

CROMOSOMI

Struttura molecolare

1944 → riconoscimento del **DNA** come depositario dell'informazione genetica e responsabile della sua trasmissione.

1953 → scoperta della **struttura a doppia elica** del DNA.

Materiale genetico

- **Funzione genotipica** → replicazione (conservazione e trasmissione dell'informazione)
- **Funzione fenotipica** → espressione genica (crescita e differenziamento dell'organismo)
- **Funzione evolutiva** → mutazioni (variabilità genetica ed adattabilità alle condizioni ambientali)

Natura molecolare dei geni?

Sede dei geni?

Mendel aveva intuito l'esistenza di **fattori ereditari** alla base dell'ereditarietà, ma non ne aveva identificato la natura e la sede di questi fattori.

Modalità di trasmissione dei geni ↔ comportamento dei cromosomi nel corso della riproduzione sessuale



Confermava l'ipotesi della localizzazione dei geni sui cromosomi.

Natura chimica dei geni???

Cromosomi sono costituiti da due tipi di macromolecole

- **Proteine**
- **Acidi nucleici (DNA, RNA)**



Dimostrazioni che l'informazione genetica risiede nel DNA

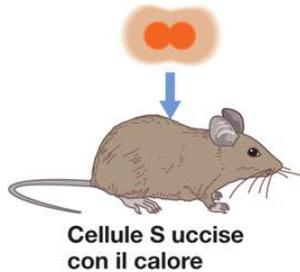
TRASFORMAZIONE

Esperimento di Griffith (1928) → Esistenza di un principio trasformante

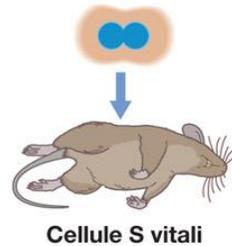
Pneumococco (*Streptococcus pneumoniae*)

- Cellule (S) con capsula (colonie lisce) → **patogene**
- Cellule (R) senza capsula (colonie rugose) → **non patogene**

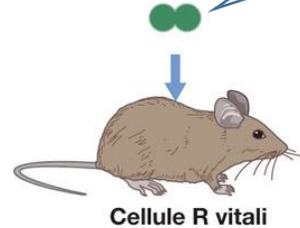
Cellule lisce di pneumococco capsulate (S), trattate al calore, non causavano la morte del topo



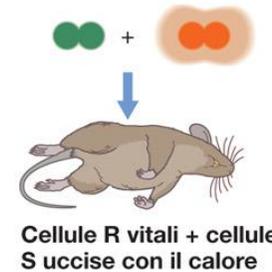
Cellule lisce di pneumococco capsulate (S), non trattate al calore, causavano la morte del topo



Cellule rugose di pneumococco, non capsulate (R), non causavano la morte del topo



Cellule rugose di pneumococco, non capsulate (R), in seguito al contatto con frammenti di DNA di cellule lisce (S) trattate al calore, causavano la morte del topo

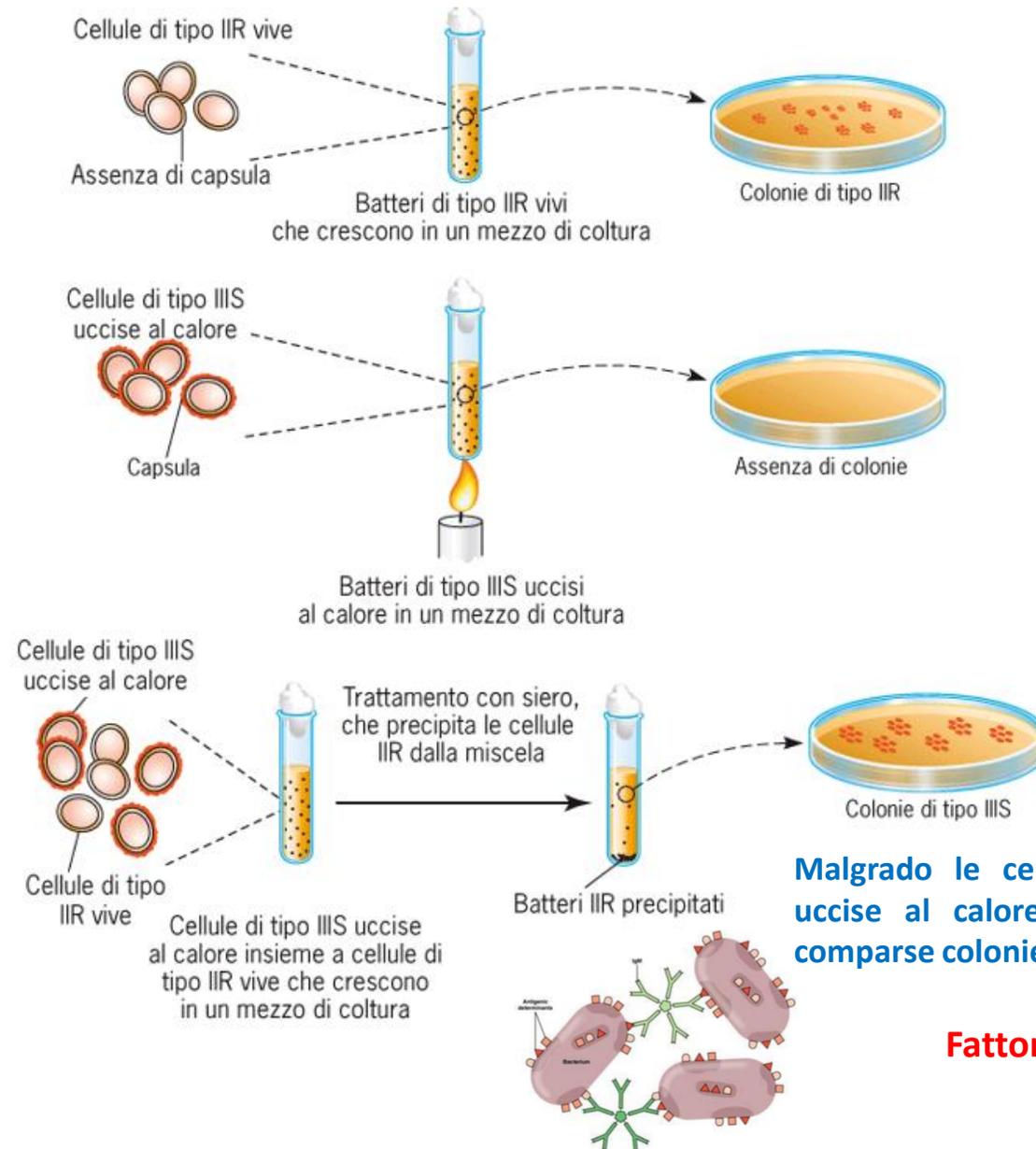


Dal topo morto venivano isolate cellule vitali di pneumococco capsulate

Esperimento di Sia e Dawson (1931) → estensione dell'esperimento di Griffith
Streptococcus pneumoniae

Esperimento condotto senza l'impiego di un modello animale (topo).

L'esperimento escludeva un ruolo del topo nel processo di **trasformazione**



Malgrado le cellule S fossero state uccise al calore, sulla piastra sono comparse colonie lisce.

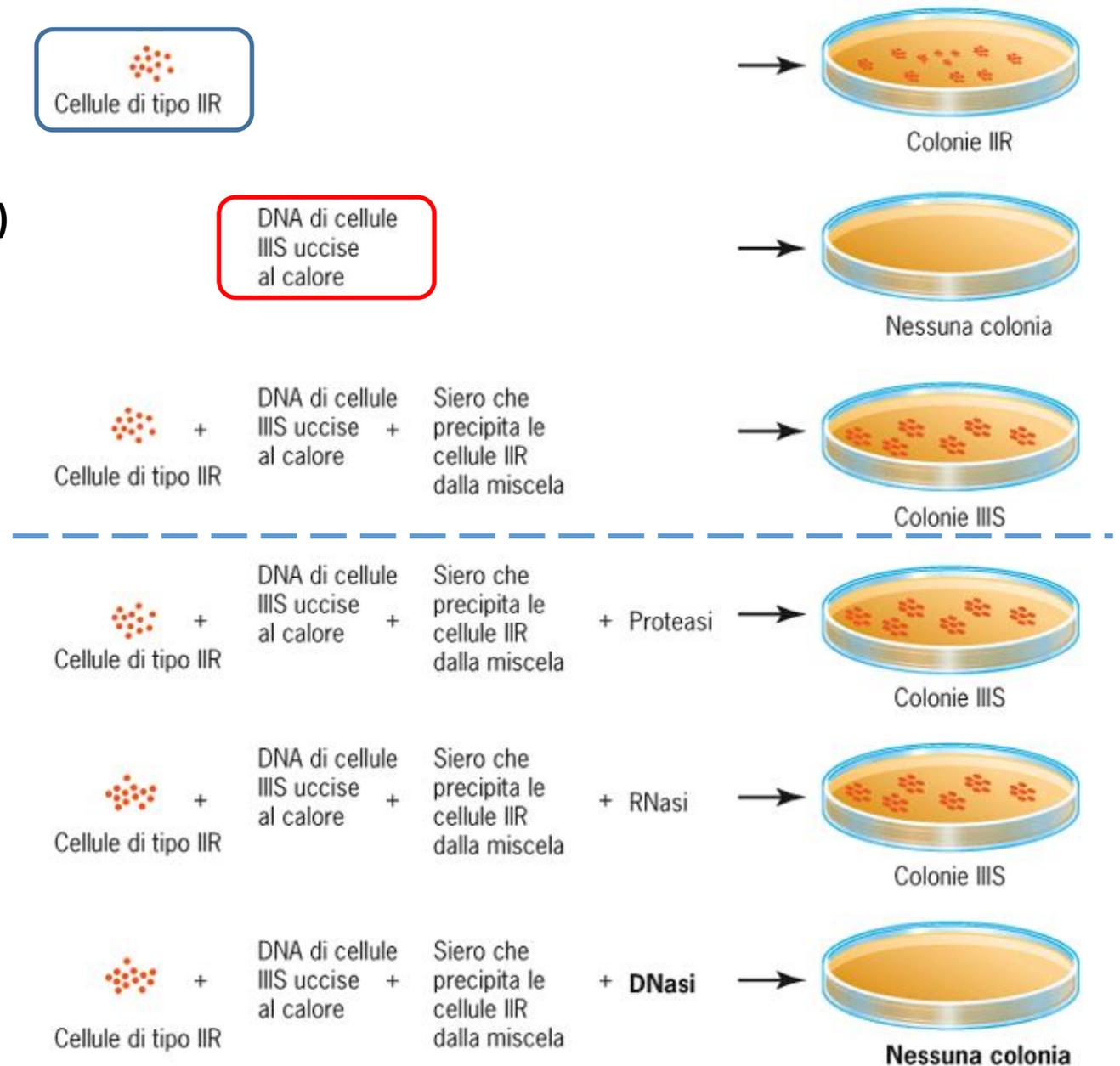
Fattore trasformante? →

Veramente la trasformazione era dovuta al DNA?
E se fossero tracce di proteine, magari associate al DNA, il vero principio trasformante?

Esperimento di Avery, MacLeod e McCarty (1943)

Basato sull'impiego di alcuni enzimi:

- DNasi
- RNasi
- proteasi



L'esperimento dimostrava che l'informazione genetica in *S. pneumoniae* risiedeva nel DNA

DNA → il solo principio trasformante!

Ulteriore prova che il materiale genetico è costituito dal DNA

Le proteine contengono S
Gli acidi nucleici contengono P

Esperimento di Hershey e Chase

Informazione genetica del fago T2 → DNA

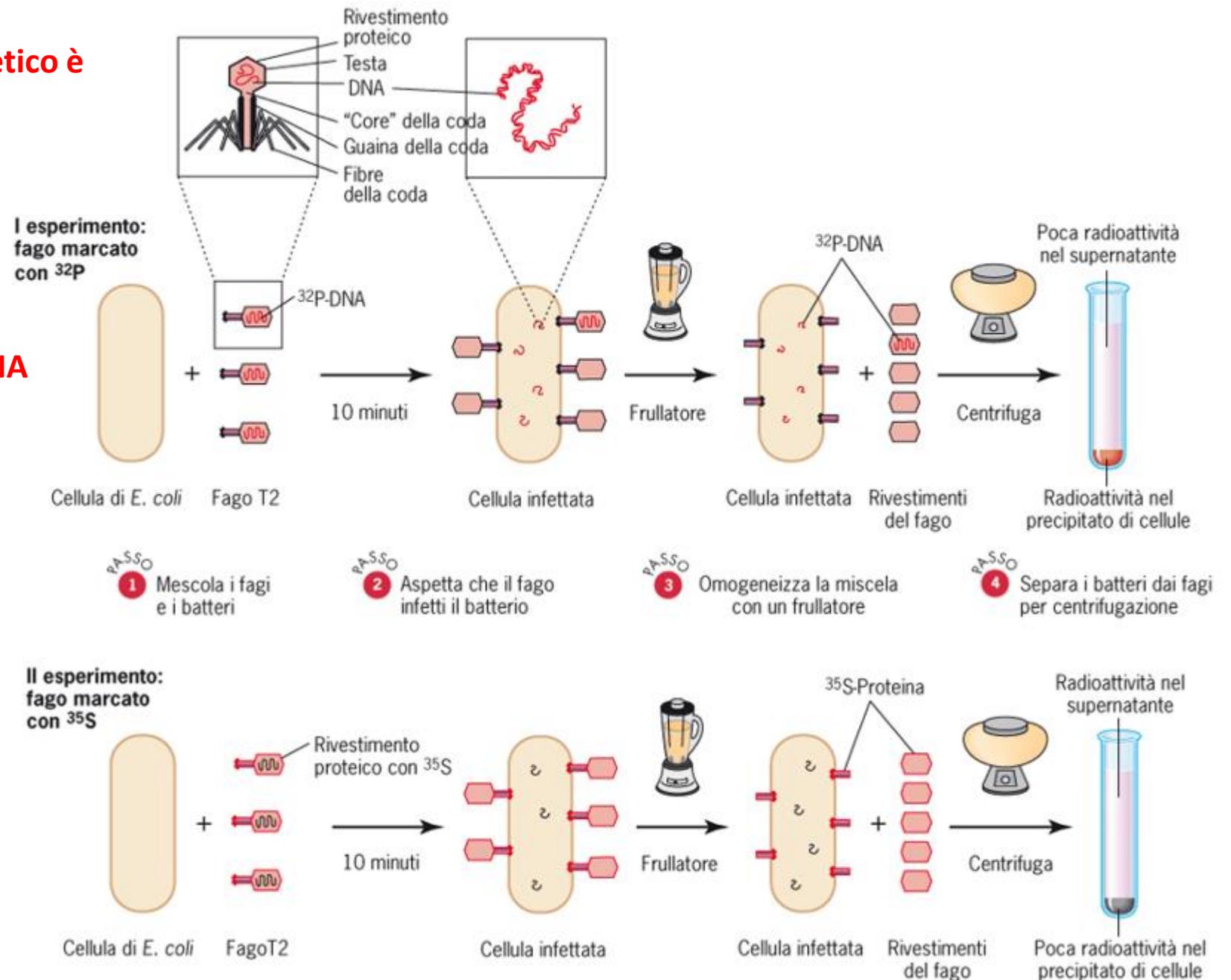
Al posto di ^{31}P e ^{32}S , per la preparazione dei fagi marcati vennero utilizzati i loro isotopi radioattivi (^{32}P e ^{35}S).

Isotopo

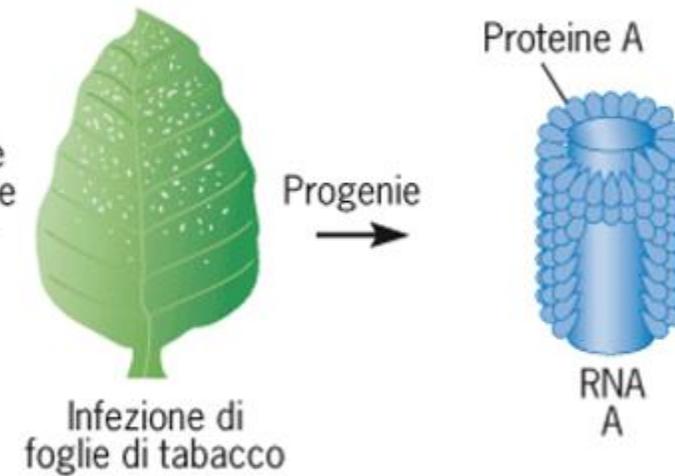
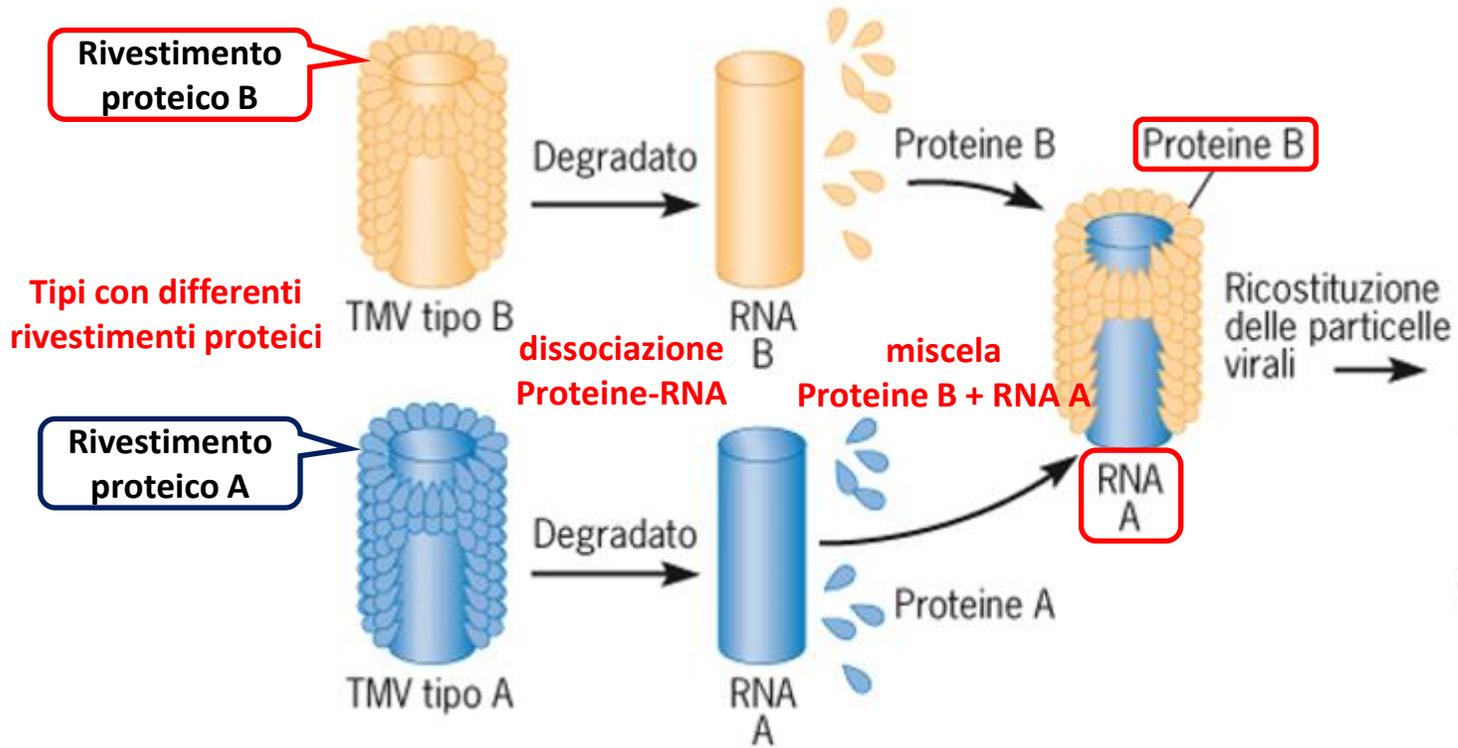
Atomo avente numero di massa diverso rispetto ad un altro atomo dello stesso elemento; due isotopi hanno quindi lo stesso numero di protoni (numero atomico) ma diverso numero di neutroni.

Conclusione

È il DNA che entra nelle cellule batteriche per dirigere la sintesi delle molecole di DNA virale e delle proteine di rivestimento.



Esperimento di ricostituzione di Fraenkel-Conrat et al. (1957)
Informazione genetica del virus del mosaico del tabacco → **ssRNA**



La progenie virale era genotipicamente e fenotipicamente identica al ceppo parentale del quale era stato conservato l'RNA.

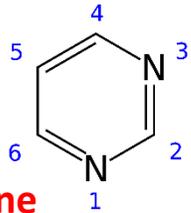


RNA depositario dell'informazione genetica

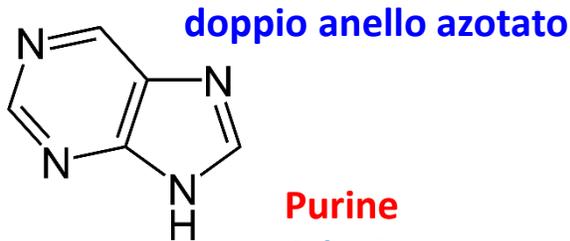
STRUTTURA DNA ED RNA

Macromolecole costituite da subunità ripetute

↓
nucleotidi



Pyrimidine
Citosina
Timina
Uracile



Purine
Adenina
Guanina

Gli acidi nucleici sono composti da subunità che si ripetono dette nucleotidi.
Ogni nucleotide è composto da tre unità.

(1) Un gruppo fosfato:			
(2) Uno zucchero a 5 atomi di carbonio o pentoso:	(a) Nell'RNA: Ribosio 	(b) Nel DNA: 2-Desossiribosio 	Manca il gruppo ossidrilico
(3) Una base ciclica contenente azoto:	(a) Solo nell'RNA (con poche eccezioni): 	(b) Sia nell'RNA che nel DNA: 	(c) Solo nel DNA (con poche eccezioni):
	<p>Adenina Guanina Purine</p>		

Chargaff e coll.

Nel DNA
[A]=[T]
[C]=[G]

[pirimidine]=[purine]

Subunità costituenti il DNA (nucleotidi)

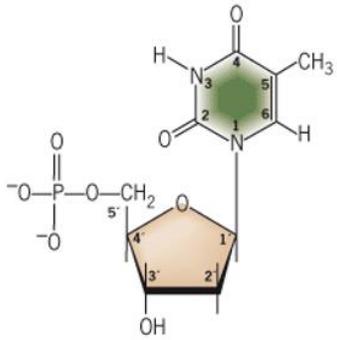
dTMP

dCMP

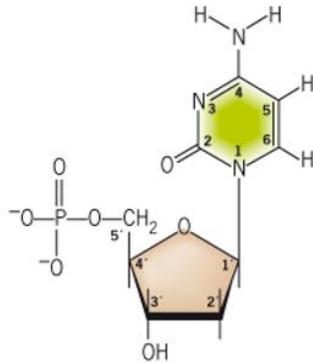
dAMP

dGMP

Nucleotidi pirimidinici

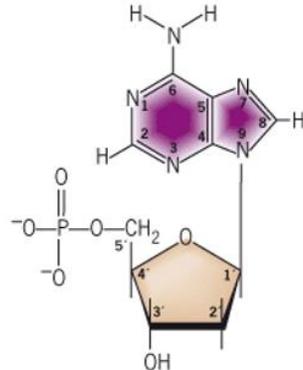


Desossitimidina monofosfato, dTMP

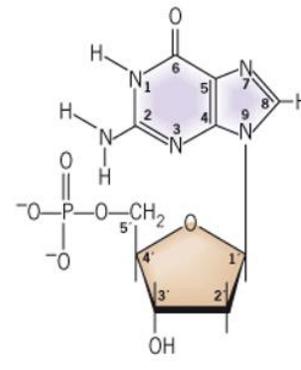


Desossicitidina monofosfato, dCMP

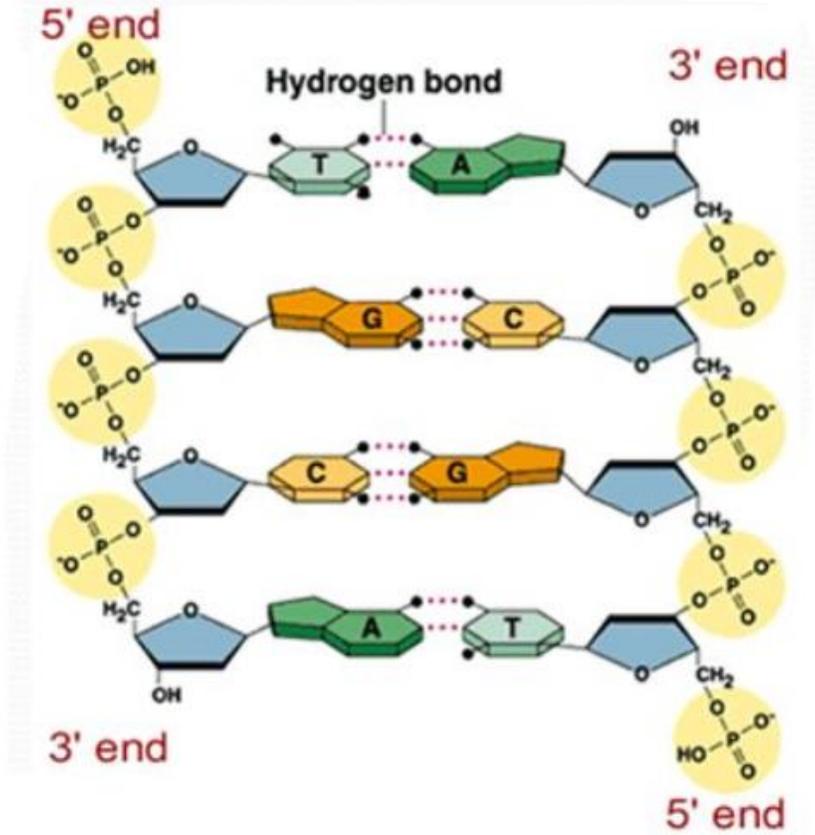
Nucleotidi purinici



Desossiadenosina monofosfato, dAMP



Desossiguanosina monofosfato, dGMP



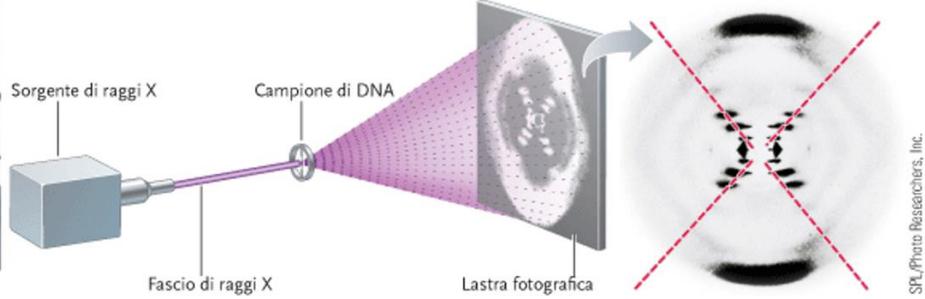
Catena polinucleotidica
Polarità 5'-3'

a. Rosalind Franklin



Figura 4-5

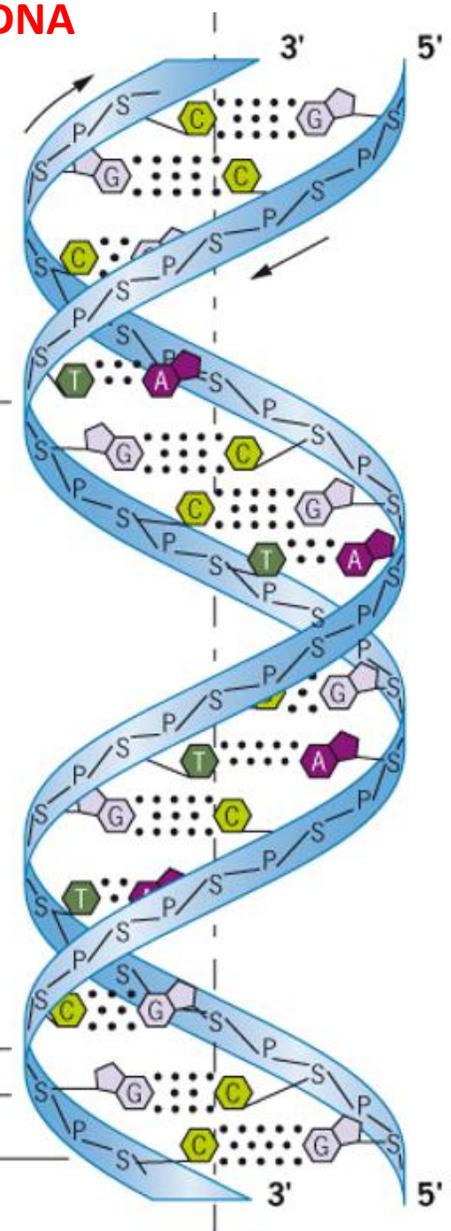
b. Analisi del DNA mediante diffrazione dei raggi X



SPN/Photo Researchers, Inc.

STRUTTURA TRIDIMENSIONALE DEL DNA Modello a doppia elica

Pattern di diffrazione ai raggi X



Watson e Crick (1953)



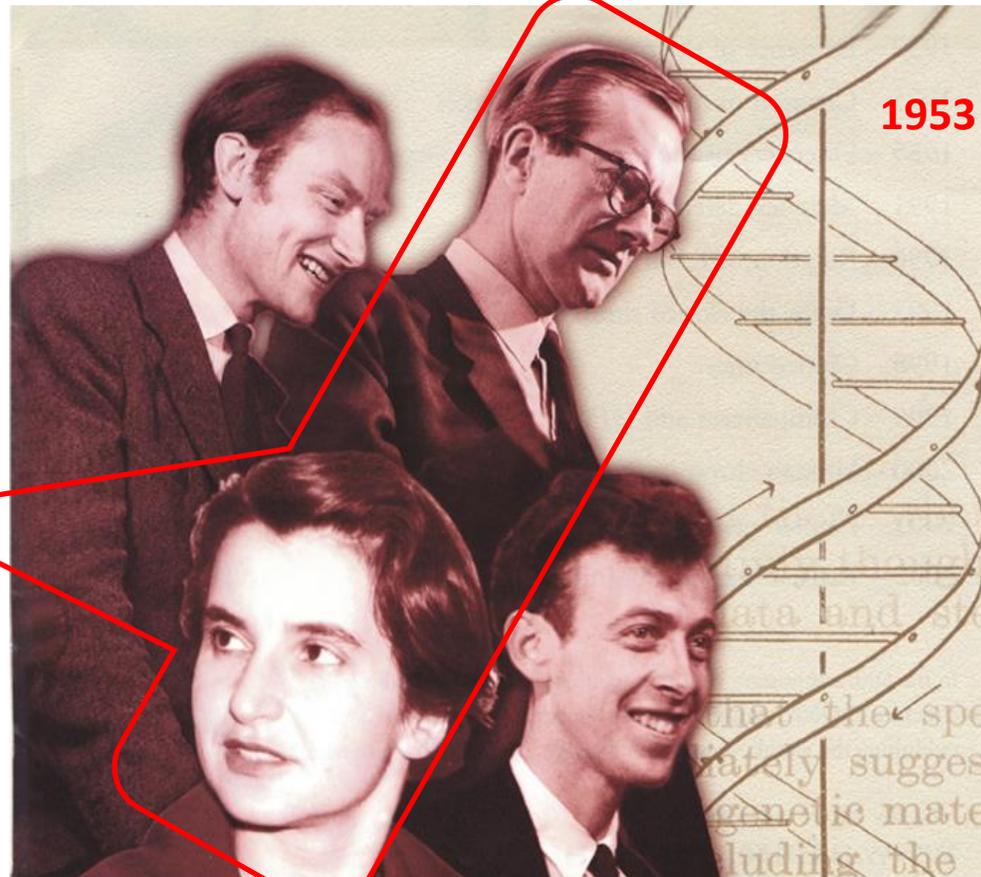
DNA a doppia elica destrorsa

1953

Wilkins e Franklin

Diffrazione ai raggi X su molecole di DNA:

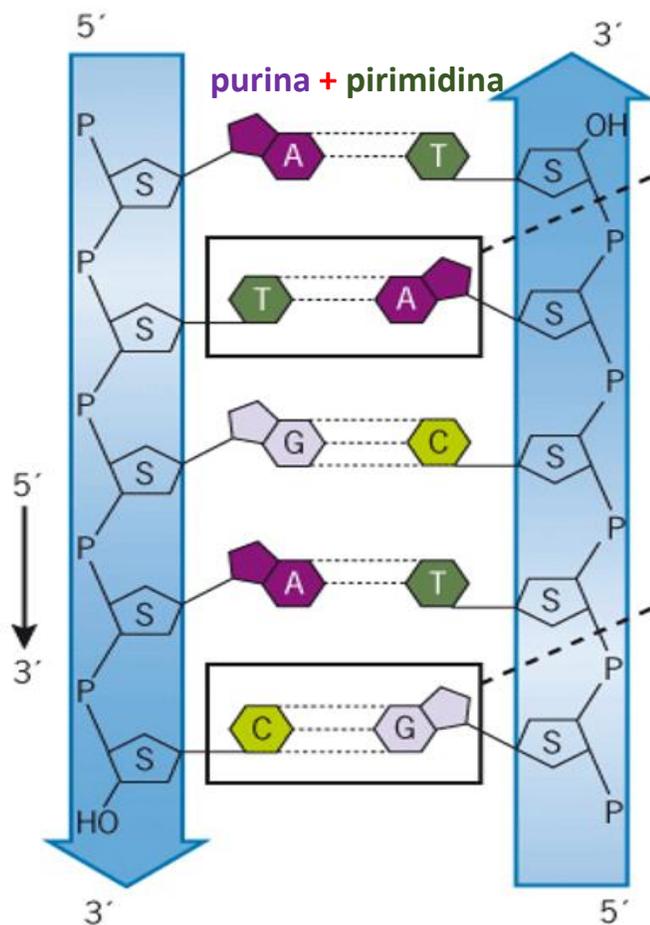
Il DNA si presentava sotto forma di **due filamenti**, con una struttura altamente ordinata e con **substrutture** che si ripetevano ogni **0,34 nm**.



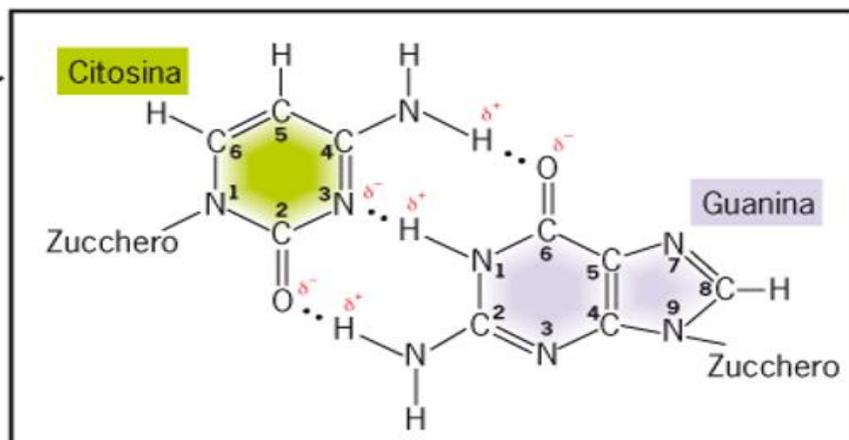
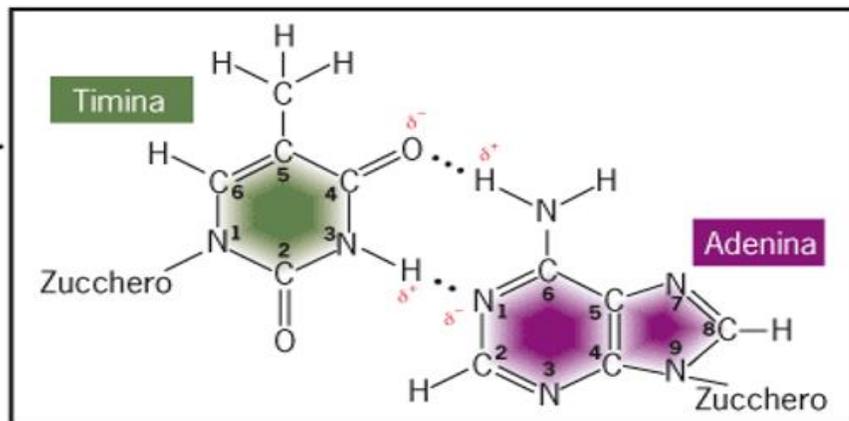
Ogni giro = ~10 coppie i basi

Coppie di basi costituite da una purina ed una pirimidina

Polarità opposta dei due filamenti



Legami idrogeno nelle coppie di basi A-T e G-C



Filamenti complementari ed antiparalleli

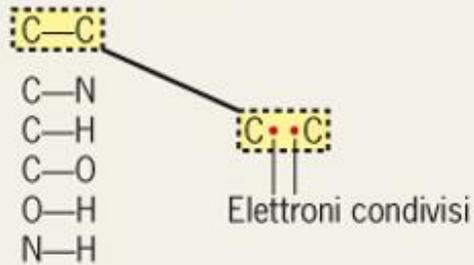
La complementarietà dei filamenti rende il DNA una macromolecola adatta a conservare e trasmettere l'informazione genetica di generazione in generazione.

Legami chimici importanti nella struttura del DNA

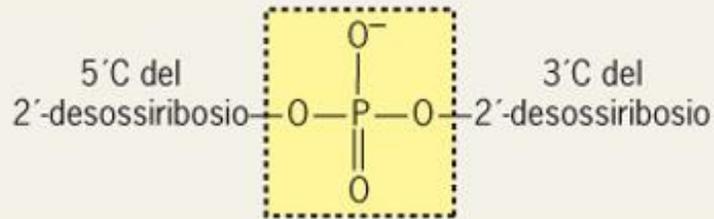
(a) Legami covalenti

Forti legami chimici formati per condivisione di elettroni tra gli atomi.

(1) Nelle basi e negli zuccheri



(2) Nei legami fosfodiesterici



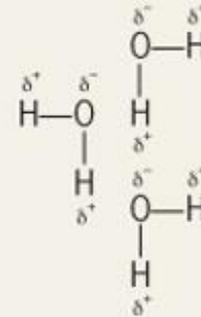
(b) Legami idrogeno

Un legame debole tra un atomo elettronegativo e un atomo di idrogeno (elettropositivo) che è covalentemente legato a un secondo atomo elettronegativo.



(c) "Legami" idrofobici

L'associazione di gruppi non polari presenti in soluzioni acquose dovuta alla loro insolubilità in H₂O.

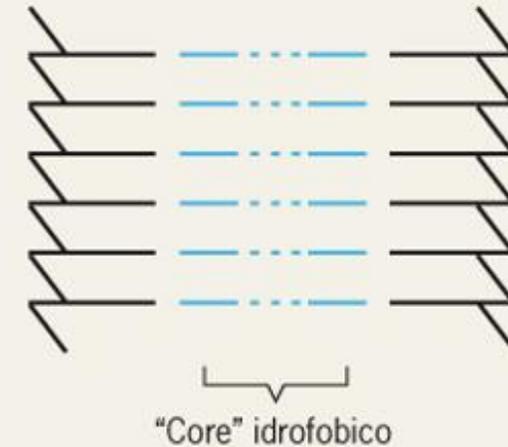


Le molecole di acqua sono molto polari (δ^- O e δ^+ H).

I composti polari sono molto solubili in acqua ("idrofili").

I composti apolari (senza gruppi carichi) sono insolubili in acqua ("idrofobici").

Le coppie di basi impilate formano un "core" idrofobico.

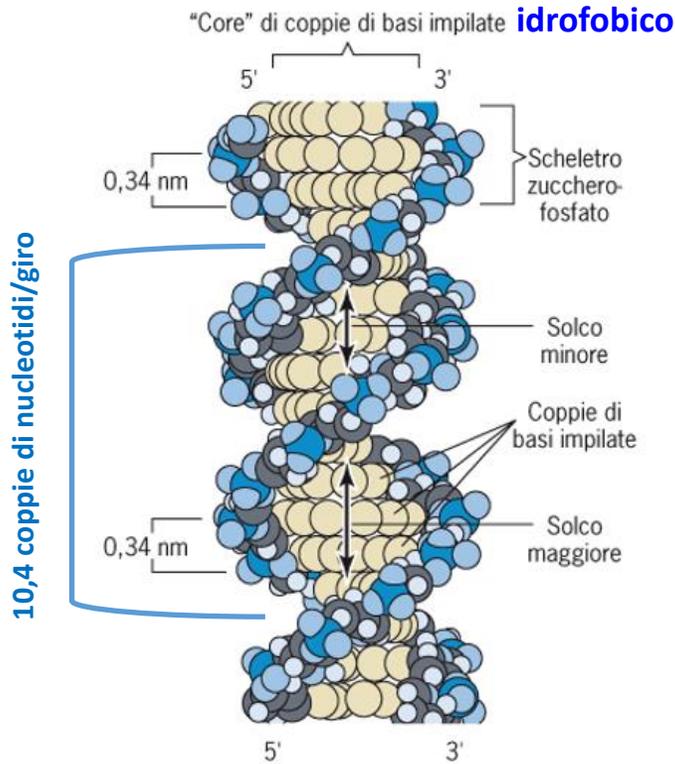


Struttura e conformazioni del DNA

Conformational flexibility of DNA

Forme alternative del DNA			
Forma dell'elica	Direzione dell'elica	Coppie di basi per giro	Diametro dell'elica
A	Destrorsa	11	2,3 nm
B	Destrorsa	10	1,9 nm
Z	Sinistrorsa	12	1,8 nm

Le coppie di basi distano tra loro **0,34 nm**
10,4 coppie di nucleotidi/giro



10,4 coppie di nucleotidi/giro

Legenda:

- = Idrogeno ● = Ossigeno ● = Carbonio
- = Carbonio e azoto nelle coppie di basi ● = Fosforo

Filamenti antiparalleli

- **B-DNA**
 - Watson and Crick model
 - Shape when plenty of water is present
 - Right hand/clockwise turn; approx 10 bases per turn
- **A-DNA**
 - Form when less water is present; no proof of existence under physiological conditions
 - Shorter and wider than B form
 - Right hand/clockwise turn; approx 11 bases per turn
- **Z-DNA**
 - Left hand/counterclockwise turn
 - Approx 12 bases per turn
 - Found in portions with specific base pair sequences (alternating G and C)
 - Possible role in transcription regulation?

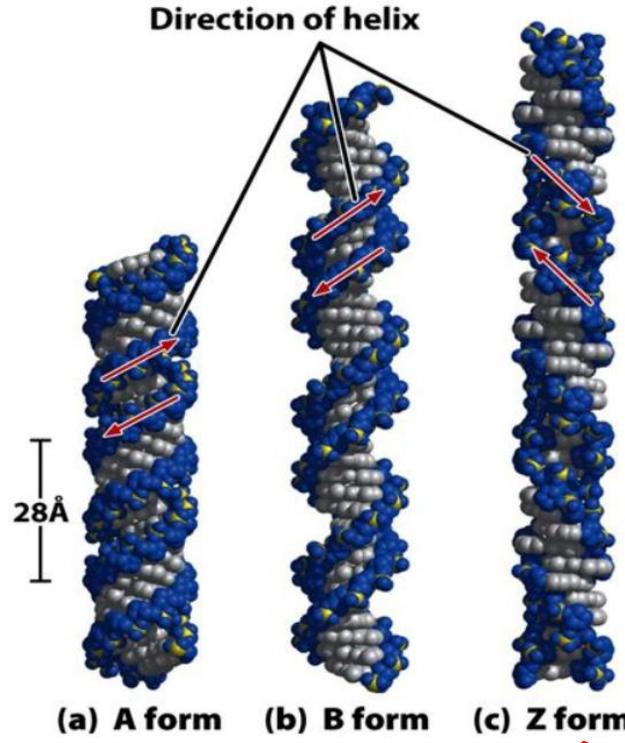


Figure 10-15
 Genetics: A Conceptual Approach, Third Edition
 © 2009 W. H. Freeman and Company

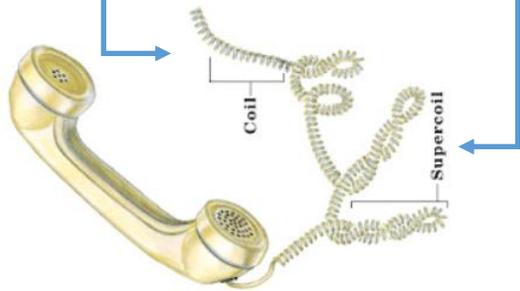
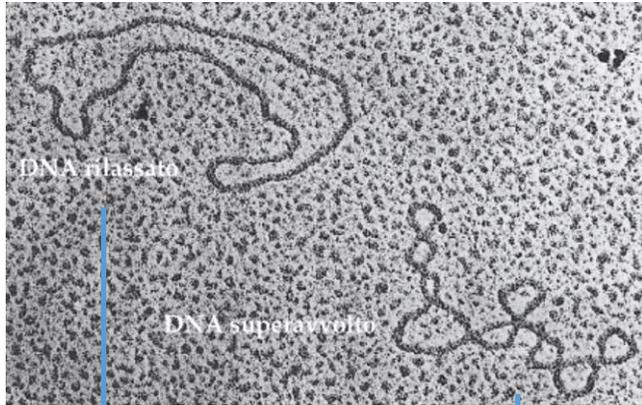
Conformazione in soluzione ad elevata concentrazione salina o in condizioni di disidratazione (11 coppie di basi/giro)

Conformazione a doppia elica sinistrorsa (12 coppie di basi/giro)

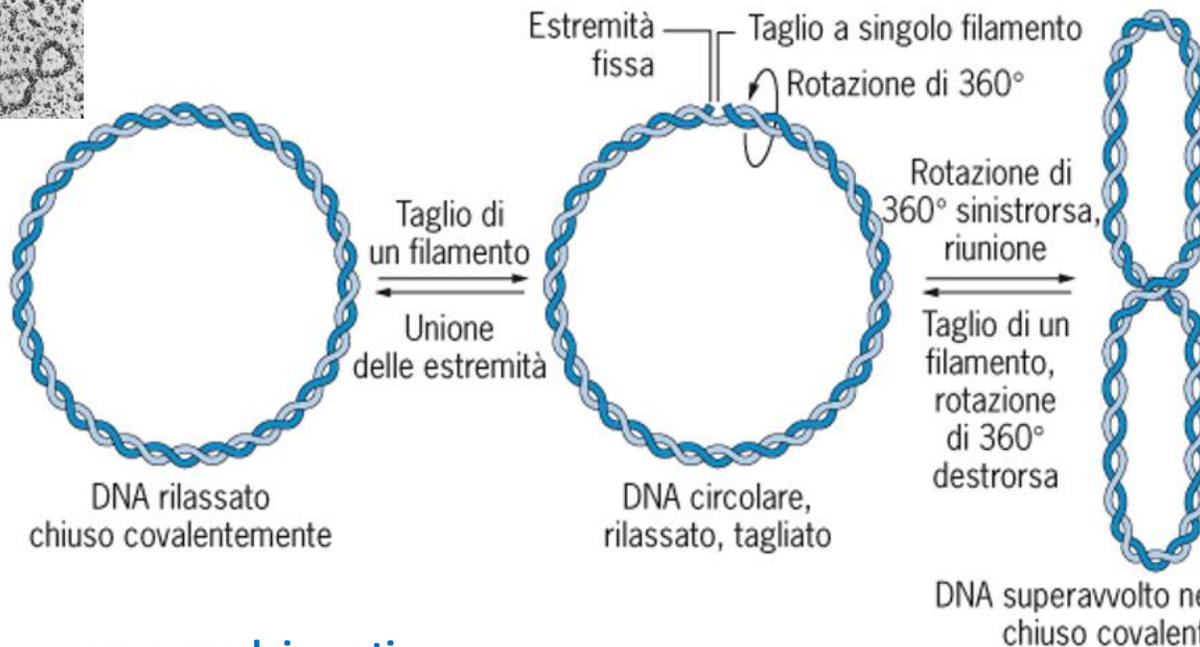
Conformazione in soluzione acquosa a bassa concentrazione salina (condizioni fisiologiche). (10,4 coppie di basi/giro)

Ulteriore livello di organizzazione

Il DNA si può presentare in forma rilassata o superavvolta (struttura con superavvolgimenti negativi).

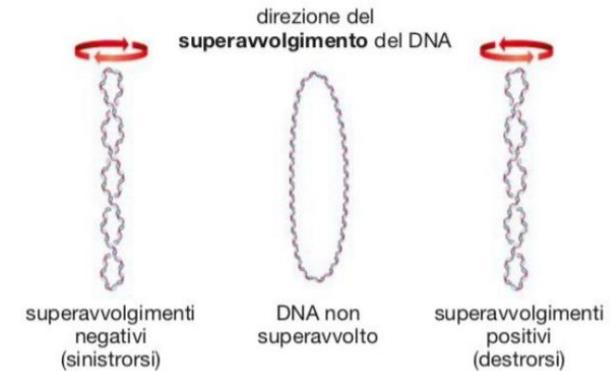
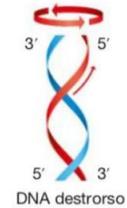


Il superavvolgimento può avvenire solo in molecole di DNA ad estremità fisse.



I superavvolgimenti negativi inducono il DNA a ripiegarsi attorno al suo asse in direzione sinistrorsa (antioraria) e causano despiralizzazioni che favoriscono l'apertura della doppia elica.

Nei superavvolgimenti positivi il DNA ruota intorno al suo asse in senso destrorso (lo stesso dell'elica) inducendo superspiralizzazioni che rendono difficile l'apertura della doppia elica.



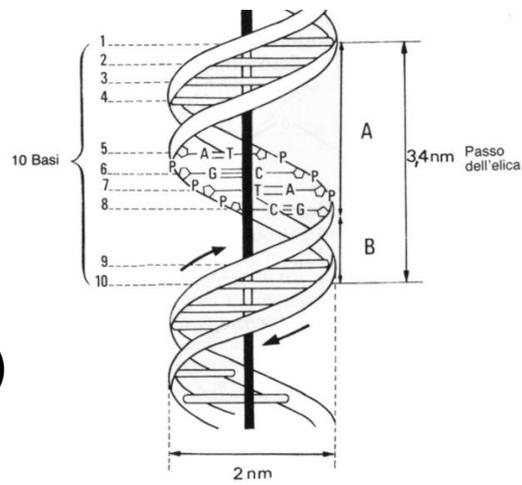
Enzimi specifici introducono superavvolgimenti anche in cromosomi eucariotici (lineari), bloccati da legami con componenti non nucleici dei cromosomi.

Ad esclusione di alcuni virus che infettano gli *Archaea*, gli altri organismi viventi possiedono (in vivo) molecole di DNA con superavvolgimenti negativi.

Struttura cromosomi procariotici

Batteri

- Organismi meno complessi
- Monoplodi (una sola copia del genoma)

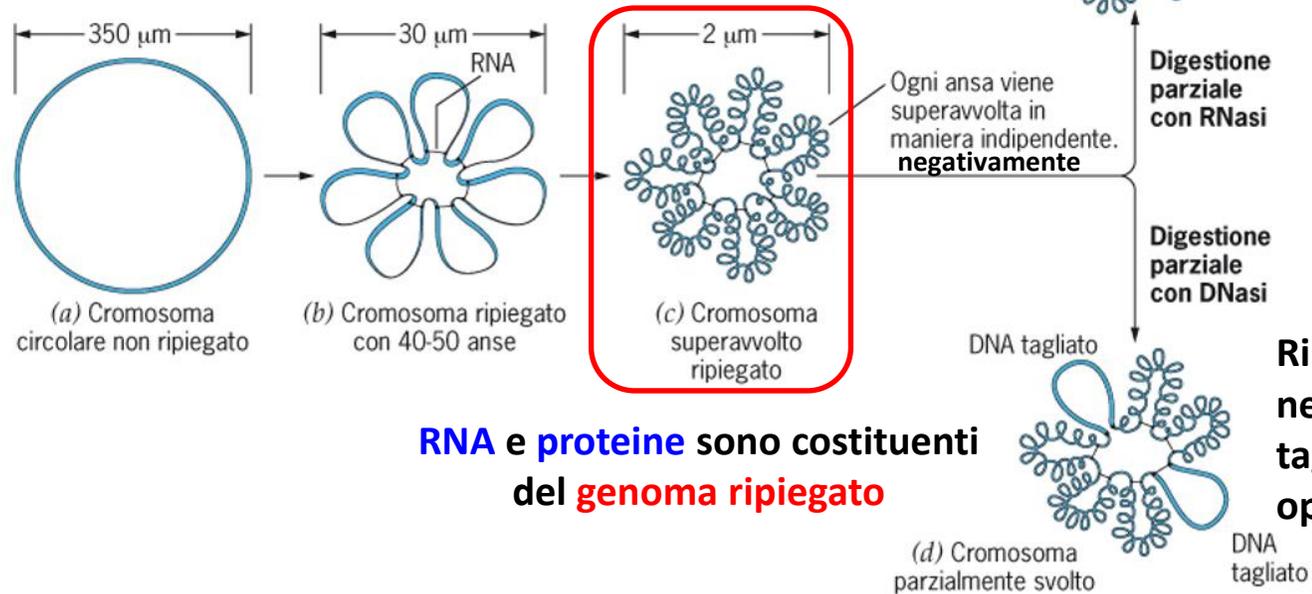


E. coli (1-2 μm)

cromosoma lungo 1500 μm \rightarrow 2500-3500 geni



DNA in configurazione altamente condensata



RNA e proteine sono costituenti del **genoma ripiegato**

Rimozione anse in seguito a rottura dei filamenti di **RNA di connessione**

Rimozione superavvolgimenti nell'ansa che ha subito il taglio di uno dei filamenti ad opera della DNasi

Questionario corso

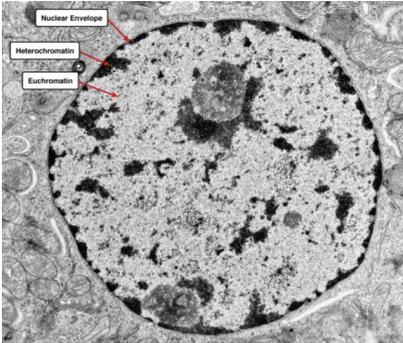
L'ANVUR consiglia di prevedere almeno un momento del corso dedicato alla compilazione. Il questionario è accessibile tramite il sito esse3.

Sensibilizzare gli studenti sull'importanza di una compilazione attenta del questionario e prevedere nell'ambito del corso almeno una finestra nella quale, interrompendo le lezioni, chiedere agli studenti di compilare il questionario.

Struttura cromosomi eucariotici

Uomo → 2000 mm di DNA/cellula

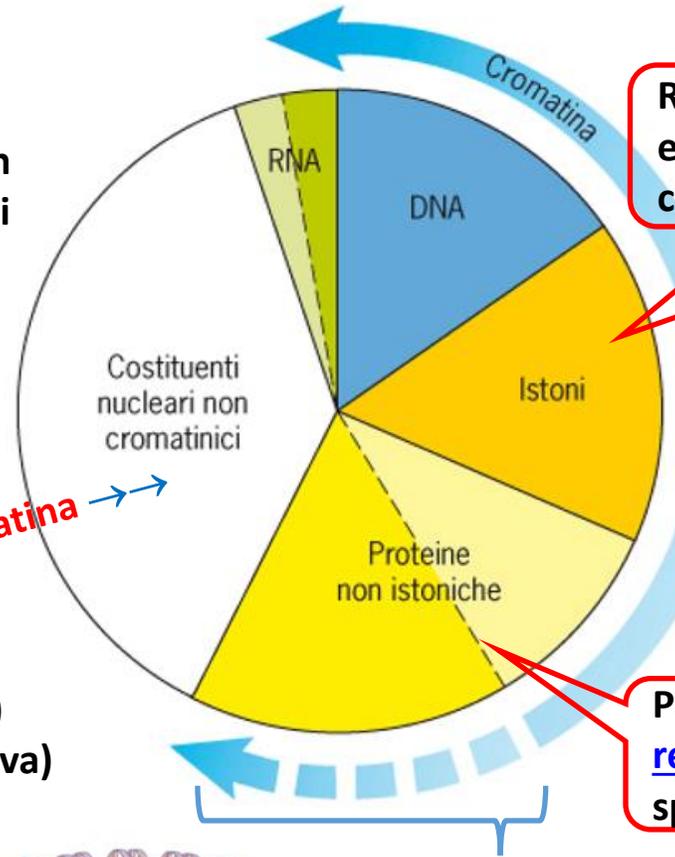
Durante l'interfase il DNA non si presenta organizzato in strutture discrete (cromosomi), ma sotto forma di aggregati irregolari di **nucleoproteine** (DNA, proteine ed RNA).



CROMATINA

- **Euromatina** (con intensa attività di trascrizione)
- **Eterocromatina** (non sembra avere attività di trascrizione) ↓
costitutiva o facoltativa

Costituenti della cromatina →



Ruolo strutturale (impacchettamento) e regolatorio fondamentale della cromatina.

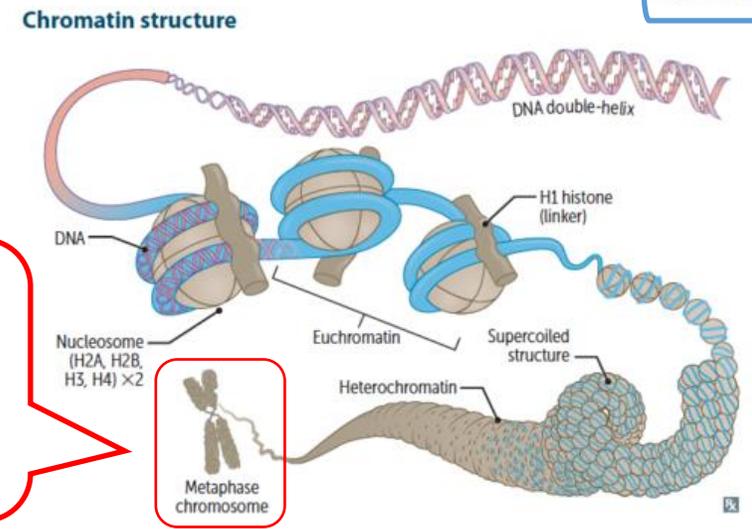
H1, H2A, H2B, H3, H4
(esistono varianti istoniche)

Spermatozoi
Gli istoni sono sostituiti da piccole proteine basiche, (**protamine**).

Potrebbero avere un ruolo nella regolazione dell'espressione di specifici geni.

Proteine istoniche → proteine basiche (carica positiva)
Proteine non istoniche → proteine acide (carica negativa)

Quantità variabili in funzione dei metodi di isolamento delle proteine.

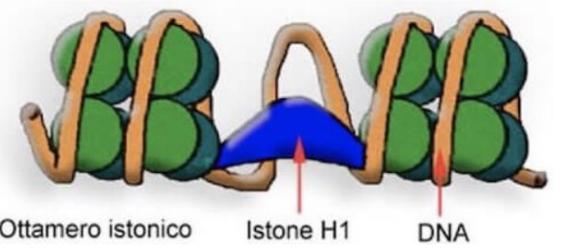
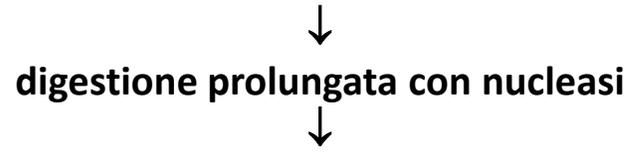
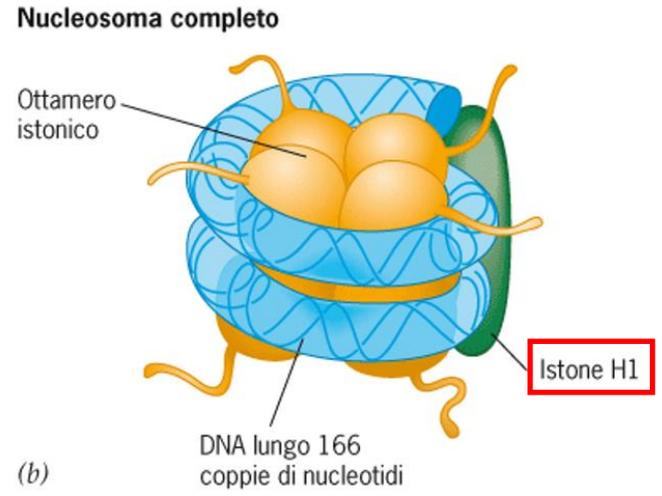
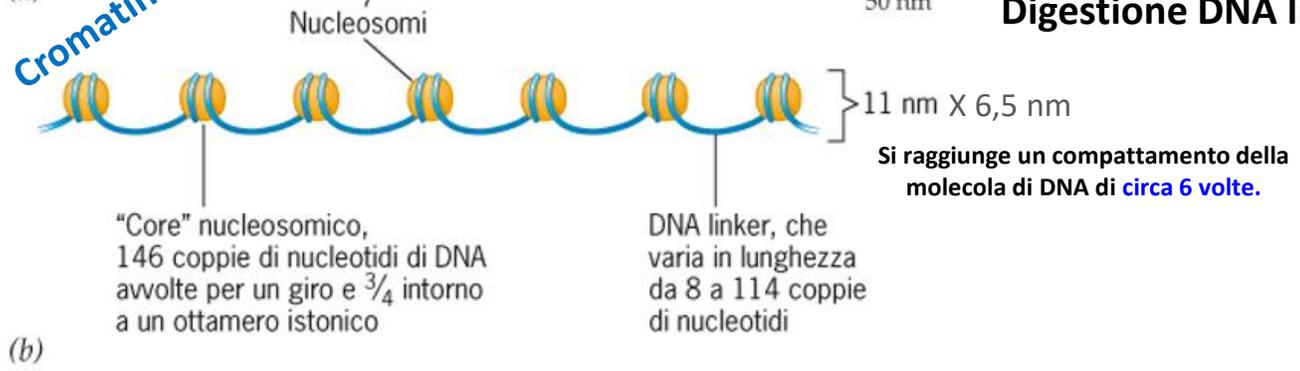
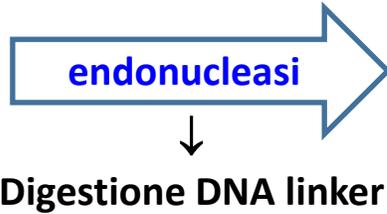
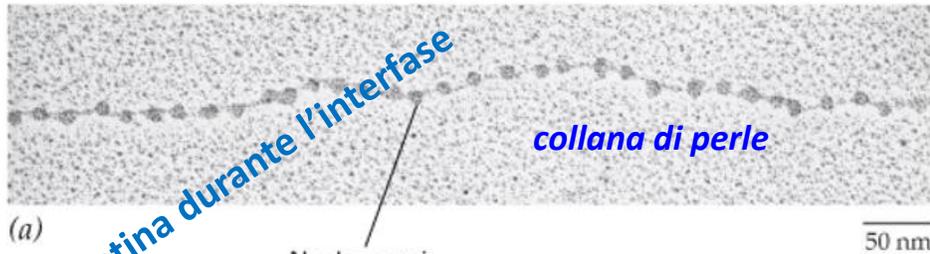


Durante la metafase, il **cromosoma eucariotico (1-10 μm)** è costituito da un'unica **molecola di DNA (1-20 cm)** in forma altamente condensata.

Impacchettamento della molecola di DNA

Cromosoma umano più grande (1) → costituito da 85 mm di DNA

Condensazione di circa 10^4 volte (10000)

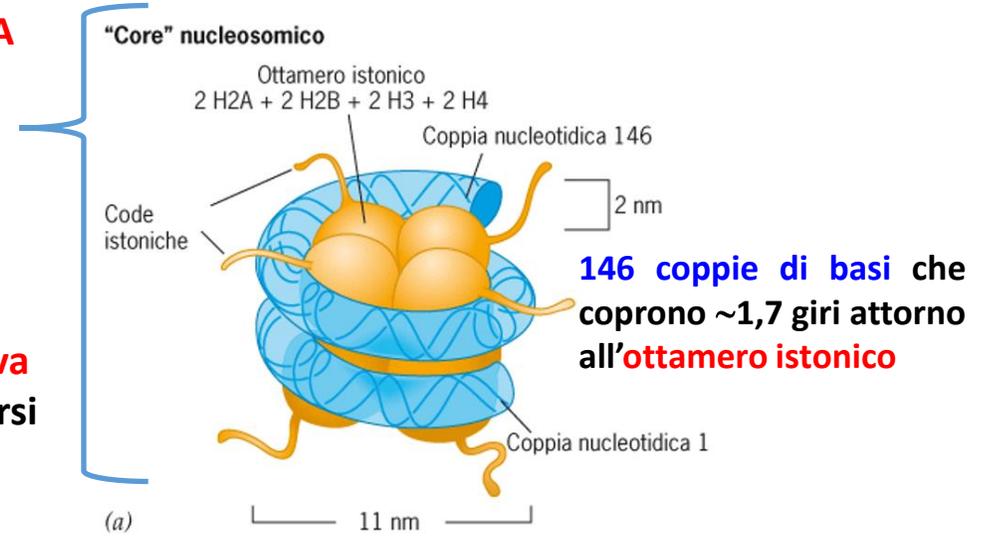


La subunità completa di **CROMATINA** risulta, quindi, costituita da

- core nucleosomico,
- DNA linker
- H1
- proteine cromosomiche non istoniche

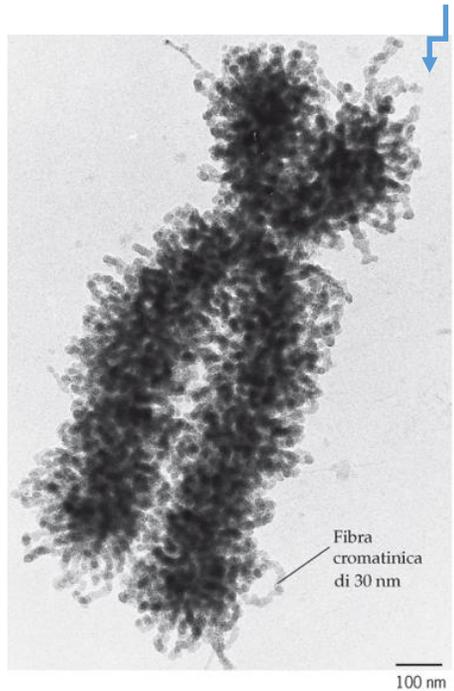
cromatina trascrizionalmente inattiva ↔ **cromatina trascrizionalmente attiva**

Le code flessibili degli istoni interagiscono con i nucleosomi adiacenti e diversi **fattori nucleari** (enzimi che possono modificare chimicamente il DNA: metilazione, acetilazione)



La **fibra nucleosomica** (11 nm) va incontro ad un ulteriore compattamento.

Osservato al microscopio elettronico, un **cromosoma metafasico** presenta 2 cromatidi, ognuno formato da un'unica **fibra cromatinica** (\varnothing 30 nm) altamente condensata.



fibra nucleosomica (11 nm)

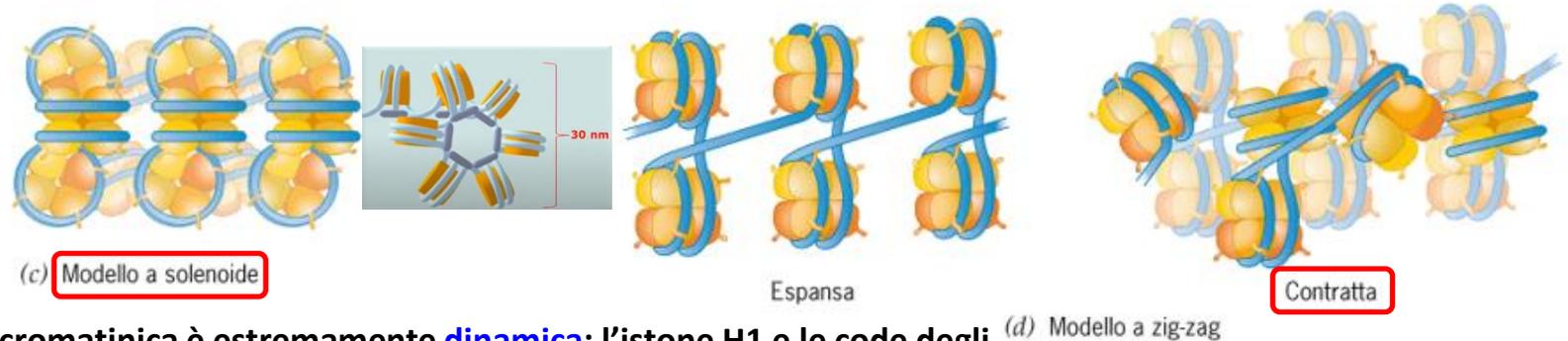
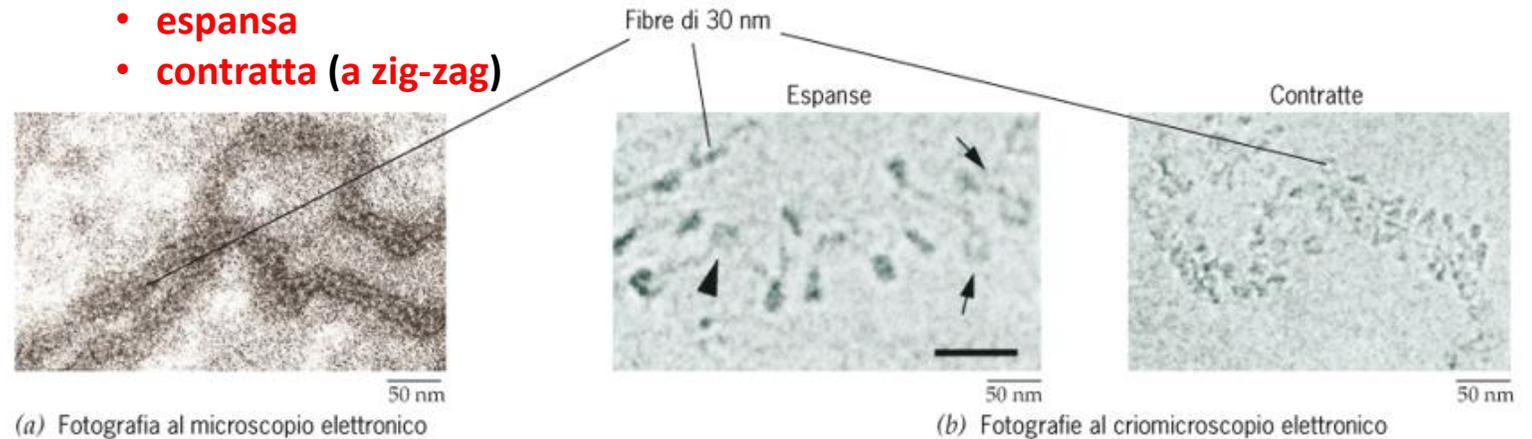


La **fibra di cromatina** (\varnothing 30 nm) rappresenta l'unità strutturale di base del cromosoma metafasico.

Strutture fibra cromatinica

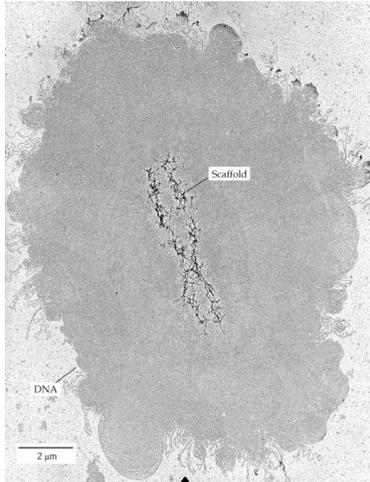
A seconda della procedura di preparazione del campione, durante l'**interfase**, le fibre cromatiniche (30 nm), costituite da fibre nucleosomiche (11 nm), possono assumere strutture diverse:

- **a solenoide**
- **espansa**
- **contratta (a zig-zag)**

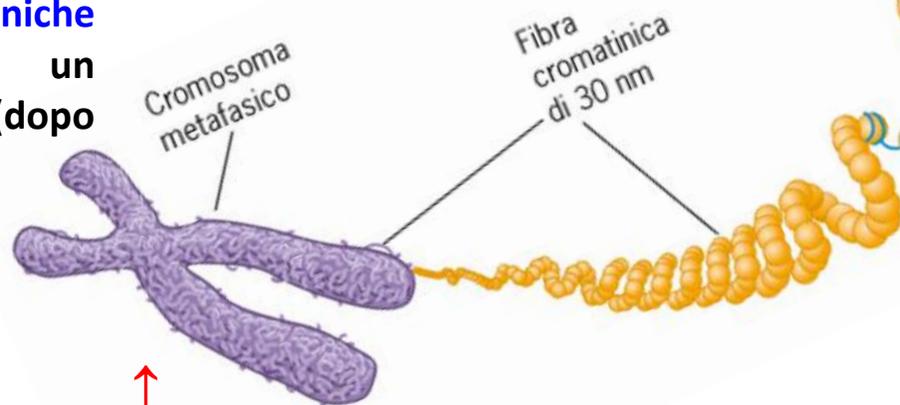


La fibra cromatinica è estremamente **dinamica**: l'istone H1 e le code degli altri istoni influenzano i processi di **espansione/contrazione della cromatina**.

Gli **istoni** non partecipano alla definizione della struttura grossolana dei cromosomi.



Scaffold di **proteine non istoniche** circondato da DNA in un cromosoma metafase (dopo rimozione degli istoni).



Formazione di uno **scaffold** di **proteine cromosomiche non istoniche** e condensazione della fibra cromatinica da 30 nm, fino a formare il **cromosoma metafase** con le caratteristiche anse superavvolte.

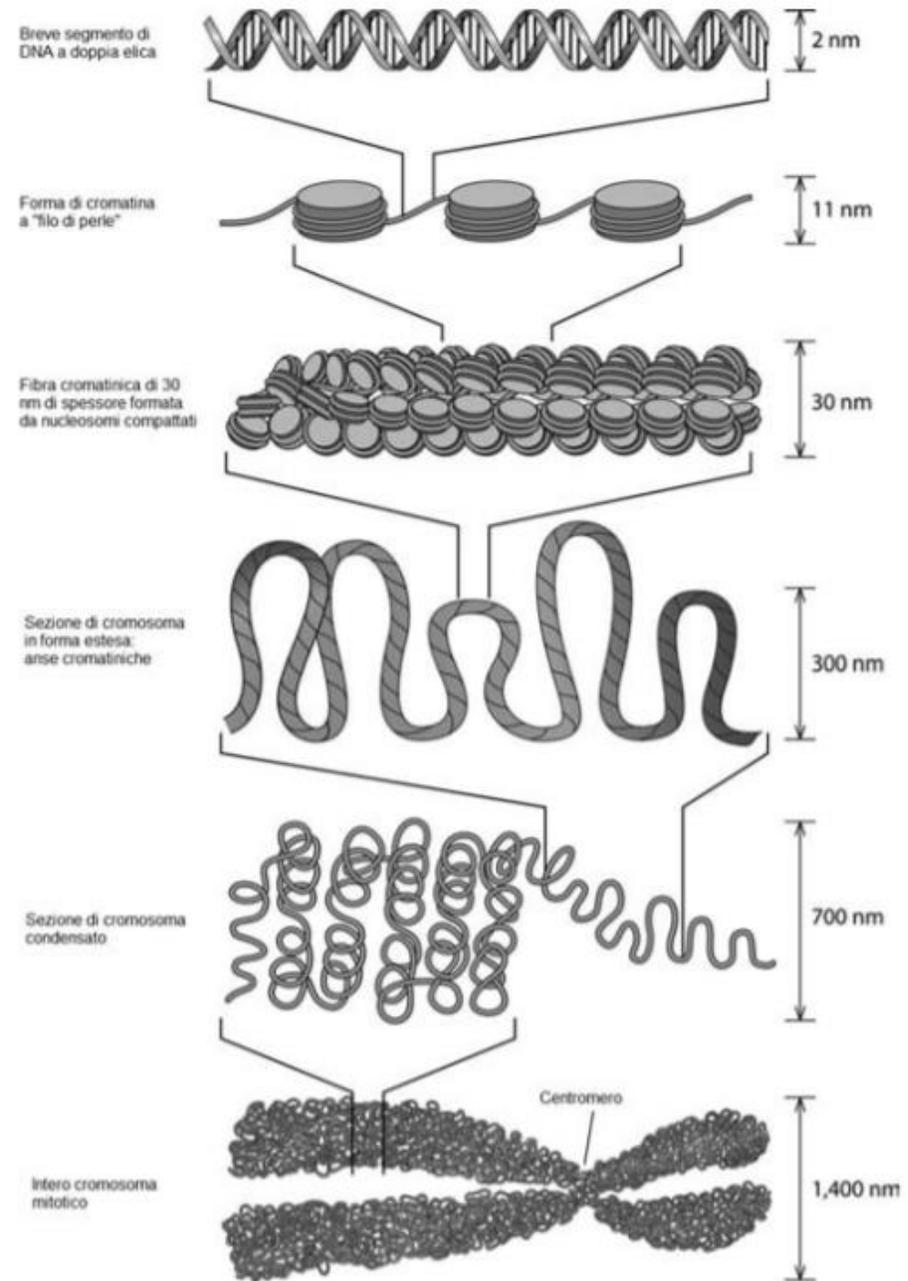
LIVELLI DI CONDENSAZIONE DEL DNA

3 principali livelli di condensazione

Superavvolgimento della molecola di DNA (2 nm) che, assieme ad H2A, H2B, H3 ed H4, formano la **fibra nucleosomica** (**fibra cromatinica interfase** da 11 nm \emptyset).

← Superavvolgimento della fibra nucleosomica (11 nm) a formare, assieme ad H1, la **fibra cromatinica** da 30 nm \emptyset .

Livelli di organizzazione del DNA



CENTROMERO

Durante l'**anafase**, il centromero consente il legame dei cromosomi ai **microtubuli** per una corretta distribuzione tra le cellule figlie.

In seguito ad eventi meiotici o mitotici i cromosomi acentrici vengono persi!

I centromeri contengono **sequenze di DNA altamente ripetute** (fino a migliaia copie), spesso in tandem.

I **centromeri umani** possiedono una sequenza di 171 coppie di basi ripetute 5000-15000 volte (**sequenze satelliti alfa**).

Il **cromosoma X** umano, all'interno del DNA satellite, possiede siti di legame per la proteina centromerica (**CENP-B box**).

DNA satellite alfa nei centromeri umani: sequenza ripetuta di 171 pb

5 µm

Submetacentrico

Metacentrico

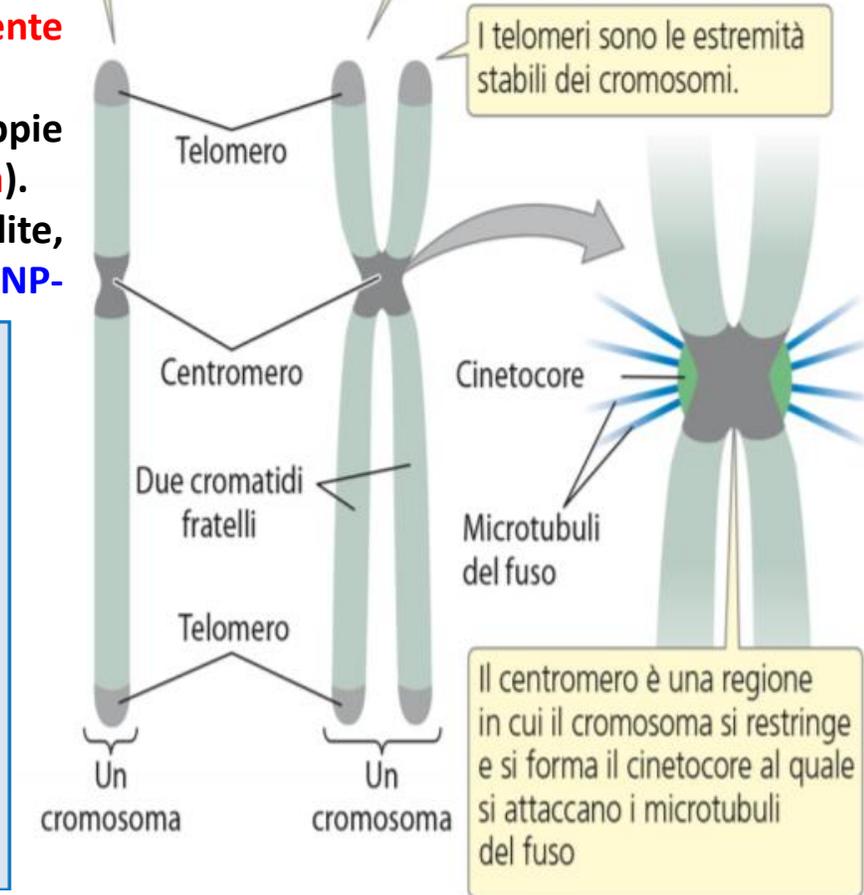
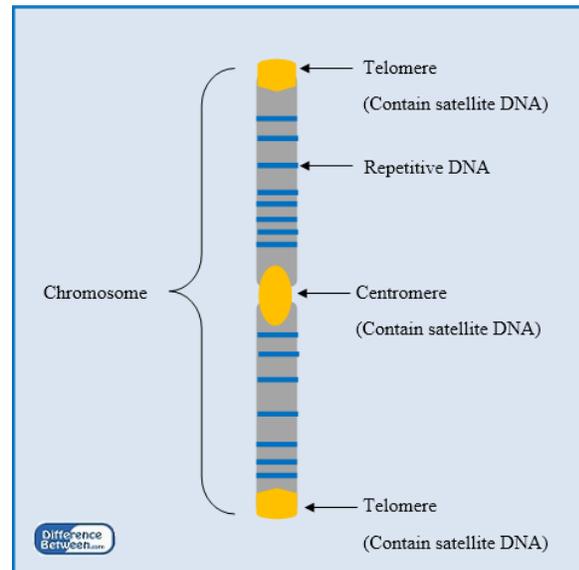
Telocentrico

Acrocentrico

In alcuni momenti un cromosoma è costituito da un singolo cromatidio; ...

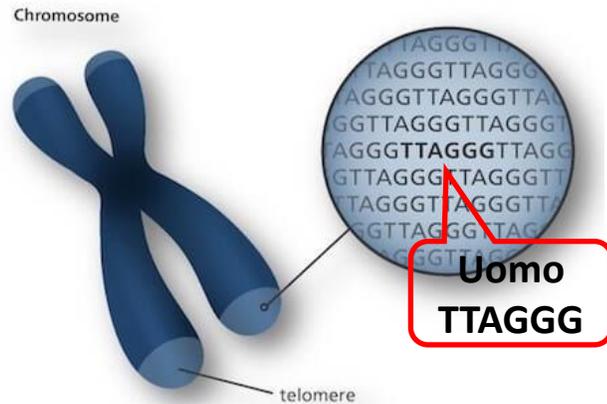
... in altri momenti da due cromatidi fratelli.

I telomeri sono le estremità stabili dei cromosomi.



Il centromero è una regione in cui il cromosoma si restringe e si forma il cinetocore al quale si attaccano i microtubuli del fuso

TELOMERI



Possiedono struttura unica con una sequenza di DNA ripetuta in tandem



I filamenti dei telomeri non seguono i normali meccanismi della replicazione delle molecole di DNA lineare.



A differenza delle cellule della linea germinale, nelle cellule somatiche, con l'età, le sequenze ripetute tendono ad accorciarsi.

Telomeri → estremità terminali dei cromosomi

- evitare la degradazione delle estremità cromosomiche da parte delle nucleasi;
- evitare la fusione con altre molecole di DNA;
- Consentono la replicazione delle estremità delle molecole lineari di DNA.

In prossimità dei telomeri sono presenti spesso anche altre sequenze ripetute in tandem di DNA (**sequenze associate ai telomeri**).

Il numero di ripetizioni dell'**unità di base dei telomeri** varia da specie a specie, da cellula a cellula della stessa specie, da cromosoma a cromosoma.

Uomo

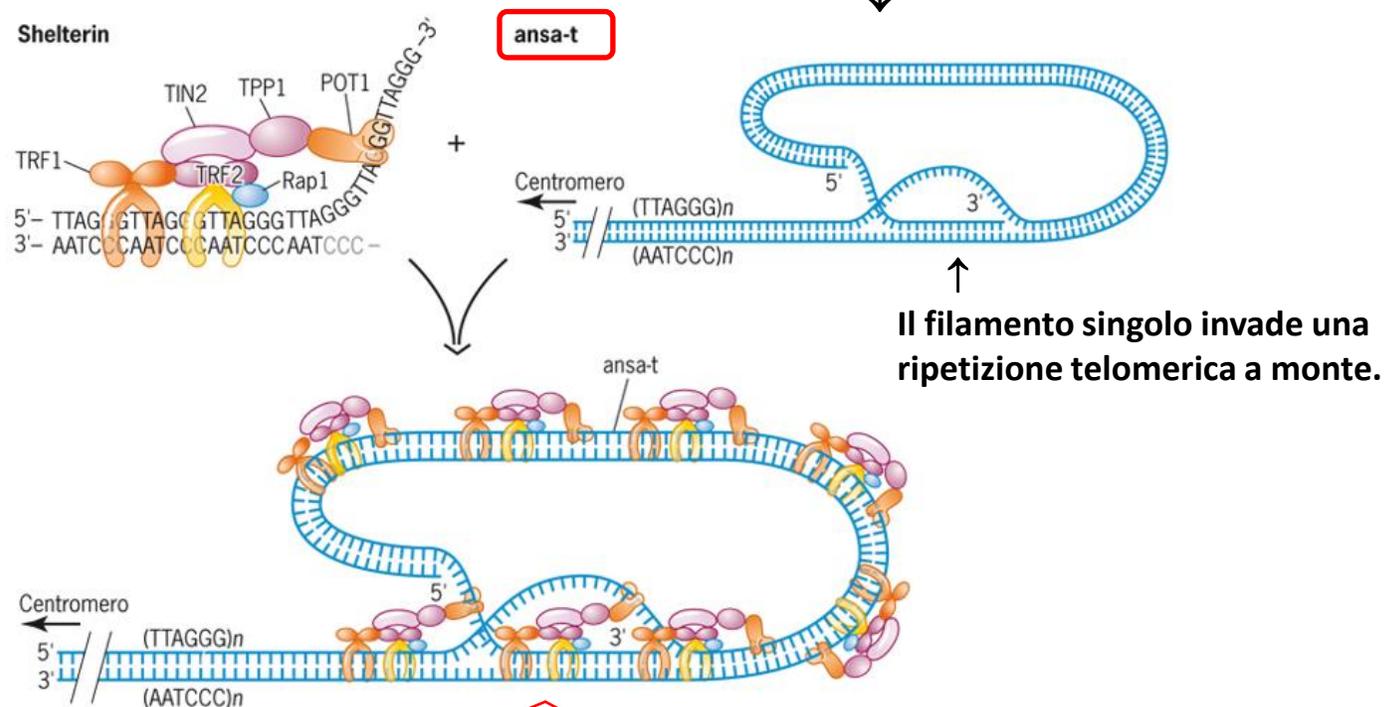
500-3000 ripetizioni della sequenza **TTAGGG**

In alcuni organismi i telomeri sono costituiti da brevi sequenze di DNA in grado di spostarsi di posizione entro o tra i cromosomi (**elementi genetici trasponibili**).

Di solito, i telomeri terminano con una **regione 3' a singolo filamento** (**regione 3' protrudente**) di 12-500 basi (ricco di G).



In alcuni organismi, tra cui l'uomo, il **filamento singolo 3'** invade una ripetizione telomerica situata a monte e si appaia con il filamento complementare, fino a formare strutture definite **anse-T (T-loop)**.



Il filamento singolo invade una ripetizione telomerica a monte.

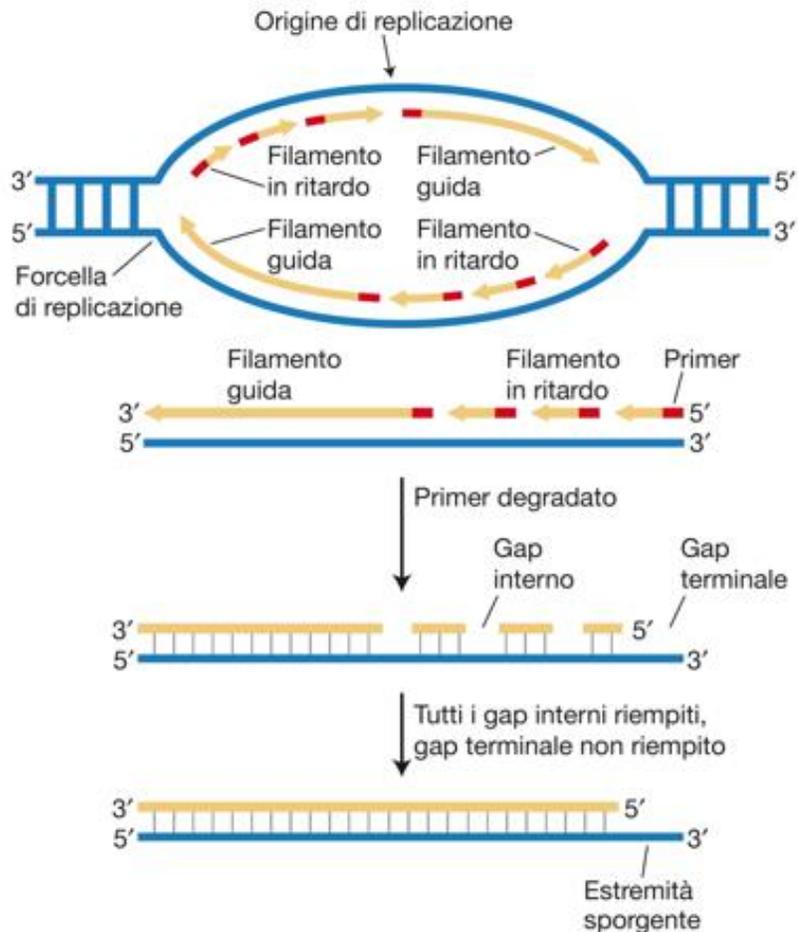
Complesso shelterin (6 proteine)

- TRF1 } legano le sequenze ripetute a 2 filamenti
- TRF2 }
- POT1 } lega le sequenze ripetute a singolo filamento
- TIN2 } legano POT1 a TRF1 e TRF2 legati al DNA
- TPP1 }
- Rap1 } legata a TRF2, regola la lunghezza del telomero

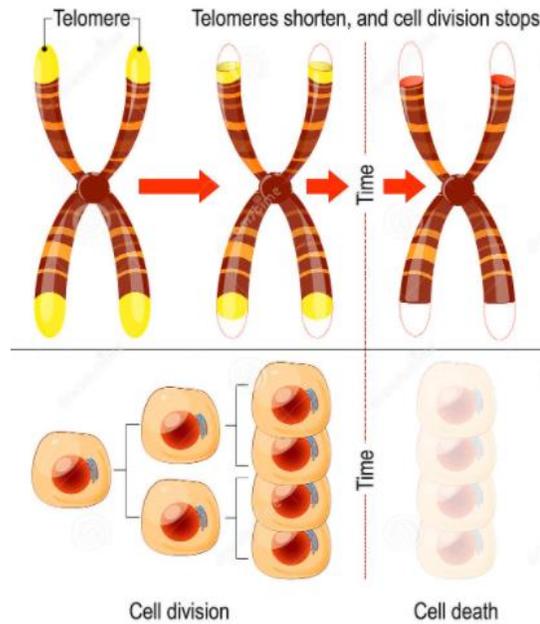
I **complessi proteici shelterin** proteggono il filamento singolo dall'azione dei sistemi di riparazione del DNA.

Con l'avanzare dell'età, nelle cellule somatiche, a causa della perdita di frammenti di telomeri i cromosomi di accorciano gradualmente.

Il problema della replicazione alle estremità del cromosoma



Senescenza

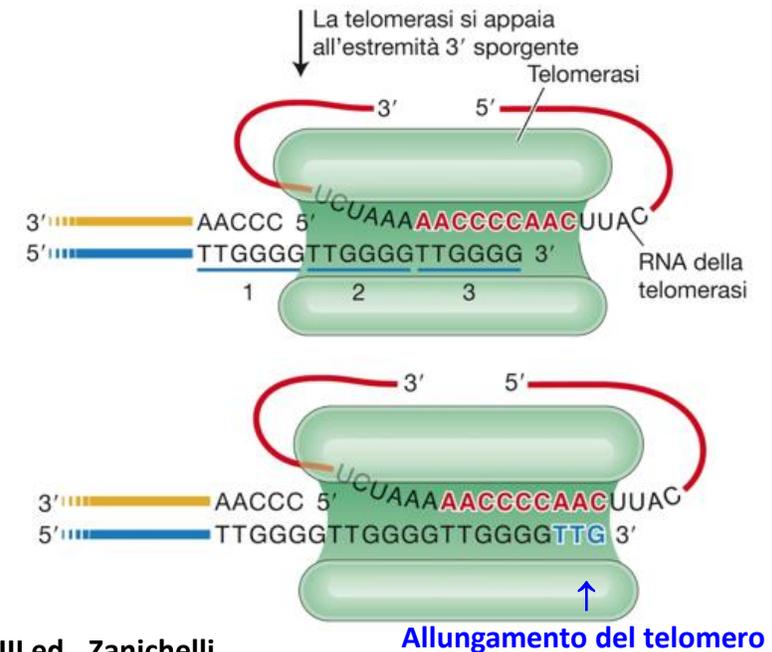


Ad esclusione delle cellule germinali e delle cellule tumorali, in cui sono molto attive le telomerasi.

Esistono degli enzimi (**telomerasi**) che aggiungono brevi sequenze ripetitive all'estremità 3' del DNA.

Le telomerasi sono **ribonucleoproteine**:

- la componente proteica si comporta da **trascrittasi inversa** (usa RNA come stampo per la sintesi di DNA);
- la corta sequenza ad RNA funge da stampo per la sintesi delle sequenze ripetute.



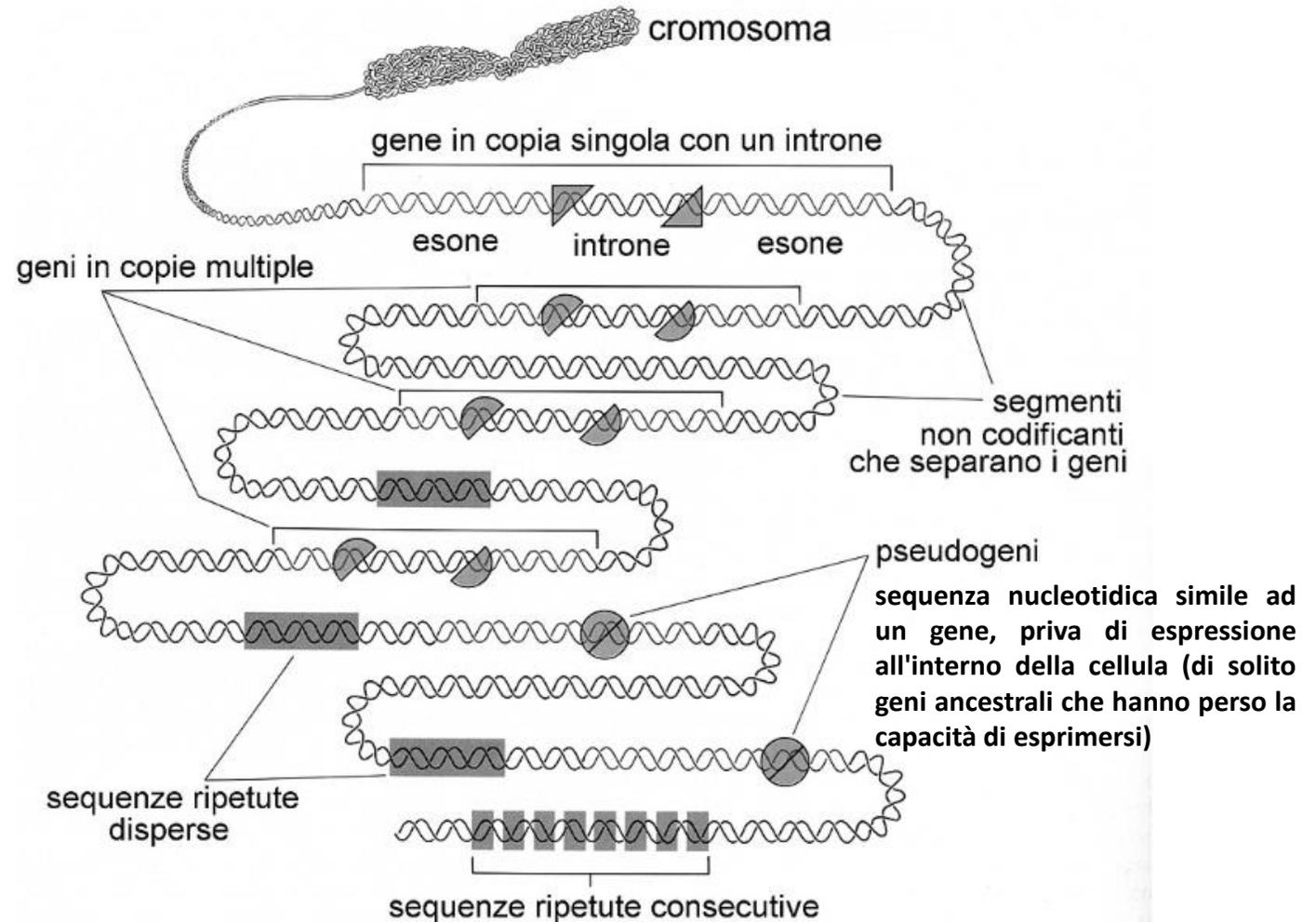
Negli eucarioti i cromosomi contengono molte **sequenze di DNA ripetute** (fino a milioni di volte)

↓
DNA ripetitivo (15-80%)

Quando frammenti di DNA genomico vengono separati su un gradiente di densità, oltre alla comparsa di una banda principale, si formano bande minori (**bande satelliti** → **DNA satellite**).

Bande satelliti → **sequenze ripetute di diverse paia di basi**

- **Sequenze di DNA altamente ripetute non vengono trascritte** (→ **non codificano proteine**).
- **Sequenze meno ripetute** codificano proteine che sono necessarie in elevate quantità (proteine ribosomali, actina, miosina, etc.). Gli specifici rRNA sono codificati da più **geni multicopia**.



Gli **elementi genetici trasponibili** rappresentano il tipo di sequenza di **DNA ripetitivo più abbondante**.

Possono spostarsi da una posizione all'altra di un cromosoma o tra cromosomi diversi.



Nell'uomo il 40-50% del genoma è costituito da elementi trasponibili o sequenze inattive da essi derivati.