	Thr
			■		

**Missenso** ⇒ Sostituzione di un amminoacido con un altro. Ha un impatto variabile sulla proteina in base alla natura della proteina e alla posizione della mutazione (ad esempio se avviene in corrispondenza del sito attivo di un enzima può impedirne completamente il funzionamento).

- Non senso** ⇒ Un codone di un amminoacido diventa un codone di stop. Più è anticipato rispetto alla lunghezza della proteina più è probabile che il danno impedisca alla proteina di svolgere il suo compito.
- Neutra** ⇒ Sostituzione di un amminoacido con un altro chimicamente simile. Questo può comunque comportare alcune differenze nella struttura terziaria e nel modo in cui gli enzimi modificano quella proteina.
- Silente** ⇒ Sostituzione di un codone con un altro che codifica per lo stesso amminoacido. Non ha effetti sulla proteina prodotta, perché non modifica il codice amminoacidico, ma può rompere il codice dello splicing se la modifica è vicino la giunzione esone-introne.
- Frameshift** ⇒ Aggiunta o rimozione di un numero di basi non multiplo di 3. Questa mutazione comporta lo sfasamento degli amminoacidi dei codoni a partire dalla mutazione fino al termine della sequenza, che codificheranno amminoacidi totalmente diversi da quelli originali. È anche possibile che poco dopo il frameshift si crei una tripletta di stop portando alla formazione di una proteina tronca. Il danno è tale che di solito la proteina viene immediatamente degradata.

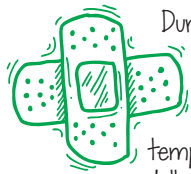


Queste mutazioni possono avvenire sia ad una cellula somatica, influenzando il funzionamento di quella cellula e tutte le cellule figlie, sia ad una cellula germinale, modificando il genoma di tutte le cellule del nuovo organismo.

I danni al DNA possono essere causati da mutazioni ereditate durante la replicazione di una cellula, agenti chimici (in particolare i ROS), sostanze cancerogene (come i nitriti) e mezzi fisici (come le radiazioni ionizzanti). I ROS (specie reattive dell'ossigeno) sono sostanze chimiche altamente reattive come perossidi, superossidi, acido ipocloroso e ozono. L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> viene sintetizzato dai mitocondri durante la fosforilazione ossidativa, e in condizioni di stress la quantità prodotta è maggiore e la cellula può non essere in grado di gestirlo, causando danni al DNA.

Chimicamente le mutazioni che comportano un cambio di una base azotata possono essere per transizione, se una purina viene cambiata con un'altra purina, o per transversione, se una purina viene cambiata con una pirimidina o viceversa. Le purine sono l'adenina e la guanina, mentre le pirimidine sono la citosina, la timina e l'uracile.

# I tipi di errori e la loro riparazione



Durante il normale ciclo della cellula, alcuni complessi proteici scansionano il DNA alla ricerca di errori. Quando trovano un errore lo segnalano attivando altri complessi proteici che decidono se è possibile riparare l'errore o no. Se è possibile ripararlo, la cellula entra in una fase in cui il suo ciclo vitale è temporaneamente sospeso in attesa che l'errore venga risolto. Dopo la risoluzione dell'errore la cellula torna al suo normale funzionamento. Quando una cellula viene arrestata, attiva i meccanismi dello stress che causano i cambiamenti necessari al suo metabolismo affinché l'errore possa venire corretto.

Se il danno è troppo esteso e non è risolvibile, si attivano i meccanismi della morte programmata per impedire che la cellula possa causare danni all'intero organismo. Alcune volte può succedere che le mutazioni stesse impediscano l'attivazione dei meccanismi della morte programmata; in tal caso la cellula continuerà il suo metabolismo in modo non fisiologico.

La capacità della cellula di riparare un danno al DNA dipende, oltre che dall'estensione del danno, anche dal tipo di danno:

Rottura del singolo filamento



Si verifica una rottura ad un singolo filamento della doppia elica del DNA (single strand break) con conseguente perdita di basi. Questi errori sono tra i più facili da riparare, perché esiste l'altro filamento che fa da stampo per la ricostruzione di quello danneggiato. La riparazione viene effettuata da un complesso multiproteico chiamato BER (Base Excision Repair).

Rottura del doppio filamento



Si verifica la rottura di entrambi i filamenti della doppia elica nello stesso punto (double strand break) con conseguente perdita di basi. Questi errori sono particolarmente difficili da riparare dato che non c'è uno stampo da cui recuperare le informazioni perdute e si crea anche una discontinuità nella doppia elica. Le basi perse vengono copiate dall'altro cromosoma omologo (ricombinazione omologa) che si troverà nei pressi di quello danneggiato. Alcuni chemioterapici creano volontariamente questo tipo di danno, a cui saranno più sensibili le cellule in rapida replicazione, cioè proprio le cellule tumorali. Alcune persone nascono con mutazioni ai geni delle proteine che riparano questo danno, portando ad un accumulo nel tempo delle mutazioni e ad una predisposizione per alcuni tipi di tumore, come mammella e ovaio.

Appaiamenti errati

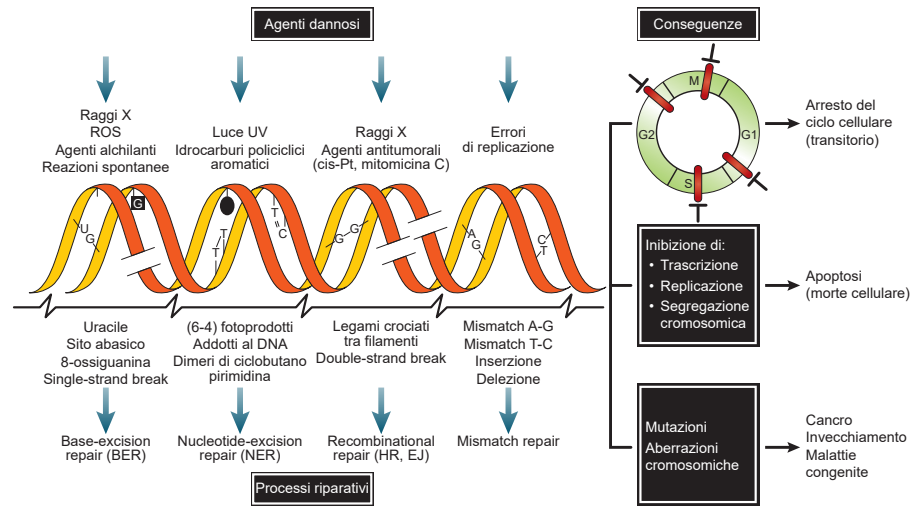


Si verifica un appaiamento errato tra 2 Timine adiacenti dello stesso filamento. Vengono riparati dal complesso NER (Nucleotide Excision Repair).

Errori di mismatch



Si verifica l'appaiamento errato tra le basi della doppia elica, ad esempio A con G o T con C. Questo accade durante la duplicazione del DNA, se la DNA polimerasi inserisce una base sbagliata. Può essere corretto da un complesso chiamato MMR, che rimuove la base sbagliata e inserisce quella corretta basandosi sul filamento stampo.



Questi meccanismi di controllo e riparazione non sono sempre attivi, ma lo sono solo in alcuni momenti specifici, chiamati checkpoint del ciclo cellulare. Uno di questi momenti è tra G1 e S, quindi appena prima della sintesi del DNA. Un altro è tra G2 ed M, prima della mitosi, in modo da assicurare che le

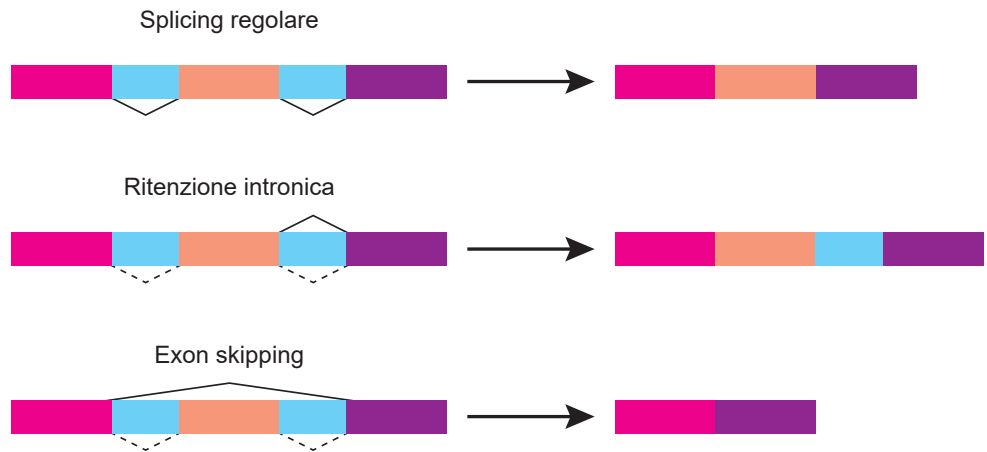
cellule figlie siano il più possibile prive di errori e identiche alla cellula madre. Durante la fase S avviene un ulteriore controllo degli eventuali errori di mismatch a seguito della sintesi del nuovo DNA.

Nel DNA esistono delle cosiddette sequenze microsatelliti, sequenze lunghe circa 20 basi fatte da ripetizioni di 1-5 nucleotidi. Sono presenti varie volte all'interno del DNA, spesso nella parte non codificante, e la lunghezza delle ripetizioni è sempre la stessa nell'individuo, ma cambia tra diversi individui, rendendo possibile usarli come "impronta digitale" nella genetica forense. La specifica conformazione delle sequenze microsatelliti rende possibile che, durante la replicazione del DNA, la DNA polimerasi possa scivolare e sintetizzare qualche base in più o in meno creando delle "bolle" a causa della diversa lunghezza dei 2 filamenti. Quando queste sequenze si trovano negli esoni è necessario riparare il danno con delle proteine specifiche. Una persona nata con errori nei geni che codificano queste proteine (ma la mutazione in questi geni può verificarsi anche somaticamente) ha una maggiore probabilità di sviluppare tumori con instabilità dei microsatelliti (MSI). Ad esempio molti tumori del colon-retto presentano questa caratteristica. L'immunoterapia può essere valida per questo tipo di tumori poiché espongono antigeni caratteristici sulla membrana cellulare.

Una mutazione al DNA, oltre ad interessare direttamente il codice amminoacidico, cioè gli esoni, può anche colpire gli altri 3 codici: il codice dello splicing, il codice regolatorio (promotore/enancer) o la stabilità dell'mRNA (capping/poliadenilazione).

Per quanto riguarda il codice dello splicing, le mutazioni riguardano spesso la giunzione esone-introne, e possono causare diversi errori:

- Ritenzione intronica ⇨ L'introne non viene riconosciuto come tale, quindi rimane nell'mRNA un grande esone che comprende l'esone precedente all'introne, l'introne e l'esone successivo. Questo può causare problemi come frameshift o riconoscimento di un codone di stop che non dovrebbe esserci.
- Exon-skipping ⇨ Non viene riconosciuta l'estremità di un introne. Come conseguenza l'ansa dell'introne comprenderà oltre all'introne stesso anche l'esone successivo e l'introne successivo. Nell'mRNA ci sarà un esone in meno. Questo comporta la formazione di una proteina non funzionante.
- Ritenzione intronica parziale ⇨ L'introne non viene riconosciuto dove dovrebbe iniziare, ma più avanti, quindi una parte di esso rimarrà nell'mRNA.
- Exon-skipping parziale ⇨ Una parte dell'esone verrà eliminato insieme all'introne, causandone la parziale mancanza nell'mRNA.



## La replicazione del DNA



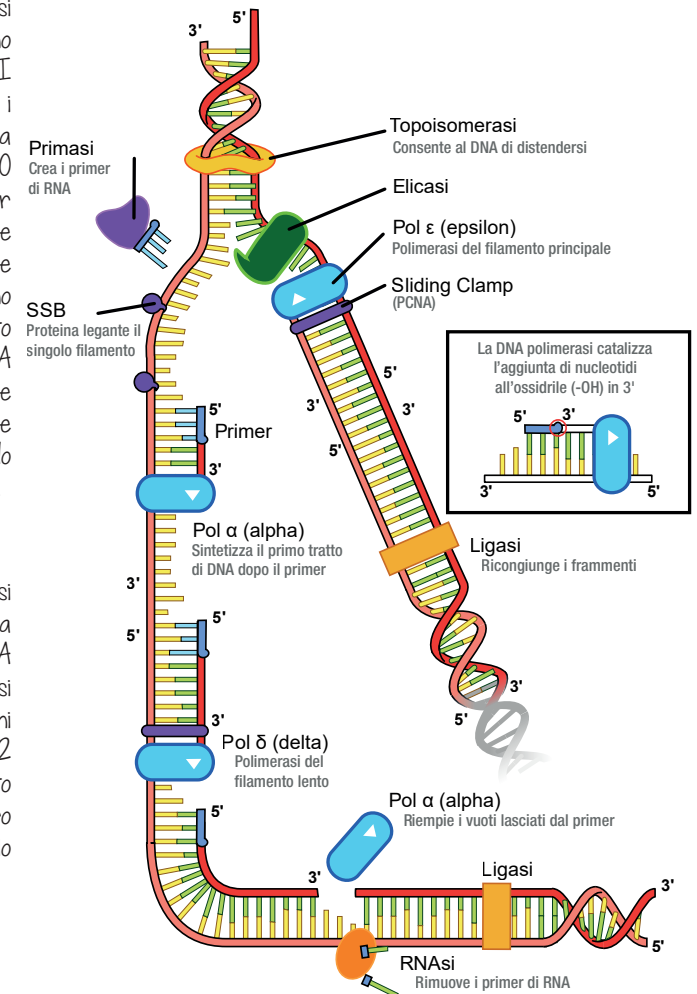
La replicazione del DNA avviene durante la fase S del ciclo cellulare.

Il processo inizia con l'apertura di un'ansa, detta forcella di replicazione, nella doppia elica di DNA da parte della DNA elicasi e la creazione di un primer di RNA da parte di una primasi, perché la DNA polimerasi non può iniziare la creazione di un filamento, ma solo allungarne uno esistente.

A questo punto, la DNA polimerasi III scorre sul filamento stampo di DNA in direzione 3'-5' e sintetizza il nuovo filamento in direzione 5'-3'. I 2 filamenti della doppia elica devono essere entrambi replicati, ma dato che hanno orientamento opposto e la DNA polimerasi può procedere alla sintesi solo in direzione 5'-3', solo per uno dei 2 filamenti la sintesi potrà avvenire senza interruzioni e velocemente.

Sull'altro filamento la sintesi sarà discontinua e verranno creati numerosi primer. I frammenti di DNA formano i frammenti di Okazaki della lunghezza di circa 1000-2000 nucleotidi. Questi primer vengono poi rimossi dalle RNasi (ribonucleasi), delle nucleasi che catalizzano l'idrolisi dell'RNA. In seguito interviene una DNA polimerasi I che colma le lacune e una DNA ligasi che unisce i frammenti creando un filamento di DNA continuo.

Questo processo fa sì che si formino 2 copie esatte della doppia elica di DNA attraverso una sintesi semiconservativa, cioè in ogni doppia elica, uno dei 2 filamenti sarà il filamento stampo preesistente e l'altro filamento sarà quello neosintetizzato.



# Il ciclo cellulare



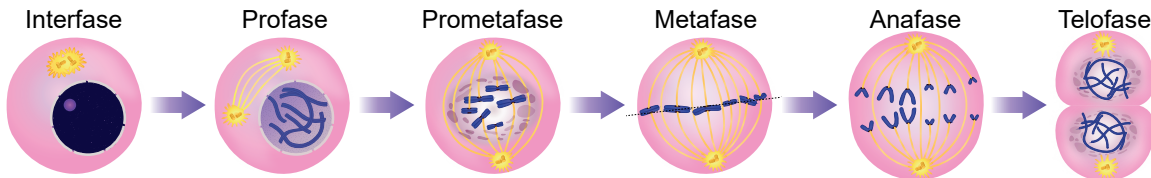
La cellula attraversa diverse fasi nella propria vita, che susseguendosi in modo ciclico permettono alla cellula di svolgere le sue attività metaboliche e replicarsi. Esistono 2 processi diversi di duplicazione cellulare: la mitosi per le cellule somatiche e la meiosi per le cellule della linea germinale. La mitosi produce 2 cellule figlie perfettamente identiche come corredo genetico alla cellula madre.

Le fasi del ciclo cellulare per le cellule somatiche sono:

Interfase	Fase G <sub>0</sub>	⇒ Fase di riposo in cui la cellula ha smesso di dividersi. Alcune cellule, come i neuroni, rimangono in questa fase per tutta la loro vita.
	Fase G <sub>1</sub>	⇒ Fase di crescita. È una delle più lunghe perché in questa fase la cellula svolge il suo metabolismo preparandosi alle fasi successive. Durante questa fase la cellula possiede 46 cromosomi monocromatidici.
	Fase S	⇒ Fase della replicazione del DNA. In questa fase avviene la sintesi del DNA in modo da poter dare ad entrambe le cellule figlie il patrimonio genetico completo. Alla fine di questa fase la cellula avrà 46 cromosomi dicromatidici.
	Fase G <sub>2</sub>	⇒ Fase di preparazione alla mitosi. Durante questa fase la cellula va incontro a numerosa sintesi proteica e crescita per prepararsi alla mitosi, oltre a riorganizzare la propria struttura.
	Fase M	⇒ Fase della divisione cellulare. La cellula si divide in modo da avere 2 cellule figlie entrambe con 46 cromosomi monocromatidici.

La mitosi a sua volta può essere scomposta in 5 fasi:

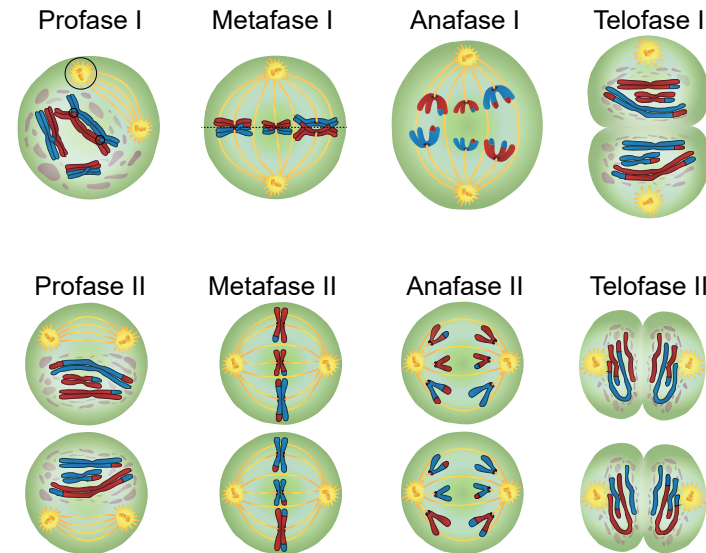
Profase	⇒ La cromatina condensa nei cromosomi (46 dicromatidici, i cromatidi sono uniti al centromero) e inizia la formazione del fuso mitotico. Il nucleolo scompare.
Metafase	⇒ Il nucleo scompare, i cromosomi si allineano all'equatore (piastra metafasica) e i due centrosomi ai poli agganciano i cromosomi.
Anafase	⇒ I cromatidi si separano portando alla formazione di 92 cromosomi monocromatidici. La cellula si allunga ai poli.
Telofase	⇒ La cellula si allunga ulteriormente, si riformano i nuclei e i cromosomi si decondensano.
Citodieresi	⇒ Si crea una strozzatura e la cellula si divide. In alcuni casi questo non accade e si forma una cellula con più nuclei.



Le cellule della linea germinale (ovociti e spermatozoi) vanno incontro a meiosi, che prevede una doppia divisione cellulare ma una sola duplicazione del DNA.

Durante l'interfase I avviene la sintesi di DNA, e durante la profase I si accoppiano i cromosomi omologhi e avviene il crossing-over, un processo di Double Strand Breaks controllato che permette lo scambio di porzioni omologhe di materiale genetico fra due cromatidi di cromosomi omologhi ricombinando il materiale genetico. Tra gli eventuali cromosomi XY il crossing-over dovrebbe avvenire solo tra la porzione omologa dei 2 cromosomi.

Durante l'anafase I, invece di separarsi i cromatidi fratelli, si separano i cromosomi omologhi, andando a formare 2 cellule aploidi con 23 cromosomi dicromatidici.



L'interfase II non comporta alcuna sintesi di DNA, e la meiosi II procede in modo simile alla mitosi, con la separazione dei cromatidi fratelli. Si avranno 4 cellule aploidi con 23 cromosomi monocromatidici.



La meiosi ha obiettivi diversi nei 2 sessi. La spermatogenesi inizia con la pubertà e porta alla formazione di 4 spermatozoi aploidi grazie alle 2 meiosi.

L'oogenesi inizia con la meiosi I già a 3 mesi di gestazione, rimanendo però bloccata in profase I fino alla pubertà. La maggior parte del citoplasma finisce ad uno dei 2 ovociti primari. La meiosi II rimane bloccata in metafase II e viene completata solo in seguito alla fecondazione dell'ovulo, e anche in questo caso una cellula conterrà la maggior parte del citoplasma. La divisione è asimmetrica, e oltre all'ovulo, si formano i globuli polari, che hanno il solo scopo di permettere la formazione dell'ovulo e vengono riassorbiti dal corpo.

Dato che gli ovuli rimangono dormienti per decenni, un ovulo accumulerà col passare degli anni delle mutazioni genetiche, che aumentano la probabilità di aborti spontanei o malformazioni.

L'incontro tra l'ovulo e lo spermatozoo permette, a partire da 2 gameti con 23 cromosomi monocromatidici, di generare uno zigote con 46 cromosomi monocromatidici, che in seguito andrà incontro a normali mitosi. Mentre lo spermatozoo dona solo metà del patrimonio genetico, la cellula uovo dona anche i mitocondri (con il loro DNA) e il citoplasma con tutti gli organelli e le strutture intracellulari.

## Le anomalie nella meiosi



vanno incontro.

Le anomalie durante la meiosi delle cellule germinali porteranno in alcuni casi ad una malattia o malformazione genetica, mentre in altri casi saranno totalmente incompatibili con la vita. Dato che l'oogenesi e la spermatogenesi sono due processi molto diversi tra loro, saranno diverse anche le anomalie a cui



Nella spermatogenesi l'errore più frequente sono anomalie cromosomiche strutturali (11%). Queste anomalie avvengono principalmente perché la spermatogenesi è un processo molto rapido. In queste anomalie il numero dei cromosomi è sempre 46, ma la loro composizione è alterata, cioè ci è stato uno scambio di materiale genetico tra cromosomi.

Se l'anomalia cromosomica strutturale è bilanciata non vengono persi geni e il danno potrebbe essere compatibile con la vita (ma potrebbe avere effetti negativi sulla capacità riproduttiva del nascituro perché la meiosi può portare ad una parziale monosomia o trisomia), infatti circa lo 0,5% dei nati vivi ne ha almeno 1. Se invece è sbilanciata, del materiale genetico può andare perduto o essercene in eccesso, e solitamente non è compatibile con la vita.

Questi riarrangiamenti possono essere intercromosomici o intracromosomiche. Queste ultime possono comportare delezioni (perdita di materiale), duplicazioni o inversioni (una porzione discreta si inverte), e possono non avere significato clinico se la rottura non coinvolge geni. Una rottura delle estremità può far diventare il cromosoma circolare interferendo con la replicazione cellulare. Quelli intercromosomici possono essere traslocazioni reciproche se 2 parti rotte di 2 cromosomi si attaccano al cromosoma sbagliato o traslocazioni robertsoniane se 2 cromosomi si uniscono in 1.



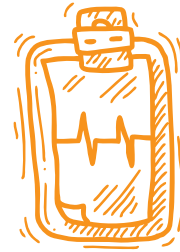
Nell'oogenesi, al contrario della spermatogenesi, la probabilità di incorrere in un errore aumenta con l'aumentare dell'età. In questo caso gli errori più frequenti saranno anomalie cromosomiche numeriche (24%), cioè il prodotto del concepimento avrà un numero di cromosomi diverso da 46.

Possono riguardare sia gli autosomi che i cromosomi sessuali. La causa di questi errori spesso è riconducibile alle meiosi: durante l'anafase può capitare che tutta la tetrate (meiosi I) o entrambi i cromatidi (meiosi II) vengano portati ad un polo, creando alla fine un ovulo con un cromosoma in meno e uno con un cromosoma in più.

Solo il 6-10% dei feti con alterazioni cromosomiche giunge al termine della gravidanza. La sopravvivenza dipende principalmente dal numero dei geni portati dal cromosoma in difetto o in eccesso, ad esempio è più probabile che nasca un neonato con trisomia 21 e non con trisomia 13, perché il cromosoma 21 ha molti meno geni del cromosoma 13. In ogni caso i nascituri con trisomia 13 o 18 non sopravvivono oltre il 1° anno di età, mentre la trisomia 21 causa la sindrome di Down.

Per quanto riguarda le anomalie nei cromosomi sessuali, le più comuni sono la sindrome di Klinefelter (47XXY, fenotipo maschile), la sindrome della tripla X (47XXX, fenotipo femminile) che è caratterizzata da un'elevata sopravvivenza a causa dell'inattivazione delle X, e la sindrome di Turner (45X0, fenotipo femminile ma con alcune anomalie fisiche).

## Le indagini citogenetiche



Ci sono alcuni casi che possono far pensare alla possibilità che ci sia un'anomalia genetica. In questi casi sono indicate delle indagini citogenetiche.

Le indagini citogenetiche postnatali sono indicate in caso di:

- \* Genitori di soggetti con anomalie note o sospettate alla morte
- \* Segni che suggeriscono un'anomalia
- \* Deficit mentali
- \* Difetti della crescita
- \* Parto di feti morti o aborti spontanei
- \* Infertilità o amenorrea

L'indagine più immediata è lo studio del cariotipo, cioè l'analisi del corredo cromosomico del soggetto. Il DNA viene recuperato da un prelievo di sangue, da cui si estraggono i globuli bianchi, le uniche cellule del sangue normalmente nucleate. Questi ultimi vengono fatti replicare per aumentare il campione statistico, poi il ciclo cellulare viene bloccato in metafase, quando la cromatina si trova al suo massimo stato di condensazione e sono chiaramente distinguibili i cromosomi. Questo è possibile mediante un veleno del fuso mitotico, sostanze che inibiscono i cinetocori e impediscono loro di formare attacchi adeguati ai microtubuli del fuso mitotico, facendo fallire il checkpoint dell'assemblaggio del fuso (vengono usati anche contro i tumori). A questo punto si rompe la membrana citoplasmatica con una soluzione ipotonica e si analizzano i cromosomi al microscopio ottico.



Le indagini citogenetiche prenatali, cioè che vengono effettuati al prodotto del concepimento prima della nascita, sono indicate in questi casi:

- \* Età materna > 35 anni (a questa età il rischio di alterazioni cromosomiche supera quello di aborti causati da amneocentesi o villocentesi)
- \* Riarrangiamento cromosomico strutturale noto nel genitore
- \* Riarrangiamento cromosomico numerico (cariotipo aneuploide)
- \* Chemioterapia o terapie a base di radiazioni ionizzanti
- \* Malformazioni fetali osservate in ecografia
- \* Aborti spontanei ripetuti nel primo trimestre o feto nato morto
- \* Precedenti gravidanze con neonati nati con malformazioni
- \* Test biochimici positivi

I test biochimici sono indagini non invasive predittive di anomalie genetiche. Esistono vari test a questo scopo, come il bi-test e il tri-test, ma quello con la detection rate maggiore è il test  $\beta$ hCG combinato con ecografia delle ossa lunghe e nasali. Questo test combina analisi biochimiche sul



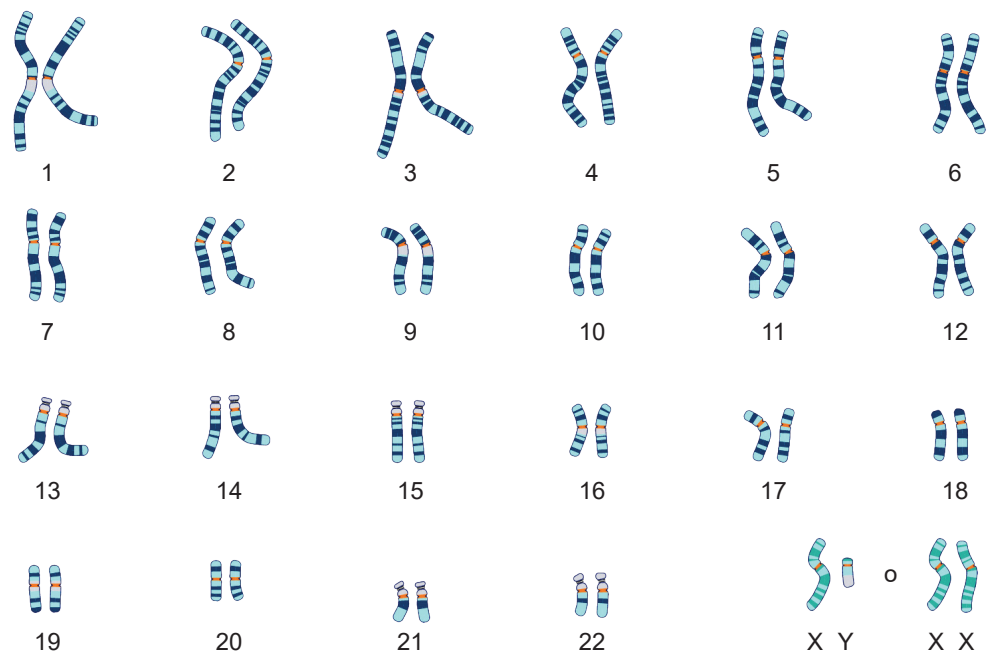
sangue della persona in gravidanza e rilevamento di alcune proteine plasmatiche, oltre alla misurazione ecografica di alcune ossa del feto. Oltre a questa analisi esiste anche l'analisi delle tracce di DNA fetale nel sangue materno. Per tutti questi test, in caso di risultato positivo è necessario procedere ad una amniocentesi o villocentesi per confermare la positività.



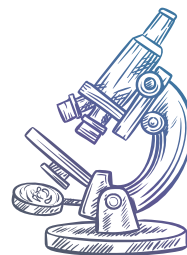
La villocentesi è un metodo per prelevare DNA placentale. Si effettua tra la 9<sup>a</sup> e la 12<sup>a</sup> settimana di gestazione e prevede il prelievo transaddominale, attraverso un ago, dei villi coralli (la parete fetale della placenta), che contengono il DNA del feto. I villi vengono coltivati e trattati in modo simile ai linfociti per l'analisi del cariotipo ma l'analisi non è accuratissima perché i villi sono più tolleranti agli errori ed è normale trovarne alcuni con delle mutazioni.

Nell'amniocentesi invece si prelevano gli amniociti, cellule che si separano dal feto e circolano nel liquido amniotico. L'amniocentesi è più accurata della villocentesi perché il materiale genetico proviene direttamente dal feto. Questa procedura può essere effettuata tra la 15<sup>a</sup> e la 17<sup>a</sup> settimana di gestazione, quando la possibilità di ricorrere all'aborto è maggiormente controllata e possibile solo in alcuni casi in cui la vita della madre è a rischio.

Entrambe le procedure prevedono il passaggio dell'ago attraverso la muscolatura uterina, e questo stress provoca delle contrazioni uterine che solitamente si arrestano. Nell'1% delle villocentesi e nello 0.5% delle amniocentesi le contrazioni non si arrestano e questo porta all'espulsione del feto, quindi ad un aborto. Per questo queste procedure vengono indicate solo in alcuni casi in cui il rischio di aborto è accettabile.



## Il cariotipo



Un cariotipo è lo schema dell'insieme di cromosomi nelle cellule di un organismo. Nel cariotipo i cromosomi sono ordinati per dimensione e posizione del centromero. Grazie ad esso è possibile individuare il corredo cromosomico ed eventuali anomalie.

Morfologicamente i cromosomi hanno un centromero e 2 bracci; il braccio p è quello più corto e il braccio q è quello più lungo. In base alla posizione del centromero un cromosoma può essere metacentrico se i 2 bracci hanno all'incirca la stessa lunghezza, submetacentrico se uno dei 2 bracci è sensibilmente più corto dell'altro e acrocentrico se il centromero si trova ad un'estremità, quindi il braccio p è molto corto.

Ogni cromosoma ha alcune zone in cui la cromatina è maggiormente condensata ed altre in cui è minormente condensata. Vengono usati alcuni coloranti per poter analizzare la struttura del singolo cromosoma, coloranti che hanno un'affinità maggiore per alcune zone del cromosoma e minore per altre, a causa ad esempio della presenza di sequenze ripetute, densità della cromatina, presenza di geni a attività della trascrizione diversa.

Le tecniche di colorazione sono state standardizzate in modo da essere ripetibili e fornire sempre lo stesso risultato. La colorazione risultante ha un aspetto a bande, e trattamenti diversi producono schemi diversi di bande. Le bande vengono numerate a partire dal centromero verso i telomeri, dividendo i bracci in regioni (2), subregioni e subsubregioni (variabili).

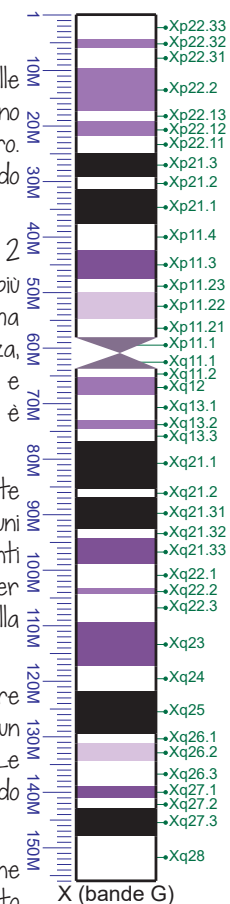
Le bande G sono tra le più utilizzate. Le bande positive sono ricche di adenine e timine, quindi con pochi geni. La colorazione è permanente e molto contrastata, quindi si possono osservare con un microscopio ottico classico. Di contro il trattamento è difficilmente standardizzabile e i preparati devono essere invecchiati.

Le bande Q sono utili per lo studio della zona eterocromatica dei cromosomi 1, 9, 16 e Y, oltre che delle zone organizzatrici nucleolari dei cromosomi acrocentrici. Sono semplici da ottenere, molto informative, non richiedono invecchiamento evidenziano bene i satelliti. Di contro non sono permanenti e la strumentazione necessaria è più costosa.

Le bande R vengono usate per lo studio dei telomeri e dei riarrangiamenti del cromosoma X, e le bande C permettono di identificare polimorfismi cromosomici, centromeri e markers cromosomici.



Per la ricerca di difetti quantitativi tra 40Kb e 4Mb si ricorre alla citogenetica molecolare (sonde Fish). Si usano sonde fluorescenti (fatte da pezzi di DNA specifici marcate con sostanze fluorescenti) per osservare piccole regioni. Il DNA viene denaturato con alta temperatura, facendo aprire la doppia elica, poi lo si mette in contatto con la sonda, che, abbassando la temperatura, si attacca alla regione target (se c'è), rendendola colorata in fluorescenza.



X (bande G)

## L'ereditarietà e gli effetti sul fenotipo



I caratteri ereditari sono definiti dai nostri geni, e possono essere monofattoriali (cioè uno specifico carattere è determinato da un solo gene), polifattoriali (un carattere è determinato da più geni) o mitocondriali (determinati dal corredo genetico dei mitocondri). Quelli monofattoriali si dividono in autosomici e legati ai cromosomi sessuali, con caratteristiche di trasmissione diverse.

Per la manifestazione di alcuni caratteri è sufficiente un allele (caratteri dominanti), mentre per altri caratteri entrambi gli alleli (carattere recessivo). Molti caratteri, però, non sono puramente mendeliani, ma mostrano dominanza incompleta, codominanza o, come visto prima, sono determinati da molteplici geni.

Nelle mutazioni ai mitocondri la trasmissione è esclusivamente materna e la severità della patologia dipende esclusivamente dalla percentuale di mitocondri mutati. Si parlerà quindi di eteroplasmia. La patologia si manifesta solo quando la percentuale di mitocondri malati raggiunge un valore soglia. Se tutti i mitocondri sono mutati si parla di omoplasmia.

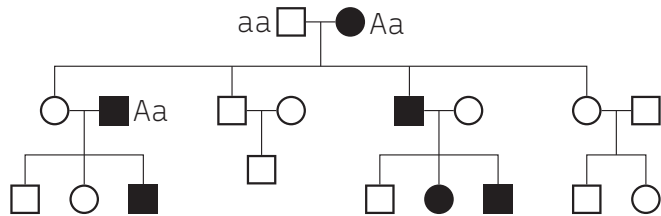
La posizione all'interno del genoma di un gene è chiamata locus genico, e una variazione della sequenza amminoacidica in un locus genico è chiamata allele.



La presenza di un allele, anche dominante, nel genoma non implica però l'espressione di un carattere, ne implica che quel carattere sarà visibile fenotipicamente da subito, perché non tutti i geni vengono espressi, e non tutti i geni che vengono espressi lo fanno da subito. Questo significa che alcune malattie genetiche possono manifestarsi tardivamente. Inoltre ogni gene produce una proteina, ma spesso quella proteina non funziona da sola, quindi la penetranza (cioè la percentuale di portatori di un allele che ne manifestano il fenotipo) può essere incompleta. Anche l'espressività (il grado di manifestazione di un carattere) può non essere uniforme.

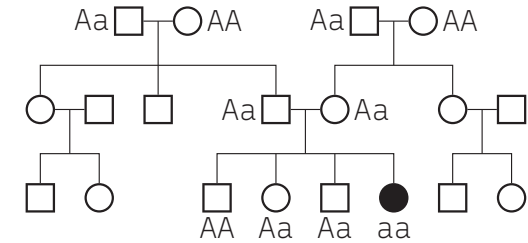


Nella rappresentazione grafica degli alberi genealogici si indica per convenzione con "A" il carattere dominante e con "a" il carattere recessivo. I quadrati rappresentano i soggetti di sesso maschile e i cerchi quelli di sesso femminile. Le forme vuote rappresentano i soggetti che non hanno una manifestazione fenotipica della malattia e le forme piene i soggetti che la esprimono fenotipicamente. Se possibile si cerca di ricostruire almeno 3 generazioni nell'albero genealogico.



In questo esempio di malattia autosomica dominante il genitore di sesso femminile sarà affetto (eterozigote). Il rischio di avere figli affetti è del 50% e il sesso non influenza la probabilità. La

consanguineità non è necessaria e le mutazioni de novo sono frequenti, perché basta un solo allele mutato per la manifestazione.



In questo esempio di malattia autosomica recessiva né nella prima né nella seconda generazione si manifesta la mutazione, ma uno dei figli nati da 2 genitori entrambi portatori sani è malato, presentando un genotipo aa. Il rischio di avere un figlio malato è del 25% se entrambi i genitori sono eterozigoti e dello 0% se uno è eterozigote e l'altro presenta entrambi gli alleli sani e non varia in base al sesso. La consanguineità aumenta notevolmente il rischio di avere figli malati perché rende più probabile che i genitori siano eterozigoti. La possibilità che una mutazione de novo causi la malattia è bassissima, perché dovrebbe avvenire la stessa mutazione su entrambi gli alleli.



A proposito dei caratteri legati al cromosoma X, Nelle persone 46XX (o più in generale in quelle con più di un cromosoma X), uno dei due viene quasi completamente inattivato (l'ionizzazione). L'inattivazione non avviene subito dopo la fecondazione, ma quando il numero di cellule è già importante, e la scelta di quale cromosoma lasciare attivo è casuale. Questo comporta nel nascituro un mosaicism in cui alcuni gruppi di cellule esprimono un cromosoma X mentre altri gruppi l'altro cromosoma X. La riattivazione del cromosoma X inattivato avviene fisiologicamente solo nelle cellule della linea germinale, per poter effettuare le mitosi, ma è noto che possa avvenire per errore in alcune forme di tumore. Nello studio dell'albero genealogico si indica con  $X_a$  l'allele recessivo e con  $X_A$  l'allele dominante.

Come risultato, nelle femmine l'espressione di un carattere il cui allele è sul cromosoma X è variabile in base al tipo di mutazione e a quali gruppi di cellule esprimono l'allele mutato. Per esempio le portatrici sane dell'emofilia hanno comunque il Fattore VIII funzionante nel sangue: questo perché la casualità dell'inattivazione fa sì che esistano comunque cellule che esprimono il gene. Gli effetti della l'ionizzazione diventano però evidenti a livello locale, in singole cellule o in piccole popolazioni di cellule derivate da una progenitrice comune, che, anche se di fatto eterozigoti, possono esprimere alleli recessivi di geni presenti sul cromosoma X, quindi femmine eterozigoti per un allele che produce uno smalto dentale leggermente satinato possono trovarsi ad avere denti con una striscia di smalto normale e una di smalto satinato, se parte della gengiva sottostante esprime un gene e parte l'altro.

La pezzatura del pelo di alcune gatte è dovuta proprio a questo fenomeno, infatti è sul cromosoma X che si trova il gene che determina il colore del pelo, inattivando casualmente un cromosoma X di ogni cellula si ha un vero e proprio mosaico di cellule e dunque di colori del pelo.