

# 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.

### Caratteristiche del 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)

W. Johannsen (1909) → geni

Natura molecolare dei geni?

Sede dei geni?

←

**Mendel** (1865) 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

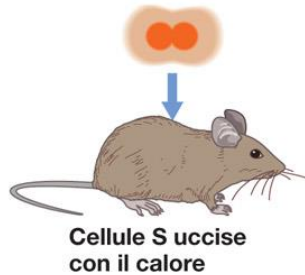
## TRASFORMAZIONE

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

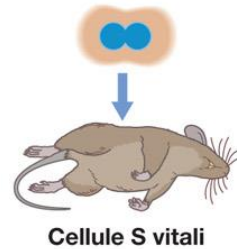
Pneumococco (*Streptococcus pneumoniae*)

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

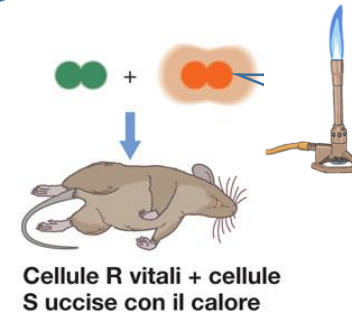
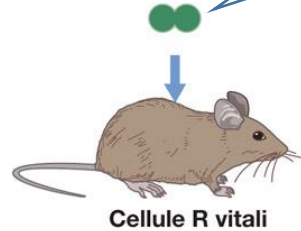
Cellule lisce di pneumococco capsulate (S), trattate al calore, non causavano la morte del topo



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 un fattore trasformante (S) trattate al calore, causavano la morte del topo

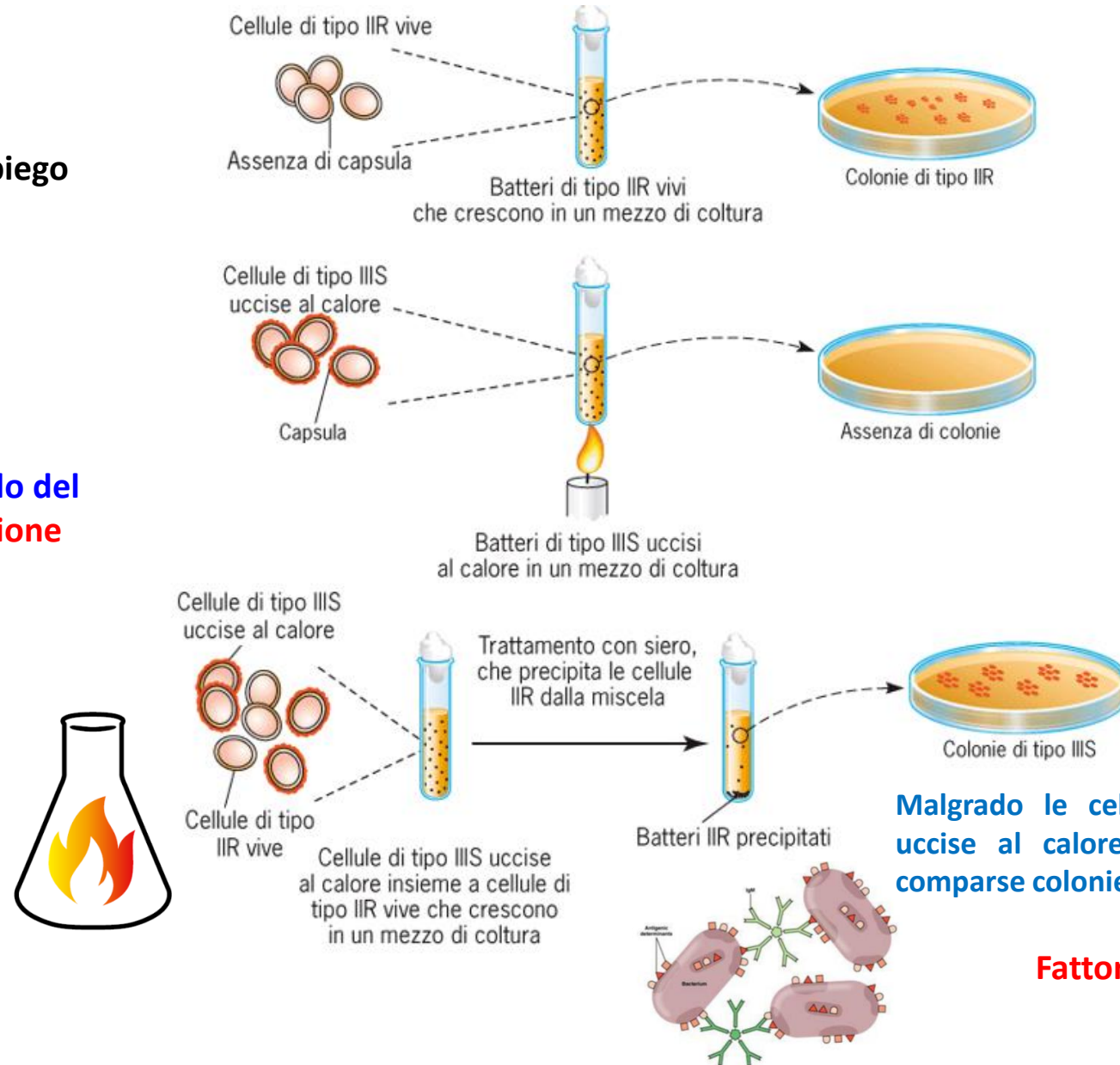
Dal topo morto venivano isolate cellule vitali di pneumococco capsulate

**Fattore trasformante?**

**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.**

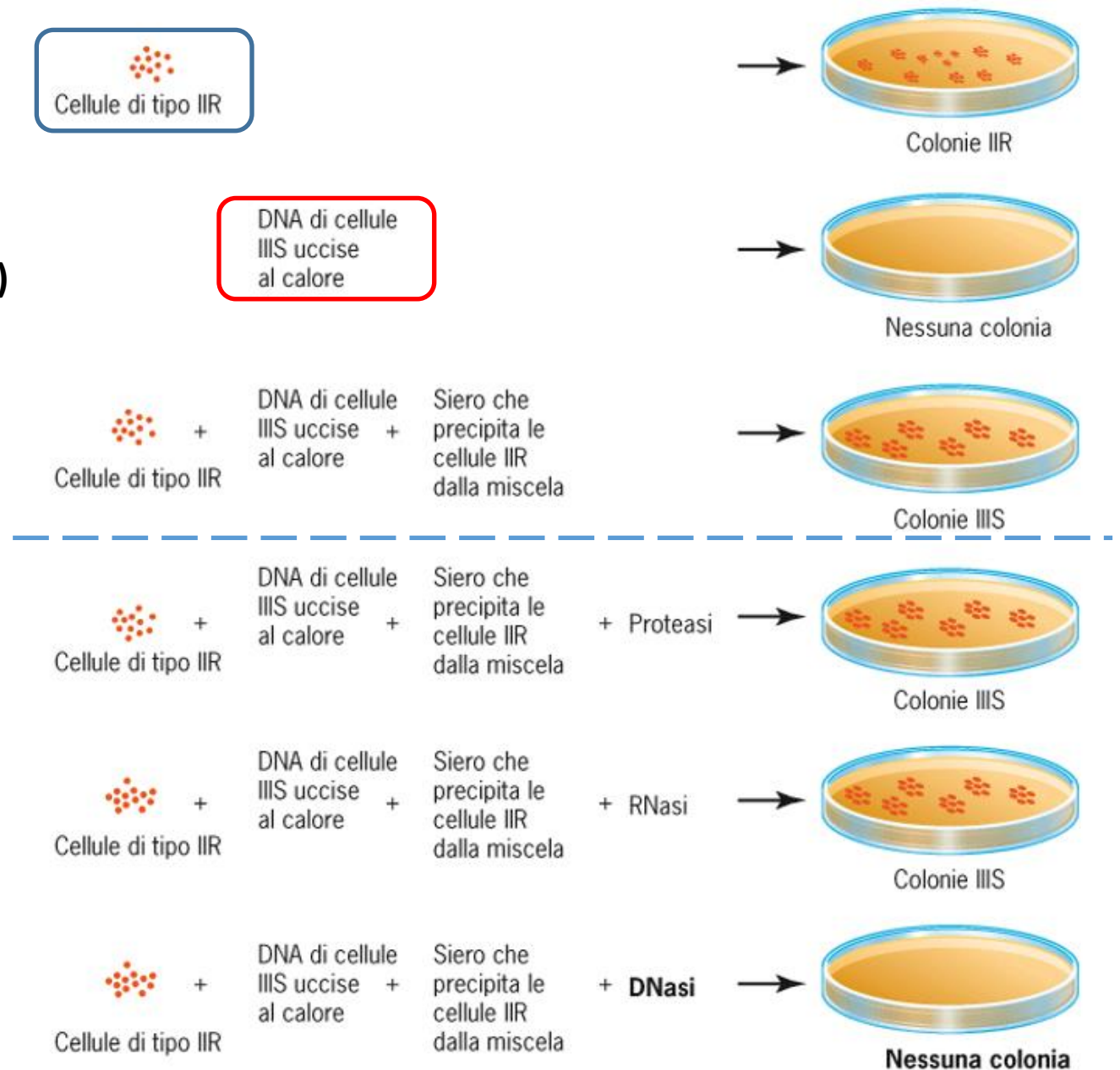
**Fattore trasformante? →**

Quale era la natura del fattore trasformante?  
Veramente la trasformazione era dovuta al DNA?  
E se fossero i polisaccaridi delle capsule o tracce di  
proteine, magari associate al DNA, il vero principio  
trasformante?

### Esperimento di Avery, MacLeod e McCarty (1944)

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 (1952) Informazione genetica del fago T2 → DNA

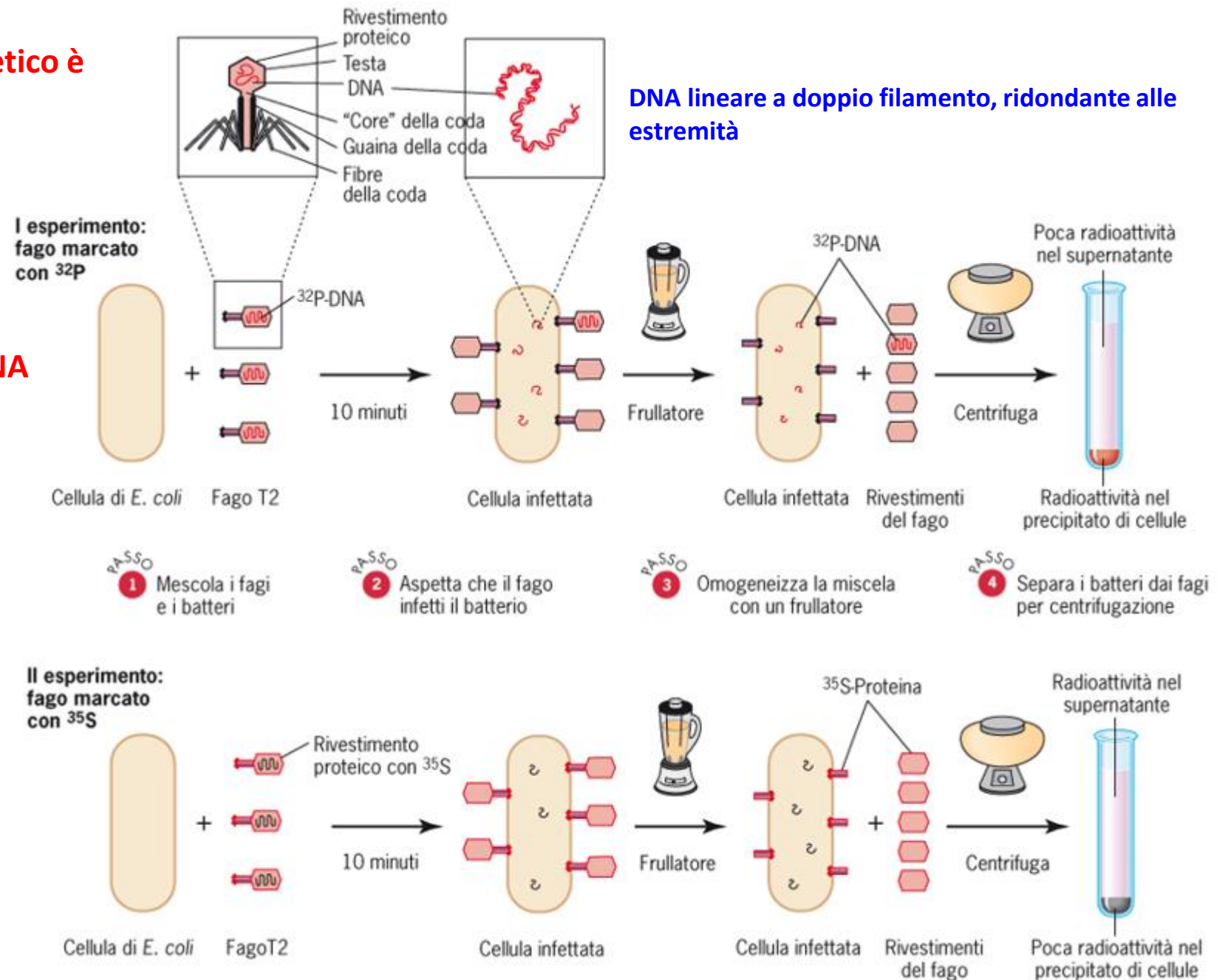
Al posto di  $^{31}\text{P}$  e  $^{32}\text{S}$ , per la preparazione dei fagi marcati vennero utilizzati i loro **isotopi radioattivi** ( $^{32}\text{P}$  e  $^{35}\text{S}$ ).

### 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.

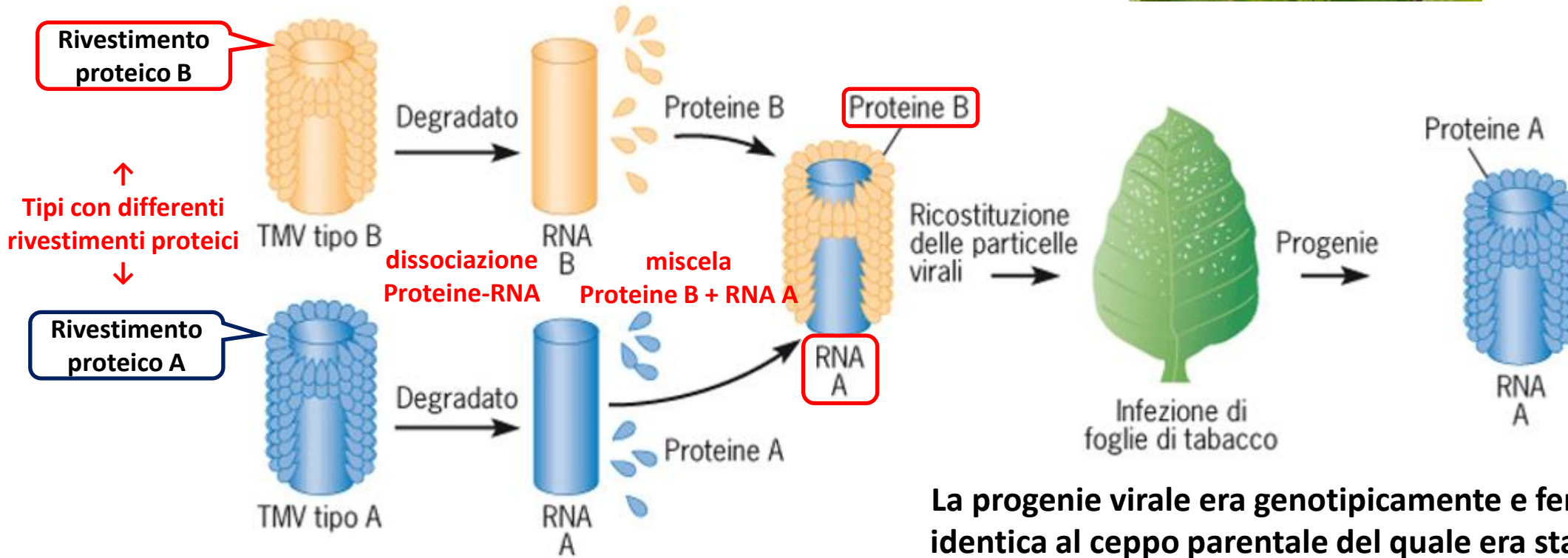
### Conclusione

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.

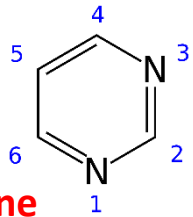


**RNA depositario dell'informazione genetica!**  
**Le proteine di rivestimento non intervengono nel trasferimento dell'informazione per la replicazione virale**

# STRUTTURA DNA ed RNA

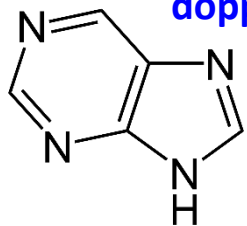
Macromolecole costituite da subunità ripetute

↓  
nucleotidi



**Pirimidine**  
Citosina  
Timina  
Uracile

doppio anello azotato



**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): 

Chargaff e coll.  
Nel DNA

$$[A]=[T]$$

$$[C]=[G]$$

$$[C+T]=[A+G]$$

$$[A+T] \neq [G+C]$$

$$[\text{pyrimidine}] = [\text{purine}]$$

$$[A+T]/[G+C]$$



Rapporto caratteristico nelle diverse specie!  
Tutte le cellule dei diversi tessuti hanno lo stesso rapporto!

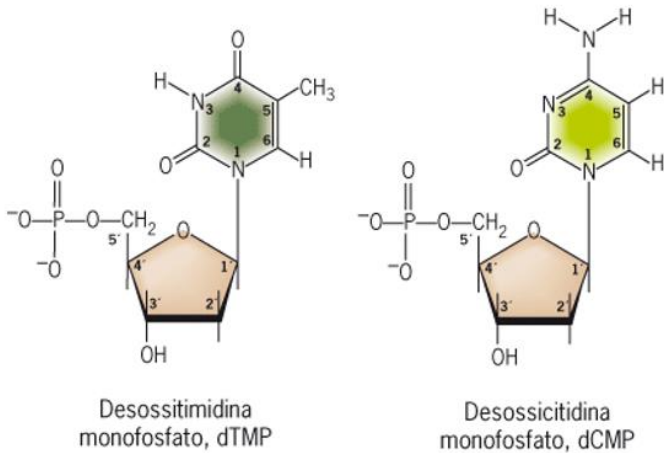


Tutte le cellule di un organismo hanno la stessa sequenza del DNA

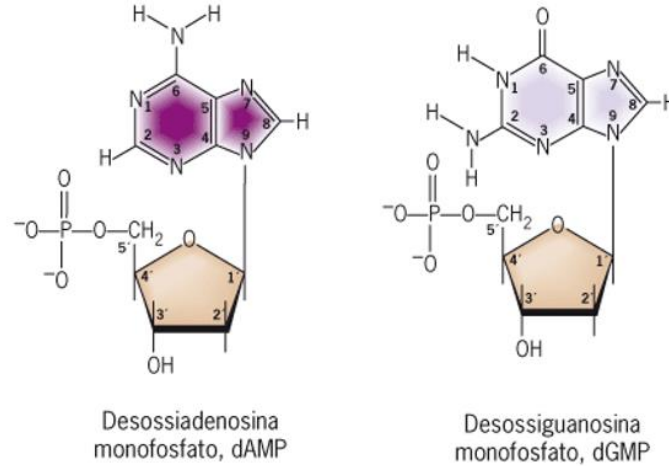
## Subunità costituenti il DNA (nucleotidi)

dTMP  
dCMP  
dAMP  
dGMP

### Nucleotidi pirimidinici

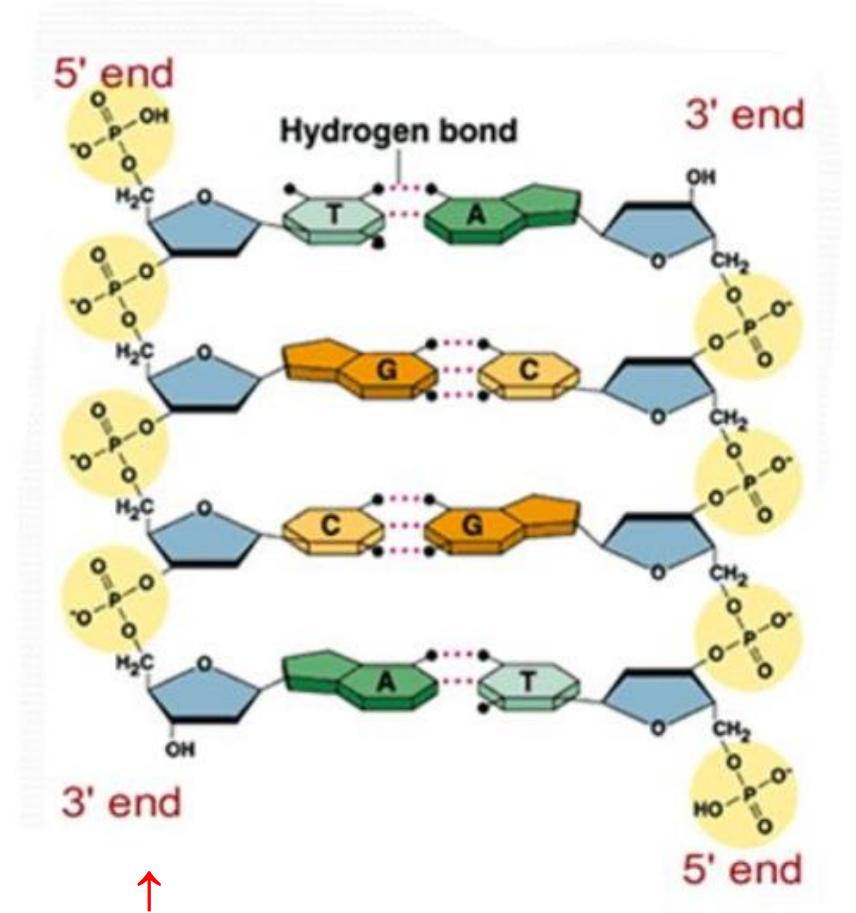


### Nucleotidi purinici



↑  
deossiadenosina 5'-monofosfato

5' → posizione dell'atomo di carbonio al quale si lega il gruppo monofosfato



↑  
Catena polinucleotidica  
Polarità 5'-3'

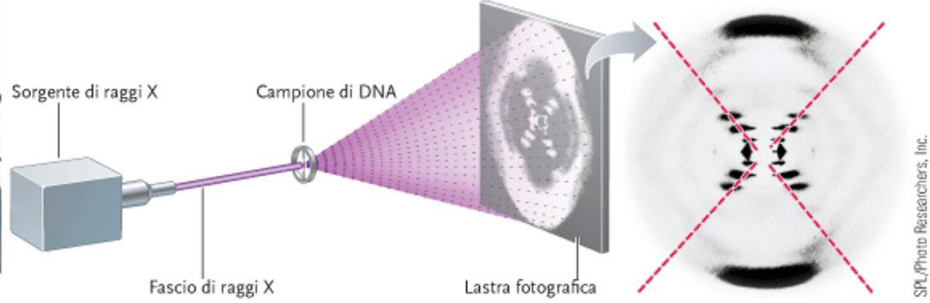


a. Rosalind Franklin



Figura 4-5

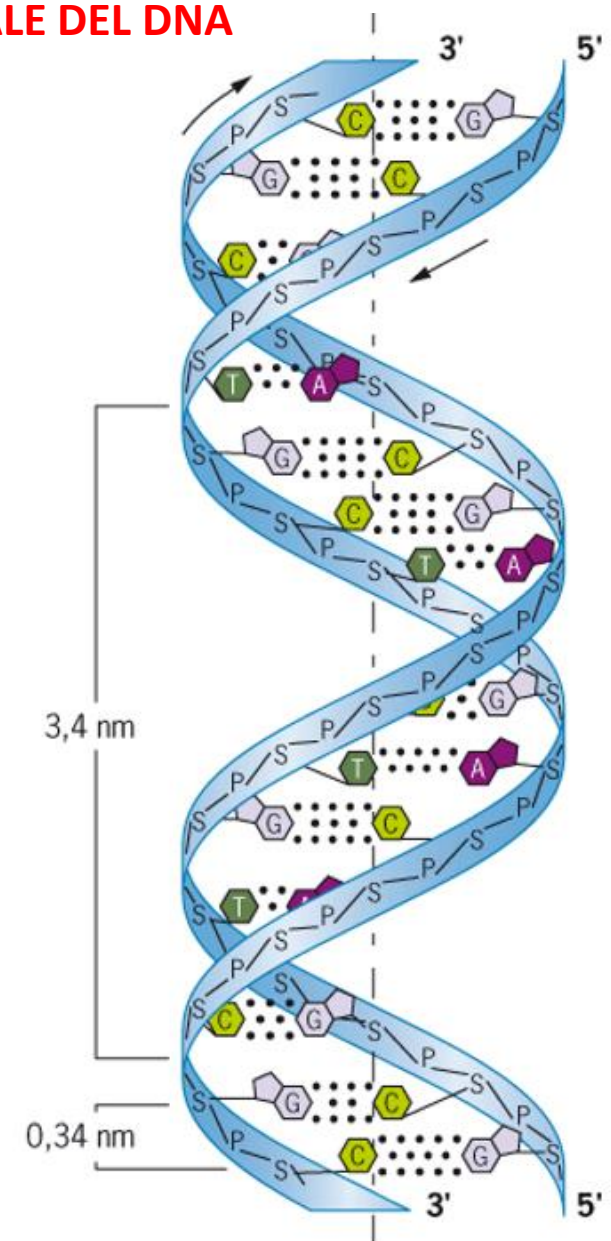
b. Analisi del DNA mediante diffrazione dei raggi X



## STRUTTURA TRIDIMENSIONALE DEL DNA

### Modello a doppia elica

Pattern di diffrazione ai raggi X



Ogni giro = ~10 coppie i basi

Watson e Crick (1953)



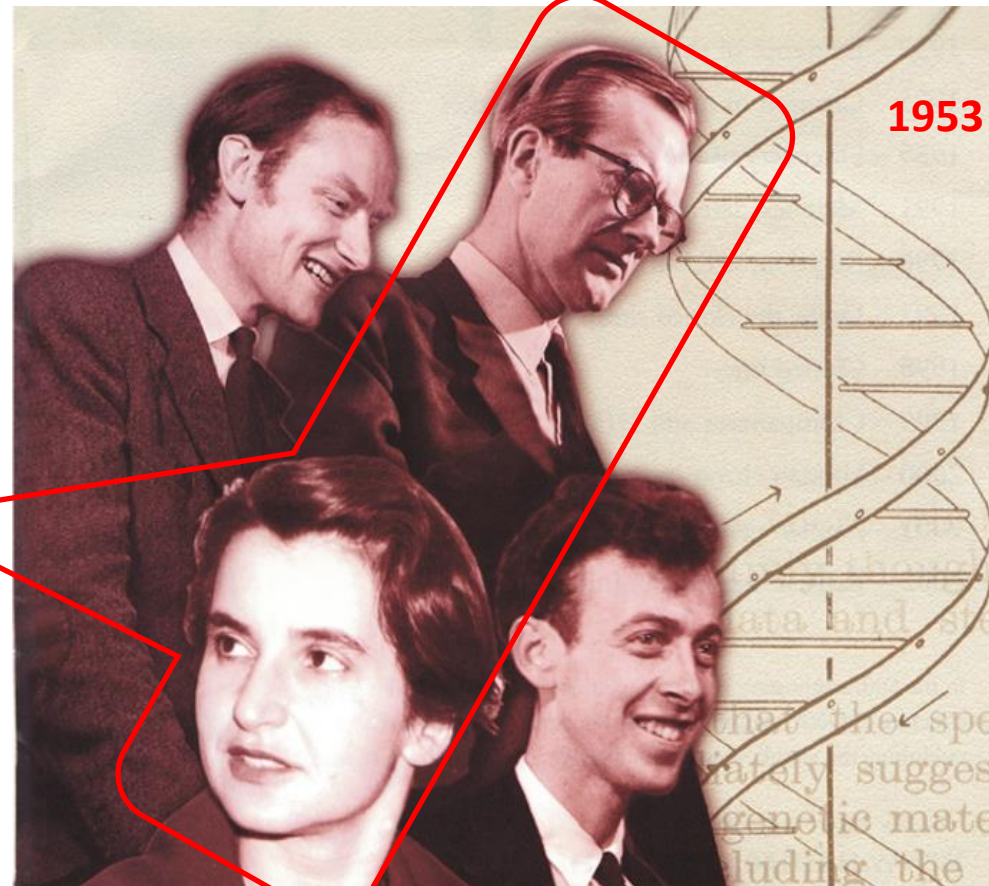
DNA a doppia elica destrorsa

Wilkins e Franklin

Diffrazione ai raggi X su molecole di DNA

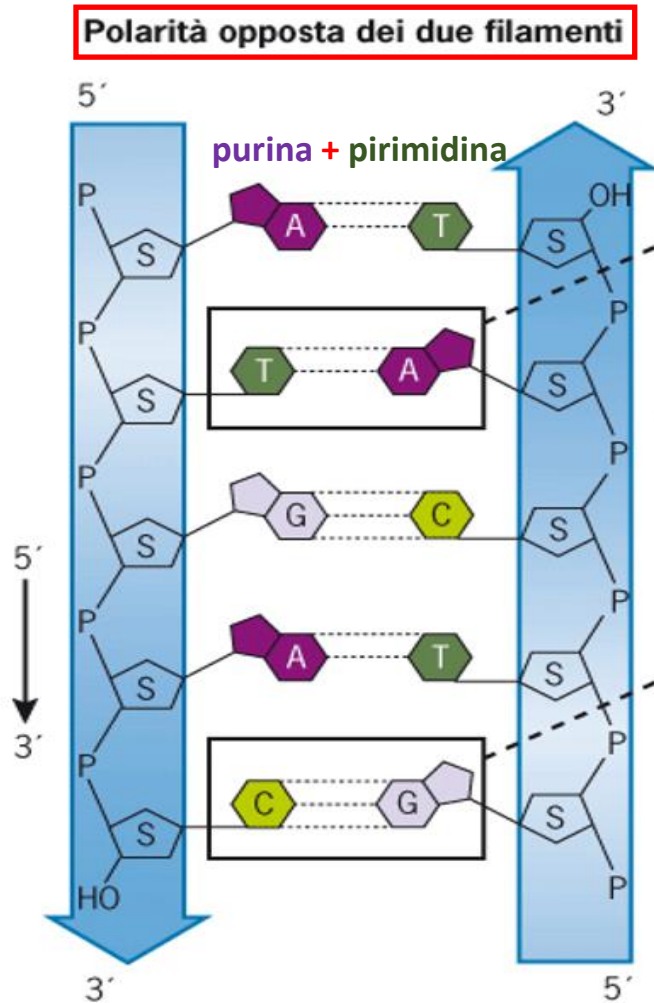


Il DNA si presentava sotto forma di **due filamenti**, con una struttura altamente ordinata e con **substrutture che si ripetevano ogni 0,34 nm** (distanza tra le coppie di basi).

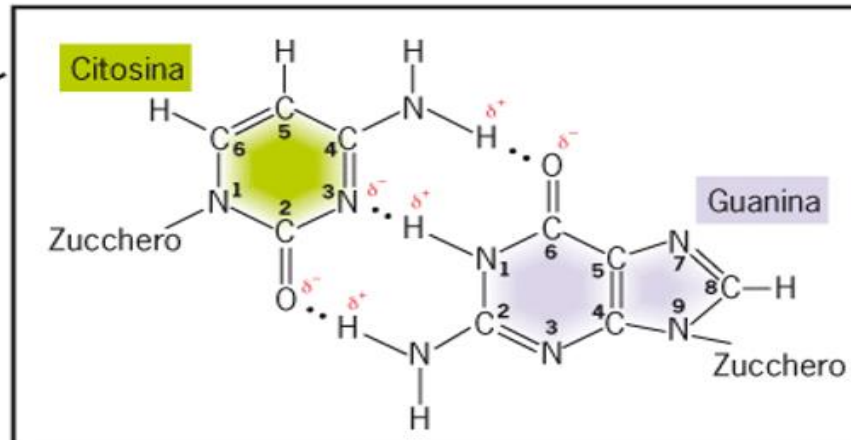
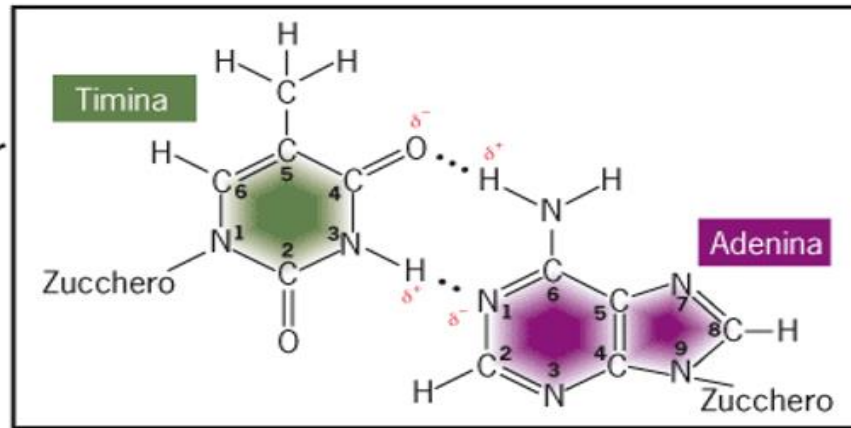


1953

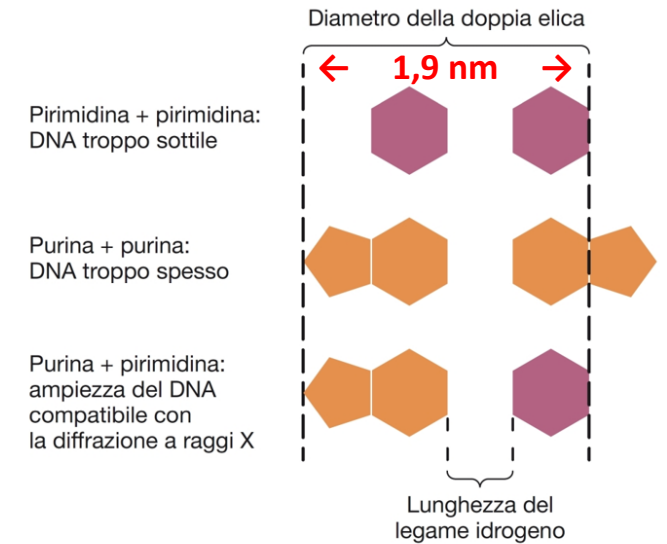
## Coppie di basi costituite da una purina ed una pirimidina



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



### L'appaiamento delle basi nel DNA



Griffith et al. «Genetica» 8<sup>a</sup> ediz., Zanichelli

Filamenti complementari ed antiparalleli

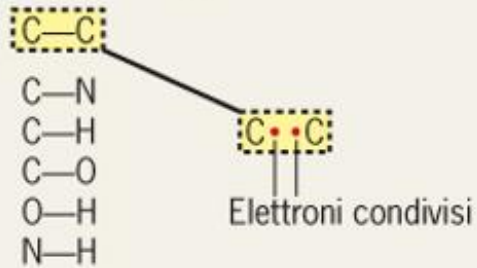
La complementarietà dei filamenti rende il DNA una macromolecola adatta a conservare e trasmettere fedelmente l'informazione genetica di generazione in generazione.

## Legami chimici importanti nella struttura del DNA

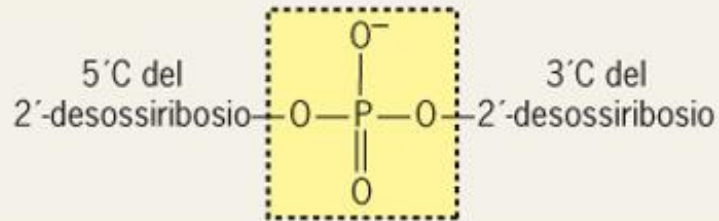
### (a) Legami covalenti

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

(1) Nelle basi e negli zuccheri

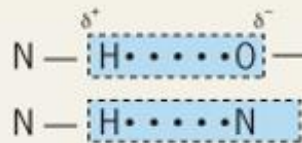


(2) Nei legami fosfodiesterici



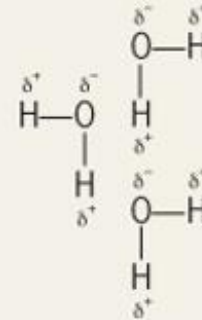
### (b) Legami idrogeno

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 H<sub>2</sub>O.

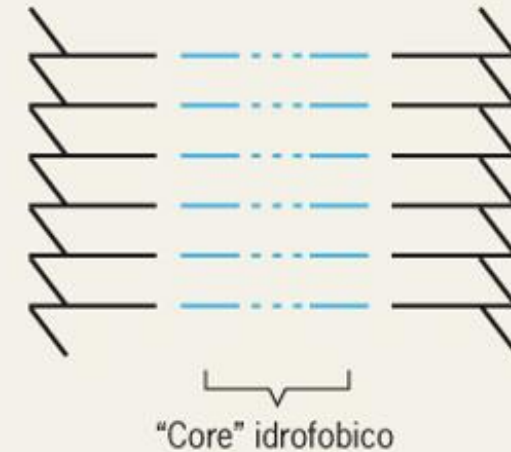


Le molecole di acqua sono molto polari ( $\delta^-$  O e  $\delta^+$  H).

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.

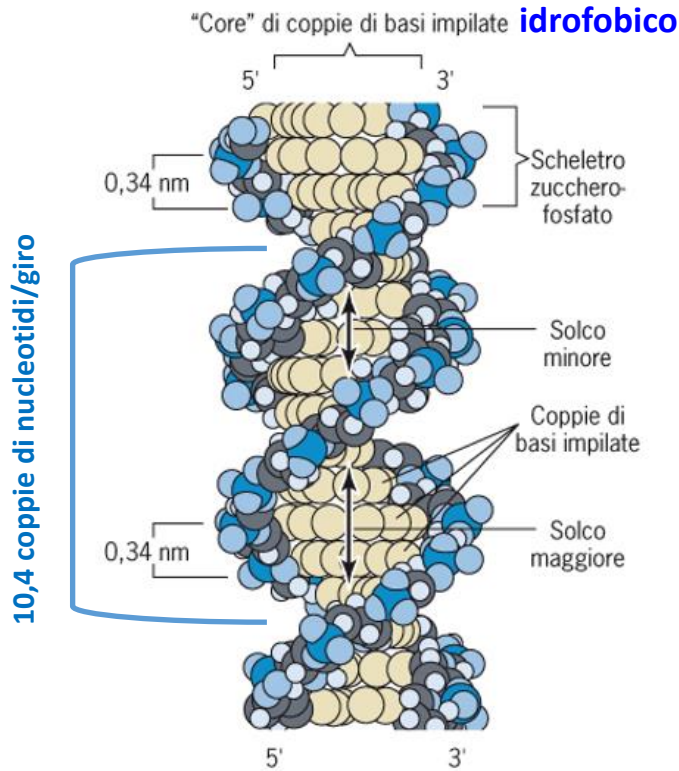


# Struttura e conformazioni del DNA

## 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?

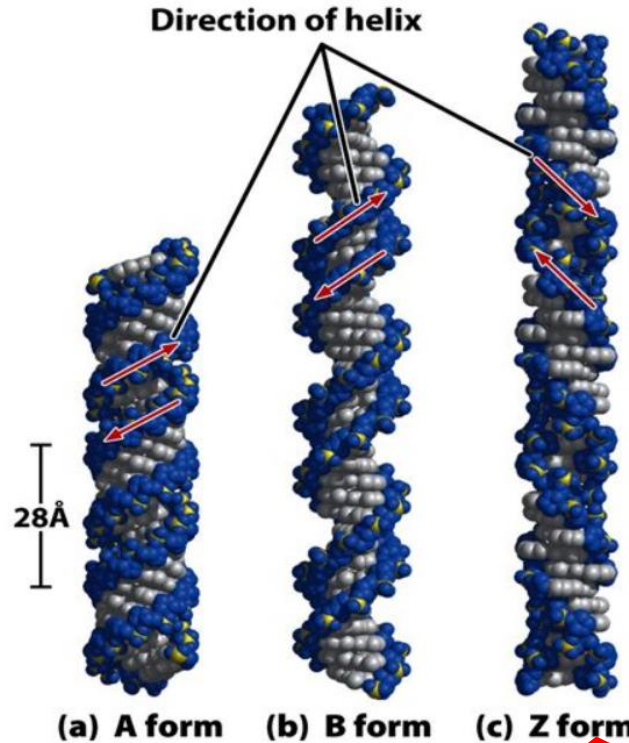


Figure 10-15  
 Genetics: A Conceptual Approach, Third Edition  
 © 2009 W. H. Freeman and Company

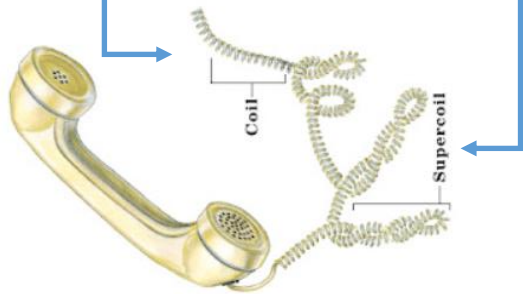
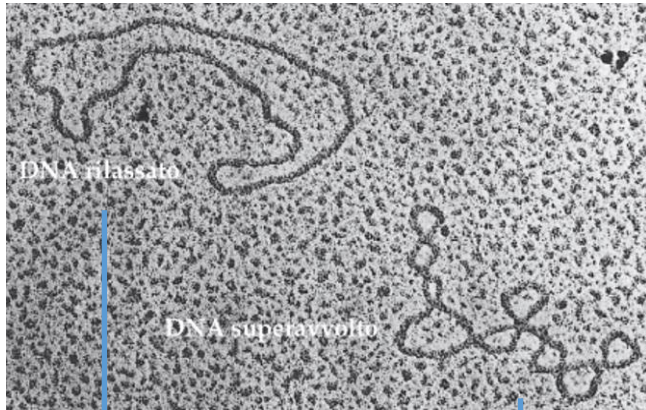
**Conformazione in soluzione ad elevata concentrazione salina o in condizioni di disidratazione (11 coppie di basi/giro).**

**Conformazione a doppia elica che può organizzarsi anche in forma sinistrorsa (12 coppie di basi/giro).**

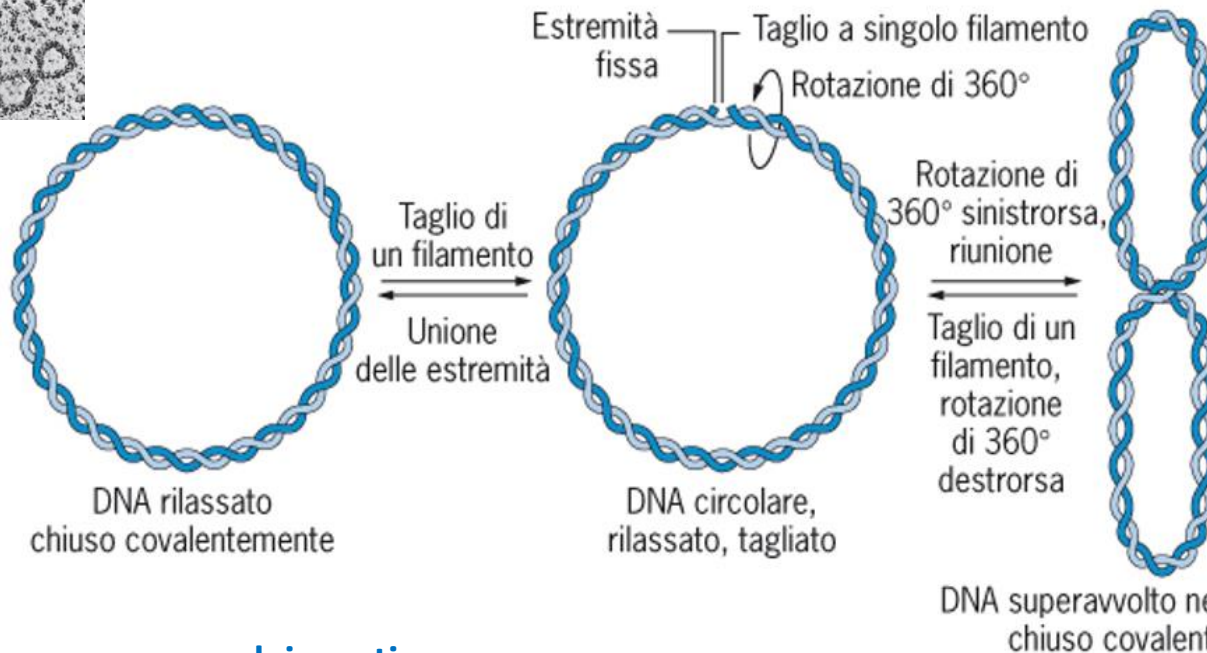
**Conformazione in soluzione acquosa a bassa concentrazione salina (condizioni fisiologiche). (10,4 coppie di basi/giro).**

## Ulteriore livello di organizzazione

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

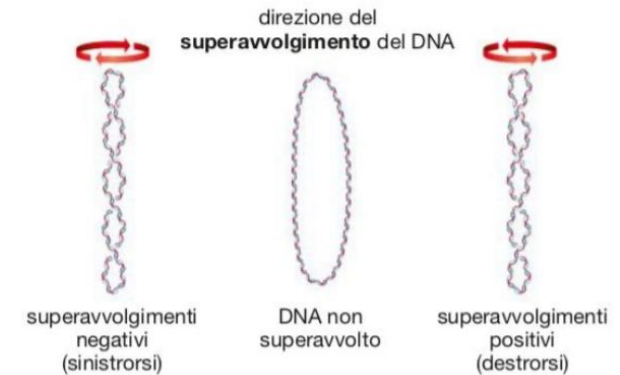
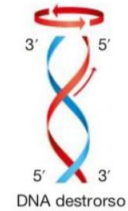


Il superavvolgimento può avvenire solo in molecole di DNA ad estremità fisse.



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.



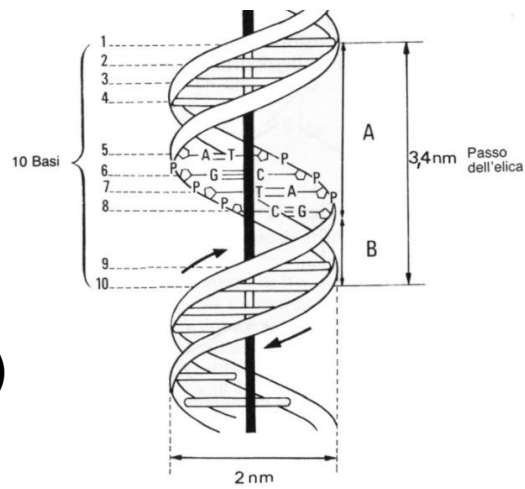
Enzimi specifici introducono superavvolgimenti anche in cromosomi eucariotici (lineari), bloccati da legami con componenti non nucleici dei cromosomi.

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
- Monoplidi (una sola copia del genoma)

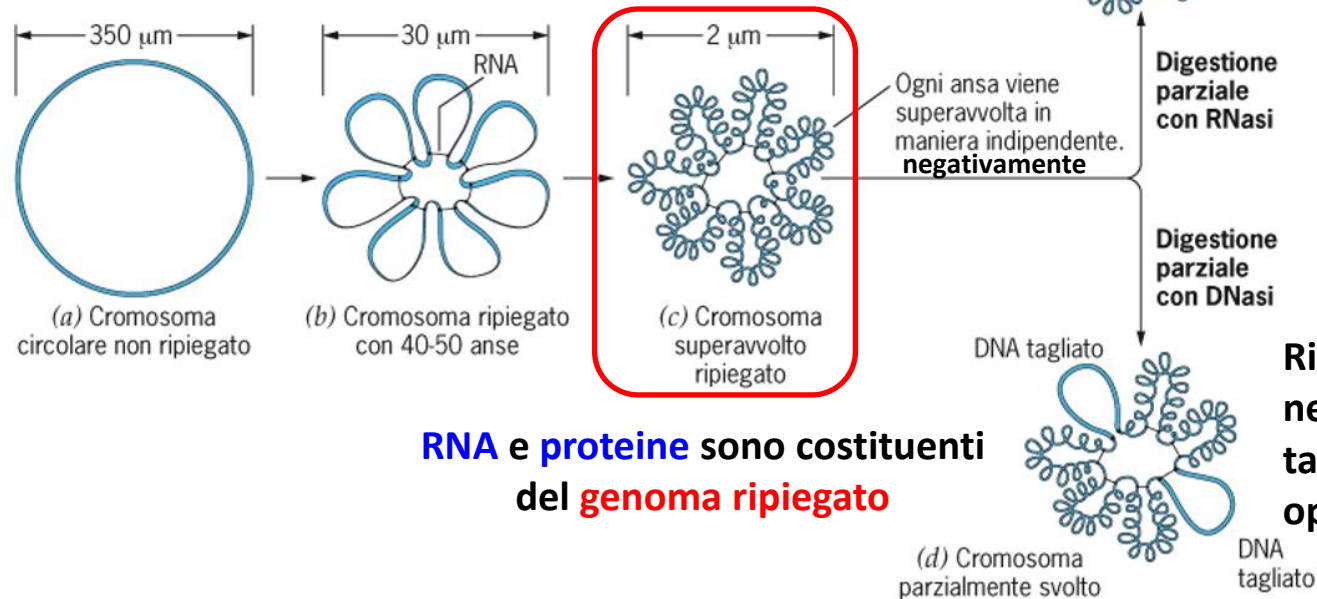


*E. coli* (1-2  $\mu\text{m}$ )

cromosoma lungo 1500  $\mu\text{m}$   $\rightarrow$  2500-3500 geni



DNA in configurazione altamente condensata

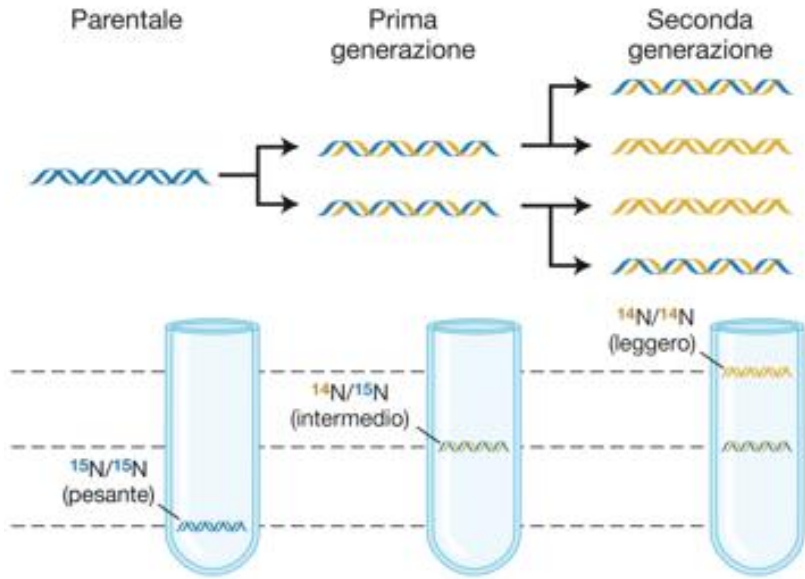


**RNA e proteine** sono costituenti del **genoma ripiegato**

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

(a) Ipotesi del modello semiconservativo



Meselson e Stahl (1958)

*E. coli* coltivato in presenza dell'isotopo pesante  $^{15}\text{N}$



Dopo ripetuti cicli di replicazione **tutto il DNA marcato  $^{15}\text{N}$**  (catene  $^{15}\text{N}/^{15}\text{N}$ )

I batteri vennero, poi, trasferiti in terreno con  $^{14}\text{N}$



A tempi diversi, il DNA estratto dai batteri venne centrifugato in gradiente di cloruro di cesio



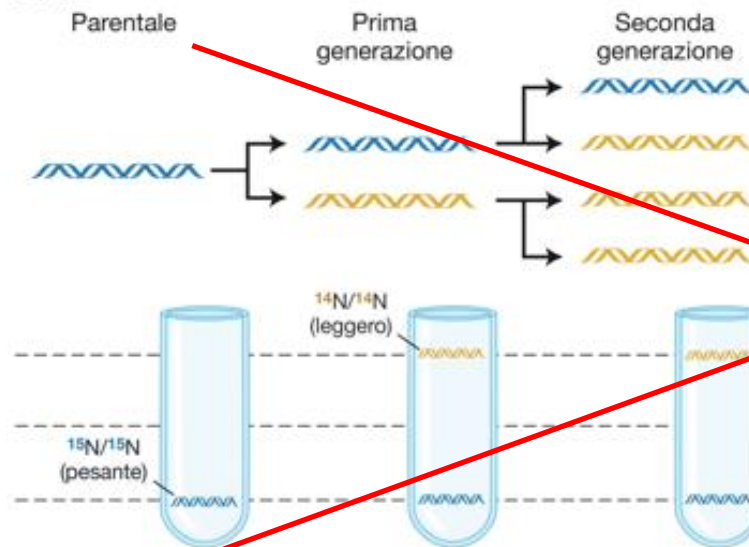
- Dopo il primo ciclo di replicazione, solo comparsa di catene  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$
- Al secondo ciclo di replicazione comparsa catene  $^{14}\text{N}/^{14}\text{N}$  e  $^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$

**MECCANISMO DI REPLICAZIONE DEL DNA?**

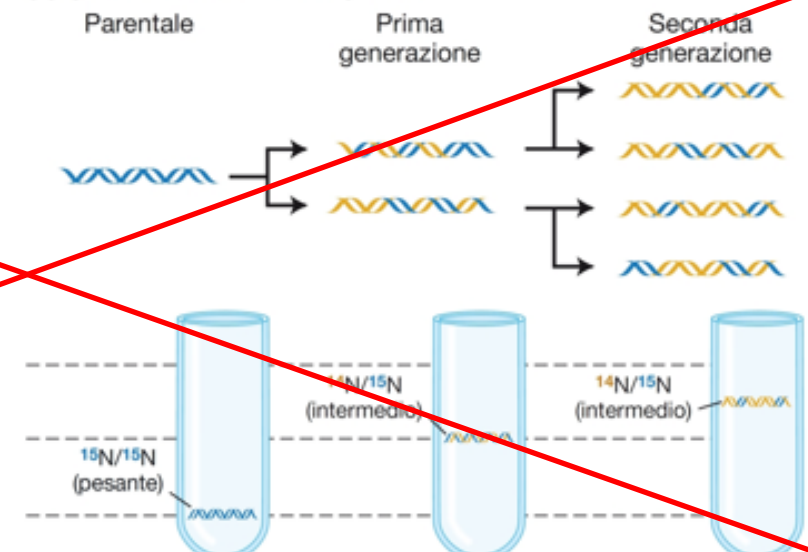
Proposti 3 modelli di replicazione

- Conservativo
- Semiconservativo
- Dispersivo

(b) Ipotesi del modello conservativo

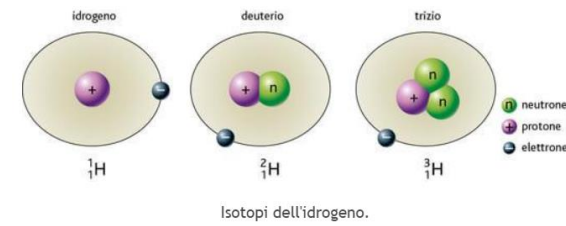


(c) Ipotesi del modello dispersivo



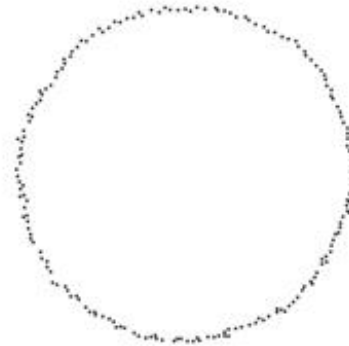
**DA DOVE PARTE LA REPLICAZIONE DEL DNA?**  
**In un solo sito?**  
**In più siti?**  
**Siti ben definiti o casuali?**

Cairns (1963)

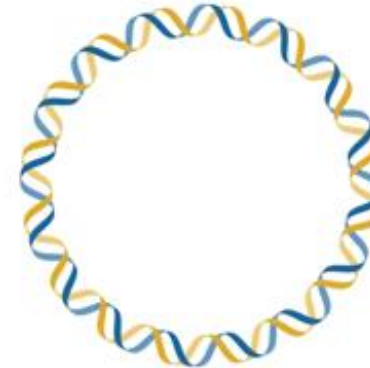


Coltura di *E. coli* in terreno con nucleoside **timidina triziata**

(a) Cromosoma dopo un ciclo di replicazione



Autoradiografia



Interpretazione

L'autoradiografia del DNA isolato *da E. coli*, dopo un ciclo di replicazione, mostrava un sottile **filamento circolare marcato**.

↓

*E. coli* → **cromosoma di forma circolare**

Durante un secondo ciclo di replicazione l'autoradiografia mostrava un sottile filamento a circolare sul quale si intersecava un filamento marcato più spesso (doppia elica).

↓

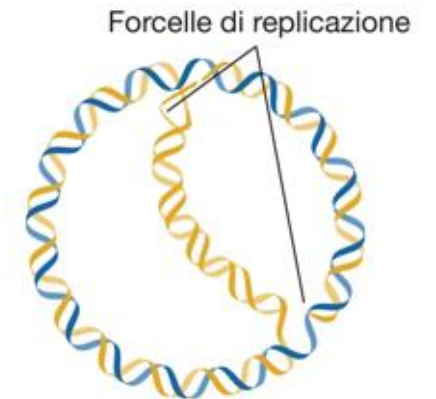
Formazione **forca di replicazione** (replicazione theta)

θ

(b) Cromosoma durante il secondo ciclo di replicazione



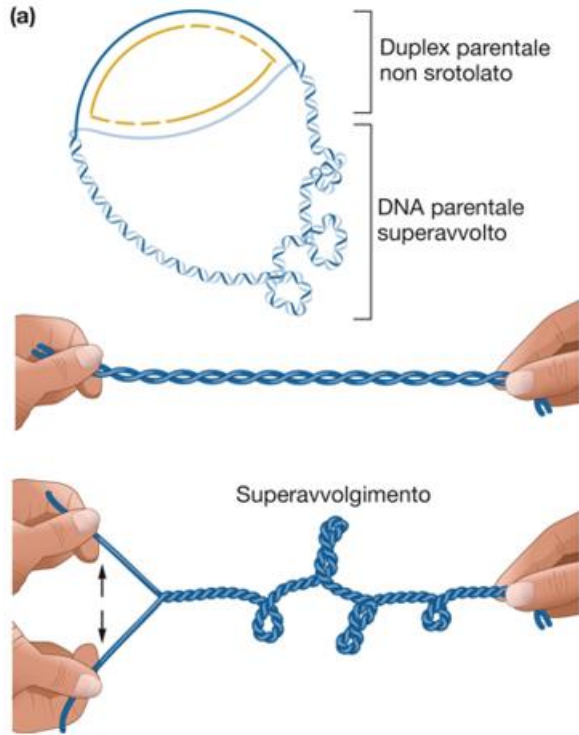
Autoradiografia



Interpretazione



## REPLICAZIONE DEL DNA NEI BATTERI



Lo srotolamento del DNA durante la replicazione indurrebbe la formazione di superavvolgimenti nei due filamenti.

Due classi di proteine (**elicasi** e **topoisomerasi**) consentono la replicazione del DNA evitando la formazione di superavvolgimenti.

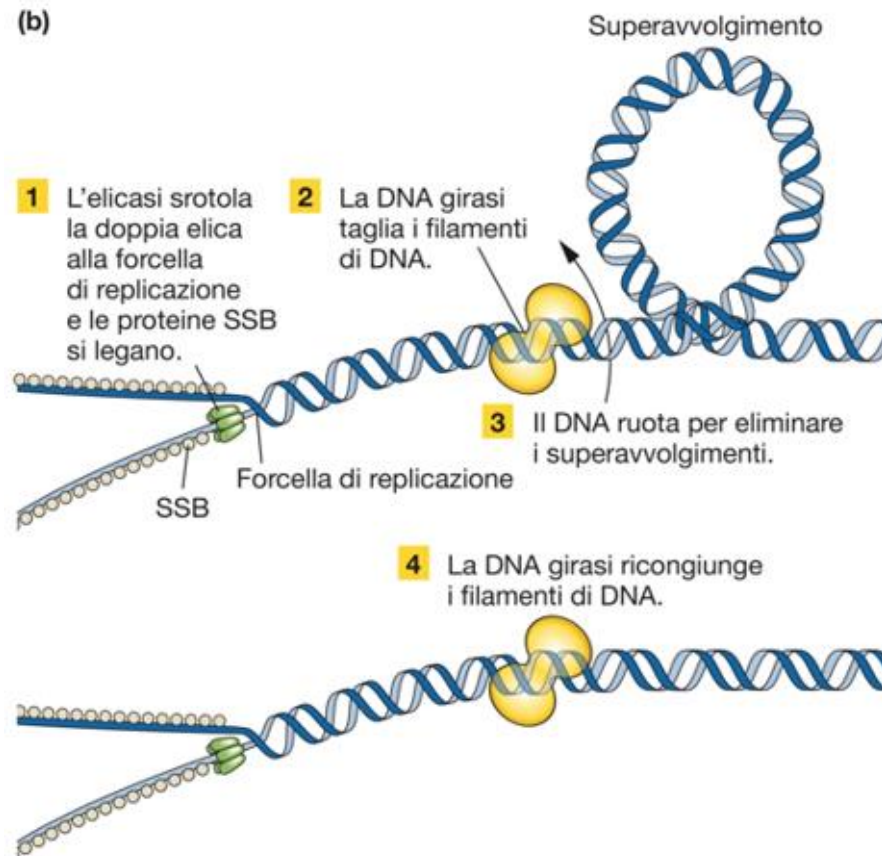
### Elicasi

**Esoesamero** (complesso di 6 copie di **DnaB**).

Apri, sfruttando l'energia derivante dall'idrolisi dell'ATP, i due filamenti della doppia elica a livello della forcella di replicazione.



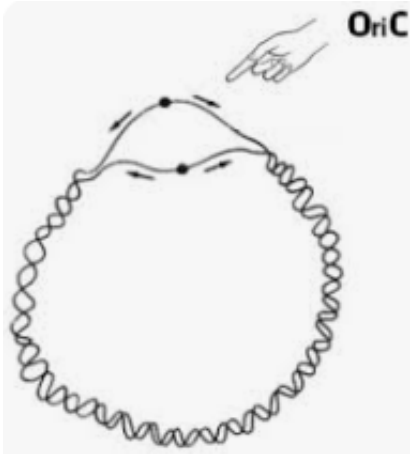
Superavvolgimenti a valle della forcella di replicazione!



La **DNA girasi (topoisomerasi)** rompendo uno o entrambi i filamenti davanti alla forcella di replicazione, elimina i superavvolgimenti ed induce un rilassamento nella doppia elica.

## Replisoma

complesso di enzimi e proteine il cui assemblaggio avviene a livello dell'origine della replicazione (*OriC*).



Sito più vulnerabile alla separazione dei due filamenti del DNA

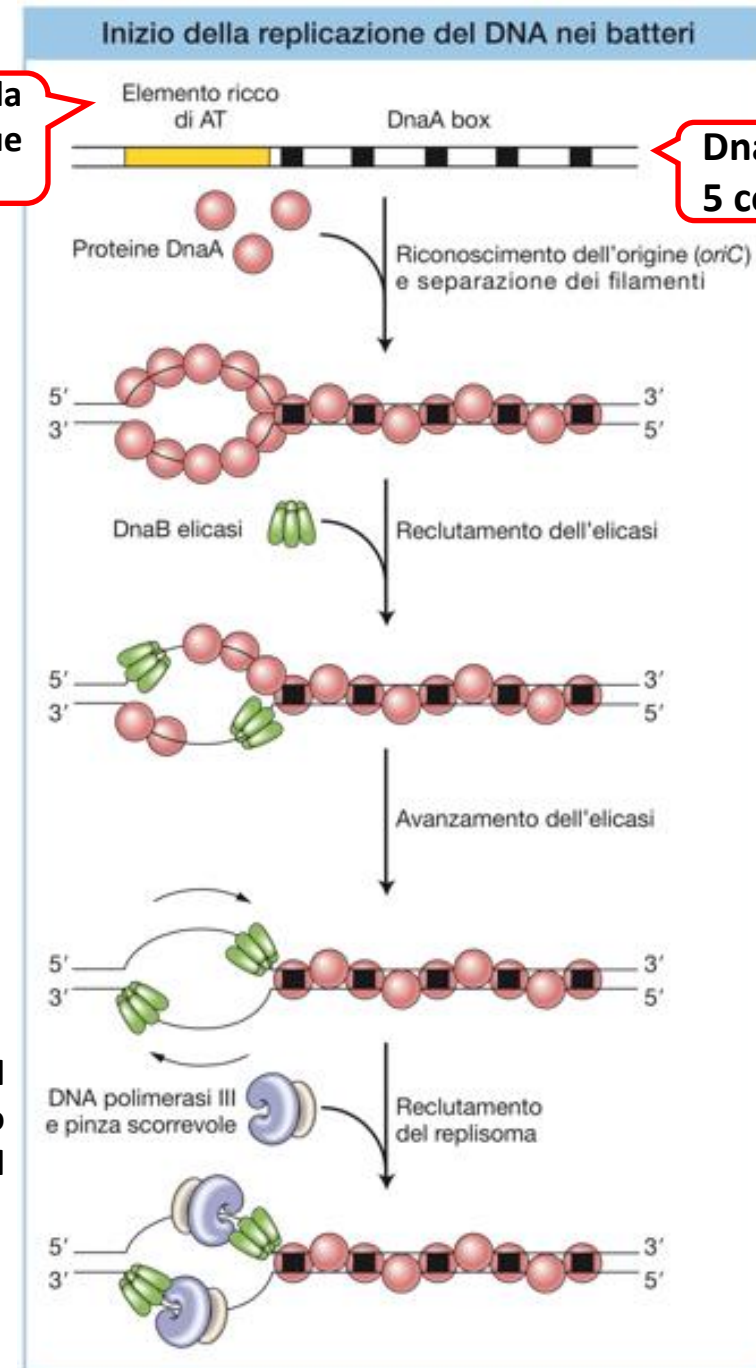
Il legame delle proteine **DnaA** alla regione **Dna box** richiama altre DnaA (**oligomerizzazione della DnaA**) che si legano anche al tratto AT.



Srotolamento ed apertura della doppia elica e reclutamento delle **DnaB elicasi**.

Con l'avanzamento dell'elicasi coincide una progressiva **eliminazione delle proteine DnaA** ed assemblaggio del **replisoma**.

Le proteine DnaA non entrano a far parte del replisoma, ma ne dirigono il giusto posizionamento in corrispondenza di *OriC* del cromosoma circolare.



Dna box  
5 copie di 9 paia di basi

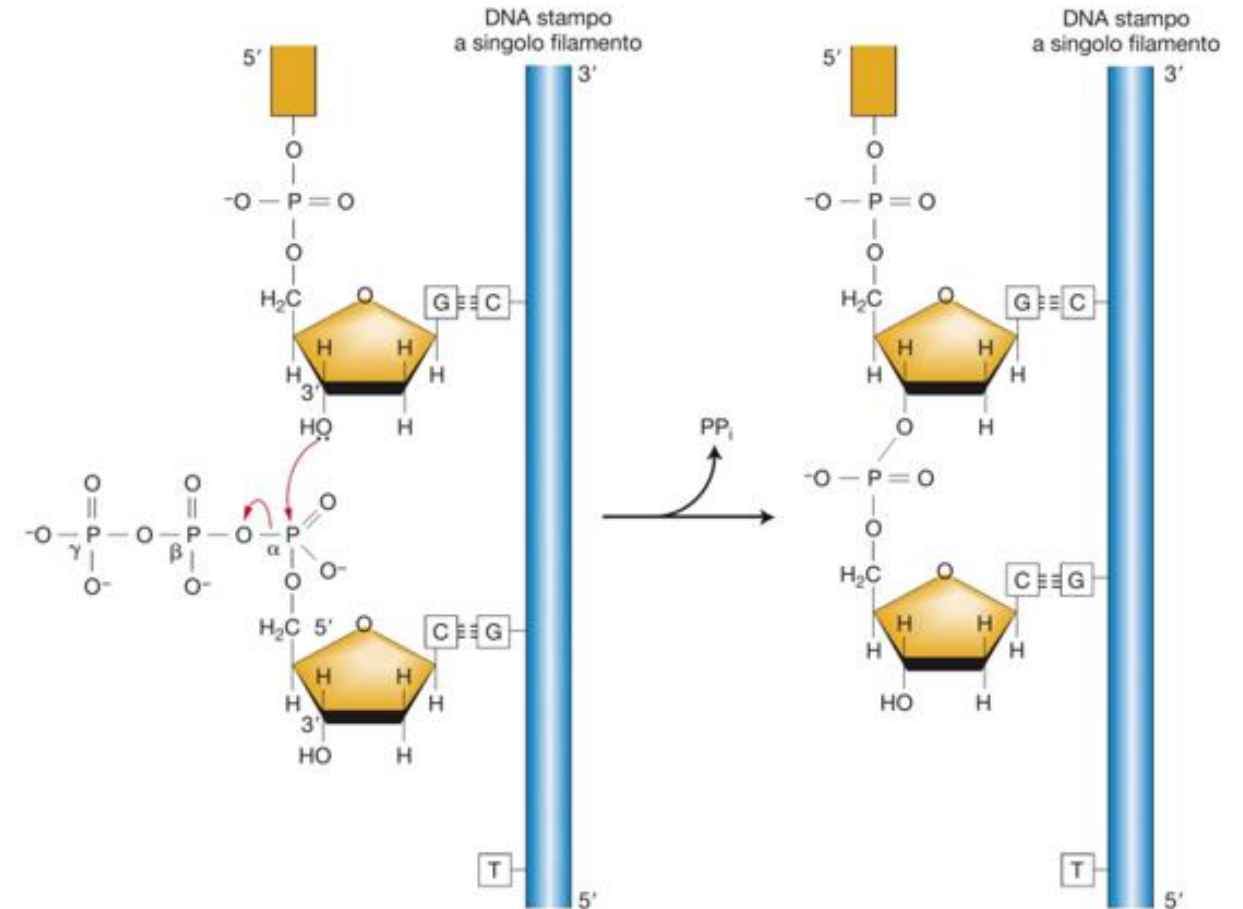
## Allungamento della catena di DNA

A. Kornberg (1959)

Studiando *E. coli*, dimostrò l'esistenza di un enzima ad attività polimerasica (**DNA polimerasi**) in grado di sintetizzare un filamento di DNA (**5'→3'**) complementare ad un filamento stampo partendo da **dNTP**.

Nella fase di elongazione la DNA polimerasi aggiunge nucleotidi all'estremità 3' del filamento in formazione con liberazione di pirofosfato (PP<sub>i</sub>).

Il distacco di pirofosfato e la sua successiva idrolisi forniscono l'energia necessaria per la polimerizzazione del DNA.



### DNA pol I

- Attività polimerasica (bassa: ~20 nucleotidi/s)
- Attività esonucleasica 3'→5'  
(rimuove errori nell'appaiamento delle basi)
- Attività esonucleasica 5'→3'  
(degrada le molecole di DNA e RNA filamento singolo)

In *E. coli* sono state identificate, nel tempo, 5 diverse polimerasi.

L'enzima identificato da Kornberg venne denominato **DNA polimerasi I (DNA pol I)**

Mutazioni nel **gene per DNA pol I** portarono ad ipotizzare che questo enzima non fosse la polimerasi principale nella cellule di *E. coli* → **DNA polimerasi III (DNA pol III)**.

La DNA polimerasi può iniziare la sintesi di una nuova catena di nucleotidi?  
La replicazione del DNA è di tipo continuo o discontinuo?

### Primosoma

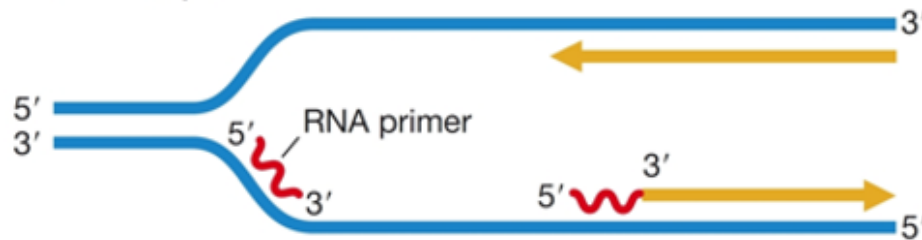
complesso di proteine contenente **PRIMASI**  
(attività RNA polimerasica 5'→3')



presiede alla sintesi di corte catene di RNA  
(~11 nucleotidi), **primer**, che si legano al  
DNA.

La replicazione del DNA può essere semidiscontinua

1. La primasi sintetizza brevi oligonucleotidi (primer) usando il DNA come stampo.



2. La DNA polimerasi III sintetizza il DNA iniziando all'estremità 3' del primer di RNA.



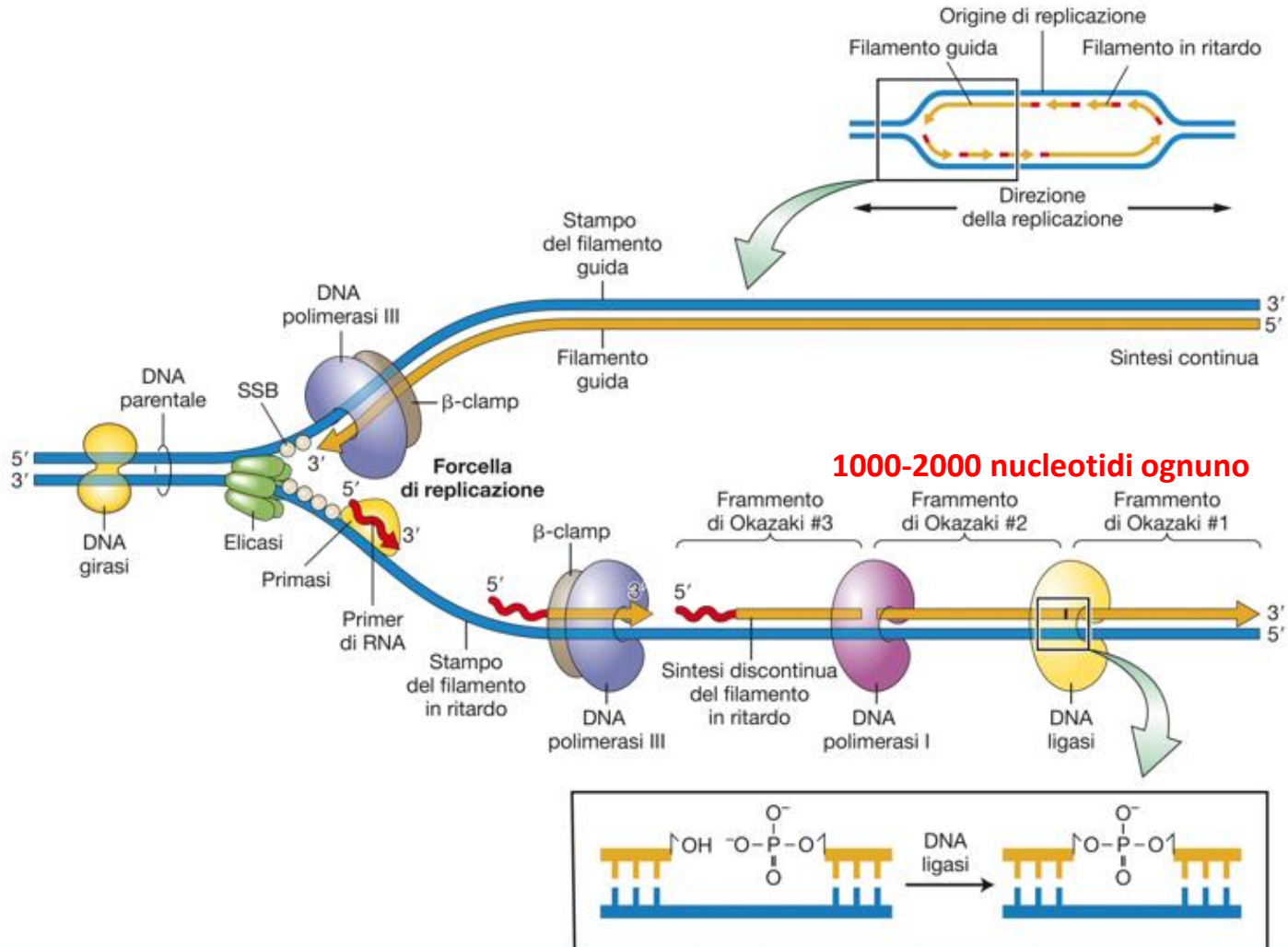
3. La DNA polimerasi I rimuove i primer e riempie gli spazi vuoti.



4. La DNA ligasi unisce i frammenti di DNA adiacenti.



## La replicazione del DNA coinvolge meccanismi filamento-specifici



**Polimerasi I e III hanno attività di proofreading**



**Elevata fedeltà nella replicazione → un errore ogni  $10^{10}$  nucleotidi**

**Esistono altri meccanismi di riparazione che intervengono nella riparazione del DNA.**

**E. coli**

**Possiede un genoma con ~5.000.000 di coppie di basi.**

**Si duplica in circa 40 minuti**



**Velocità di sintesi del DNA = ~2000 nucleotidi al secondo**

**L'attività proofreading elimina le basi male appaiate**

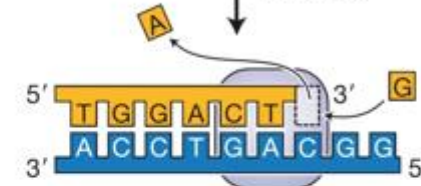
DNA polimerasi I e III



**Estensione:**  
base A non correttamente  
appaiata con C



**Correzione di bozze:**  
la base non correttamente  
appaiata viene individuata  
e rimossa



**Estensione:**  
viene aggiunta  
la base corretta G

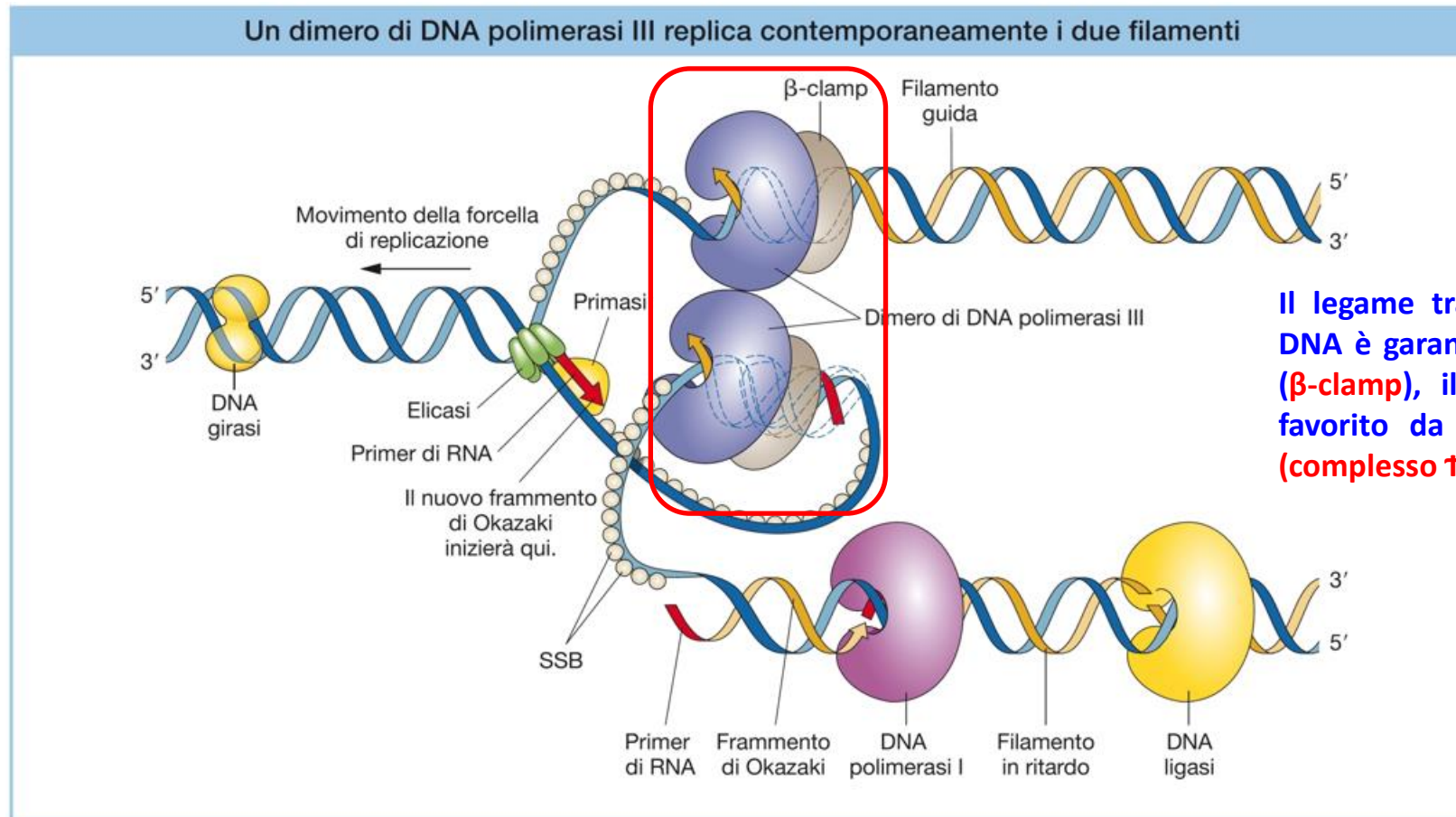


*E. coli* → velocità di sintesi del DNA = ~2000 nucleotidi al secondo

Malgrado la velocità nella replicazione, il REPLISOMA garantisce la correttezza dell'informazione!

Un complesso molecolare controlla la correttezza della replicazione.

In particolare, il replisoma, oltre ai due nuclei catalitici del dimero di DNA polimerasi III, contiene altre proteine che contribuiscono al processo di replicazione.



Il legame tra polimerasi e filamento di DNA è garantito da una **pinza scorrevole (β-clamp)**, il cui legame ai filamenti è favorito da un **applicatore della pinza (complesso τ)**.

## REPLICAZIONE DEL DNA NEGLI EUKARIOTI

- Cromosomi lineari
- Tempi di replicazione da pochi minuti a molte ore
- Coordinazione nel processo di replicazione tra tutti i cromosomi della cellula

Organismo modello per gli eucarioti più semplici  
*S. cerevisiae* (16 cromosomi)

Presenta diversi punti di origine della replicazione definiti **ARS**  
(sequenza di replicazione autonoma)



sequenze di 100-200 pb DNA ricche di coppie AT.

Negli eucarioti la replicazione inizia, contemporaneamente, in più punti del cromosoma.

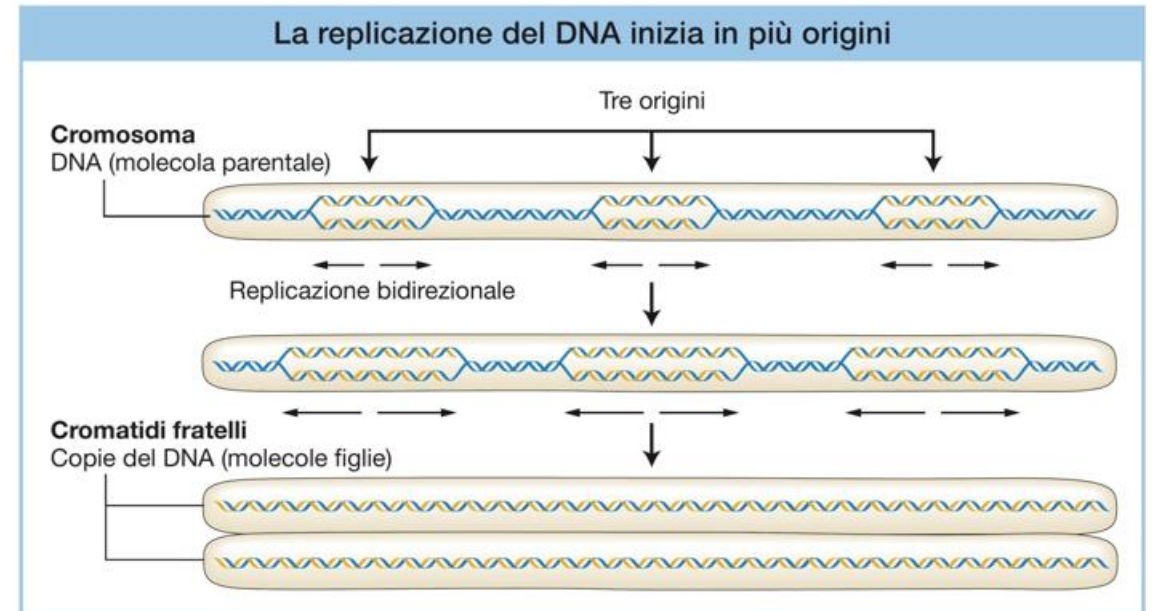
Nel lievito sono stati individuati, complessivamente, circa 400 punti di origine della replicazione da cui il processo procede in modo bidirezionale.



Accelerazione del processo di replicazione del DNA

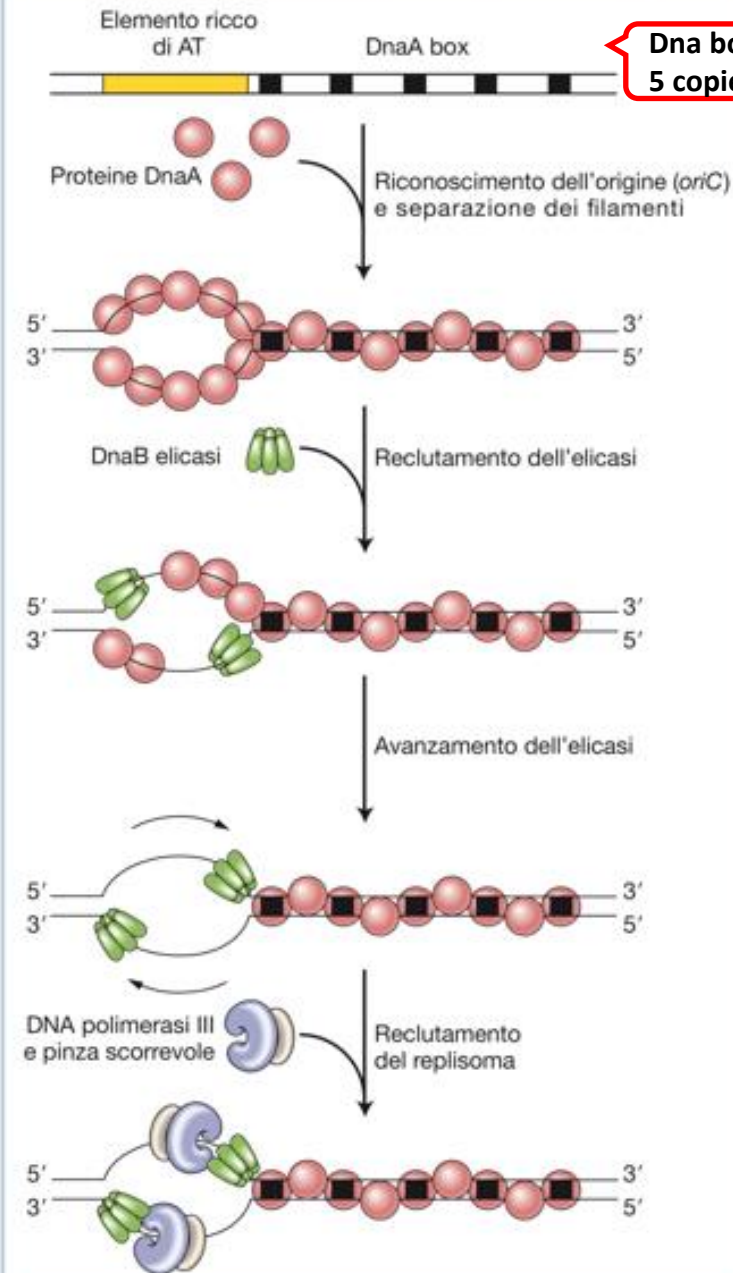
**Uomo** (eucariote superiore)

40.000-80.000 punti di origine della replicazione!





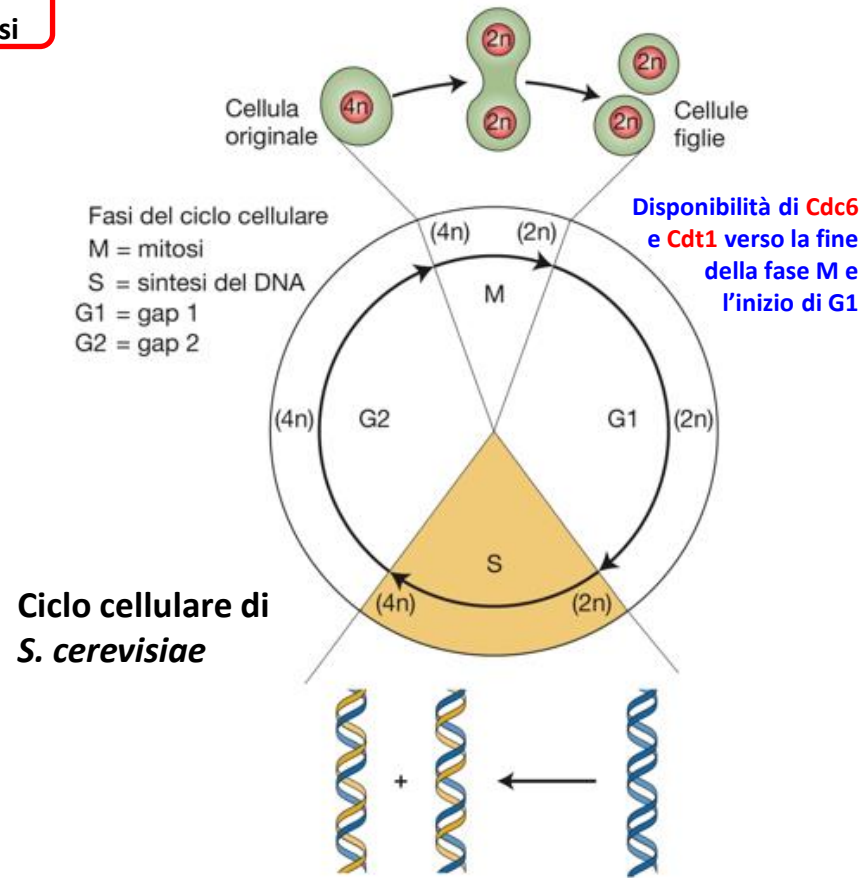
## Inizio della replicazione del DNA nei batteri



## REPLICAZIONE DEL DNA

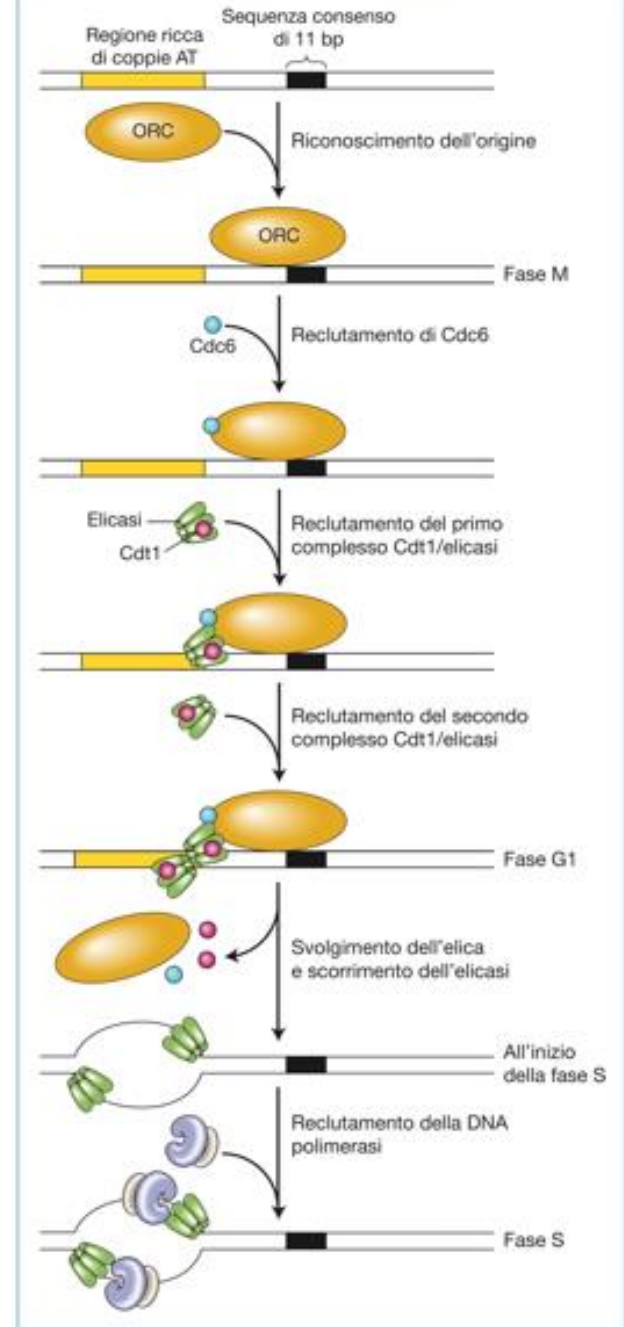
← PROCARIOTI

EUCARIOTI →



Per l'assemblaggio del replisoma, durante l'inizio della fase la fase S, è necessario il **complesso per il riconoscimento dell'origine (ORC)** che induce il richiamo di proteine **Cdc6** all'inizio della fase G1. Il **complesso ORC-Cdc6** recluta il complesso **Cdt1-elicasi**, che si lega al primo complesso legato ad **ARS** (origine della replicazione).

## L'inizio della replicazione negli eucarioti



Negli eucarioti superiori sono presenti **punti di origine della replicazione** simili al lievito, ma di lunghezza maggiore.

Sono, inoltre, presenti **proteine simili alle ORC** che si legano a **sequenze conservate** non ancora ben definite. Non sono state identificate sequenze specifiche da cui parte la replicazione.

L'interazione delle proteine simil-ORC con il DNA è facilitata da altri **complessi proteici che legano i cromosomi**. La loro interazione media l'assemblaggio del **replisoma**.

Problema relativo alla replicazione dei cromosomi lineari:

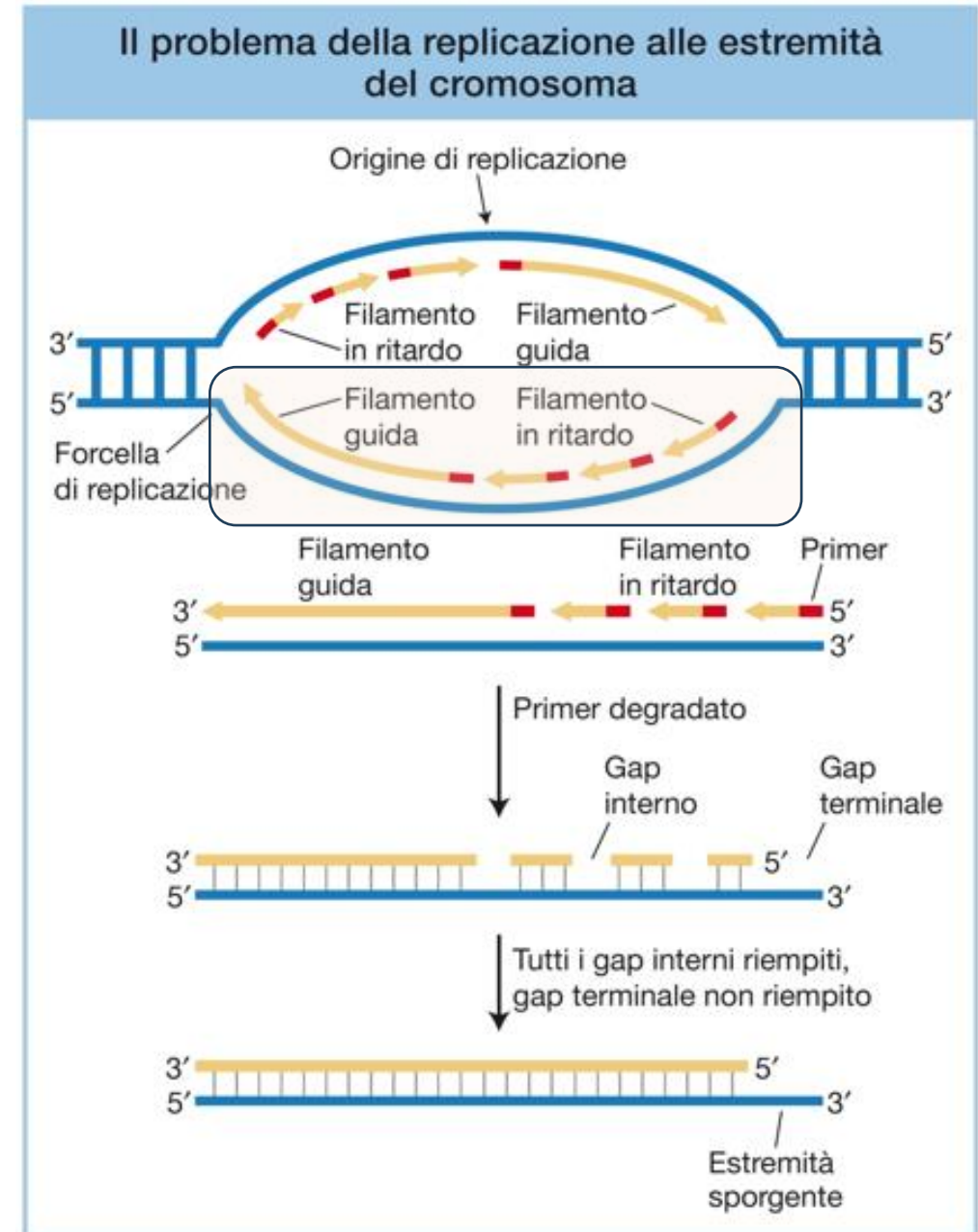
la sintesi del filamento in ritardo necessita di un **primer** a monte della sintesi.



Quando il primer dell'ultimo **frammento di Okazaki** viene rimosso vengono a mancare delle sequenze all'estremità del filamento neosintetizzato.

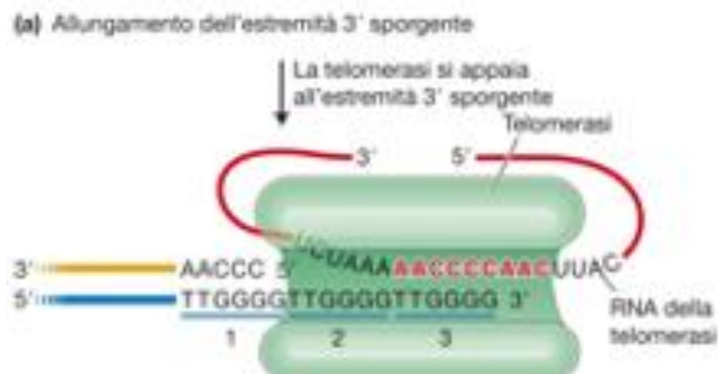


Ad ogni ciclo di replicazione il telomero si accorcerebbe sempre di più!



Gli eucarioti possiedono corte ripetizioni in tandem, non sempre identiche (specie-specifiche), alle estremità dei cromosomi.

Nell'uomo le estremità dei cromosomi sono costituite da 10-15 kb di **ripetizioni in tandem** della sequenza **TTAGGG**. Ad ogni ciclo di replicazione, le telomerasi aggiungono queste sequenze ripetute all'estremità 3' dei cromosomi.

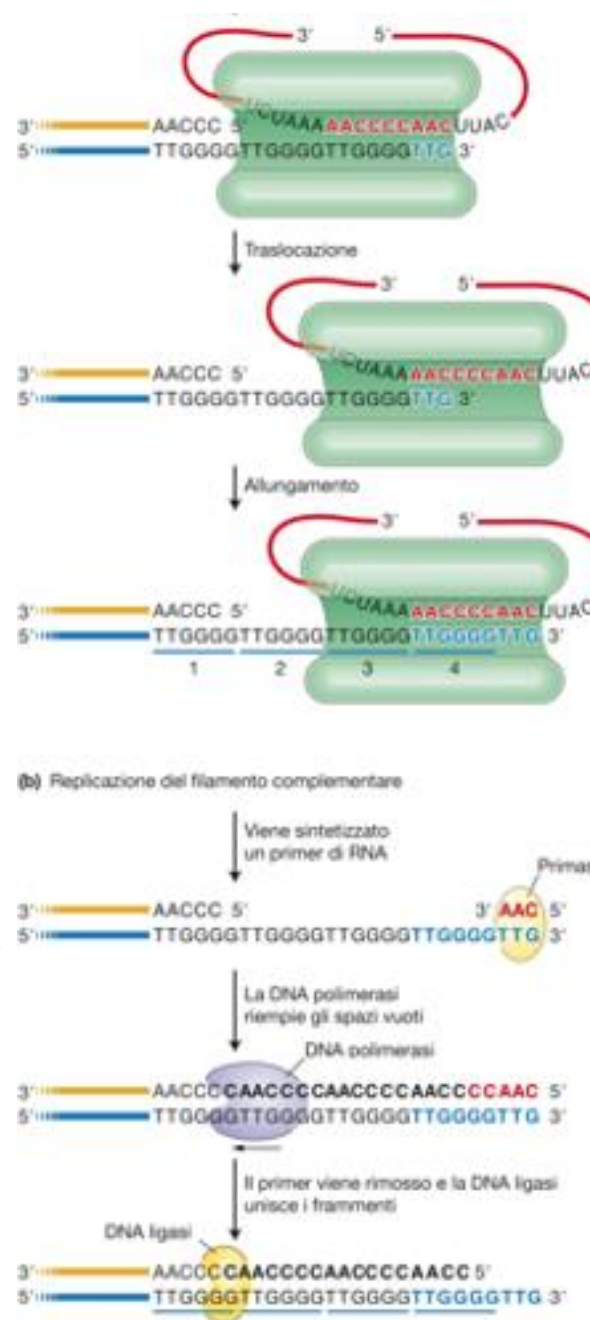


## TELOMERASI

Complesso ribonucleo-proteico (RNP) formato da **RNA** e **proteine**.

**Componente proteica** → **attività trascrittasi inversa!**

Nei **vertebrati**, una regione dell'RNA della telomerasi possiede la sequenza **3'-AAUCCC-5'** che funziona da **stampo** per la sintesi dell'unità ripetuta nei telomeri **5'-TTAGGG-3'**.



L'RNA della telomerasi si appaia con l'estremità di DNA sporgente in posizione 3', che viene poi estesa grazie alle due **componenti funzionali della telomerasi (RNA e trascrittasi inversa)**.

La **primasi** e la **DNA polimerasi** possono usare l'estremità sporgente a singolo filamento al 3' come stampo per sintetizzare il filamento di DNA complementare.

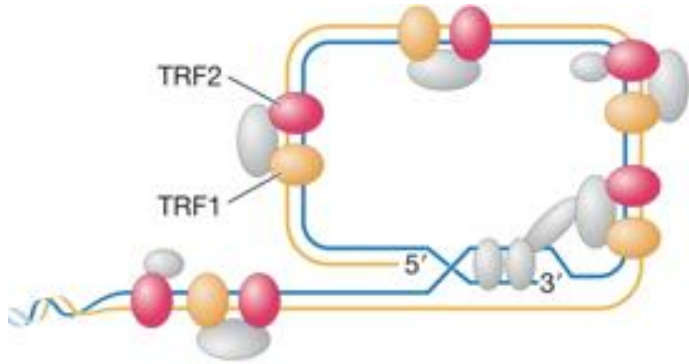
## TELOMERASI

Evita la perdita di materiale cromosomico durante la replicazione.

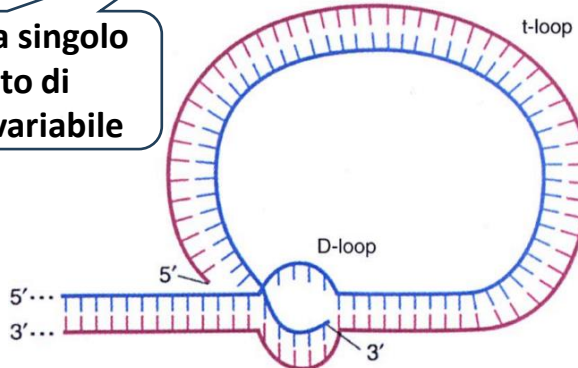
Preserva l'integrità cromosomica associandosi ad alcune **proteine** (**WRN, TRF1, TRF2, ...**) per formare una struttura protettiva.

Il DNA telomerico localizzato alla fine del cromosoma non è a doppio filamento, pertanto il DNA telomerico si ripiega all'indietro a formare una struttura protettiva (**loop telomerico** o **T-loop**)

I **T-loop** nascondono le estremità 3' a singolo filamento (fino a 100 nucleotidi), proteggendole dai sistemi di riparazione della cellula che potrebbero, erroneamente, riconoscerle come rotture a doppio filamento.



Sporgenza a singolo filamento di lunghezza variabile



Con la formazione del **T-loop**, l'estremità a singolo filamento si insinua tra le sequenze telomeriche a doppio filamento formando un **D-loop** (*displacement loop*).

Le **cellule germinali** possiedono un elevato numero di telomerasi.

Le **cellule somatiche**, con il tempo, perdono la capacità di produrre telomerasi!

I **cromosomi delle cellule somatiche**, ad ogni ciclo di replicazione diventano sempre più corti, fino a quando la cellula perde la capacità di dividersi (**senescenza, invecchiamento precoce**).

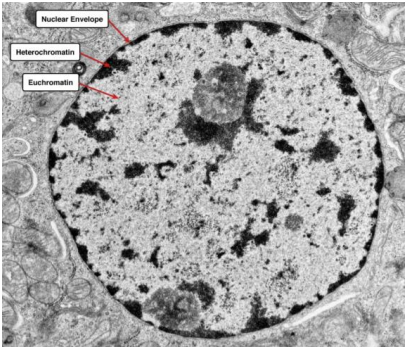
Accorciamento dei telomeri → invecchiamento

Conservazione attività telomerasica → sviluppo di cellule tumorali (80% delle cellule tumorali possiedono attività telomerasica).

# 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).



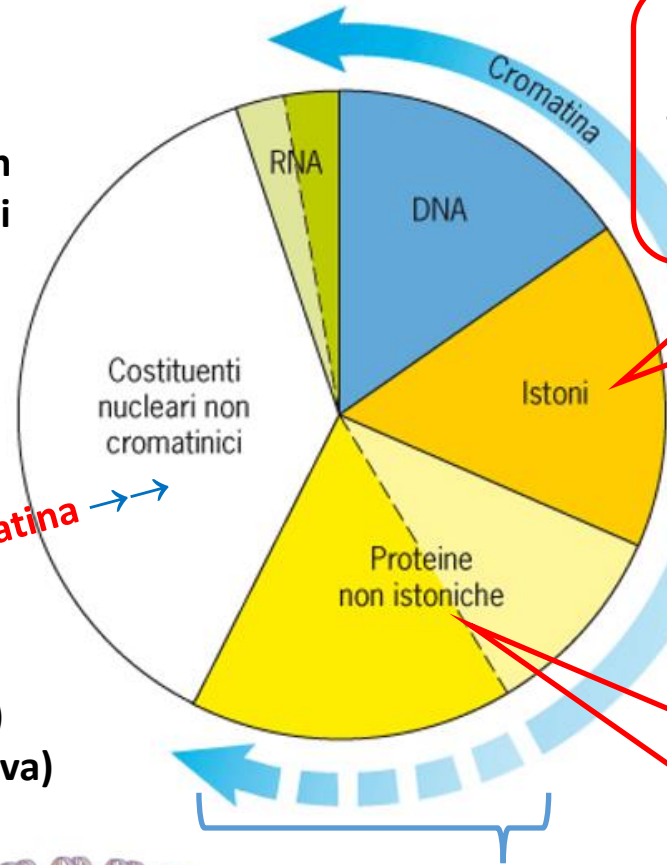
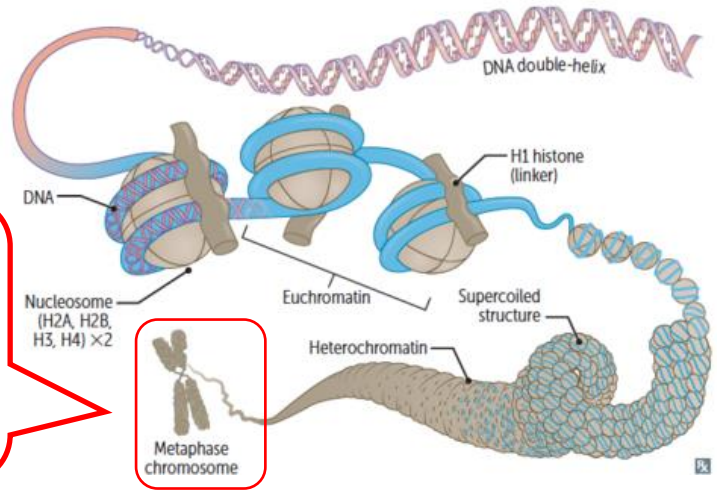
## CROMATINA

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

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

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

Chromatin structure



Data la loro carica positiva, gli istoni si legano al DNA e svolgono un ruolo fondamentale sia **strutturale (impacchettamento)** che **regolatorio** a livello della cromatina.

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

## Spermatozoi

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

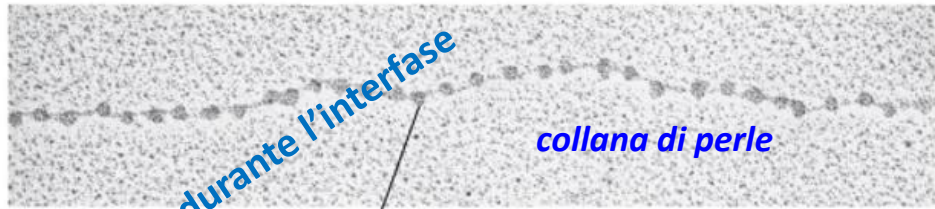
Potrebbero avere un ruolo nella regolazione dell'espressione di specifici geni, nella replicazione, nella trascrizione e nella riparazione del DNA.

Quantità variabili in funzione del tipo di cellula (anche nello stesso organismo) e dei metodi di estrazione delle proteine.

## Impacchettamento della molecola di DNA

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

Condensazione finale → circa  $10^4$  volte (10000)

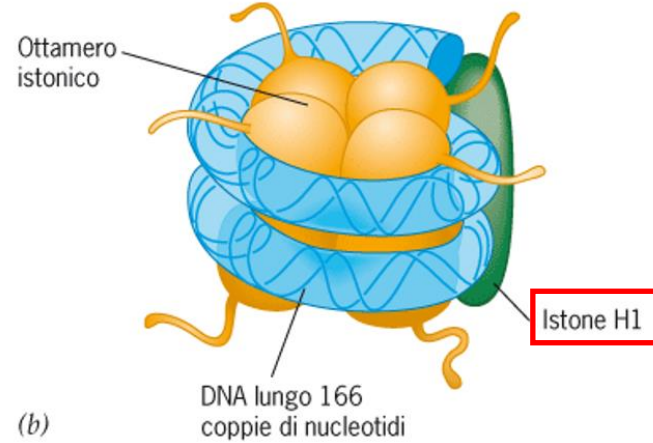


(a) Cromatina durante l'interfase



endonucleasi  
↓  
Digestione DNA linker

Nucleosoma completo



(b)

digestione prolungata con nucleasi

“Core” nucleosomico, 146 coppie di nucleotidi di DNA avvolte per un giro e  $\frac{3}{4}$  intorno a un ottamero istonico

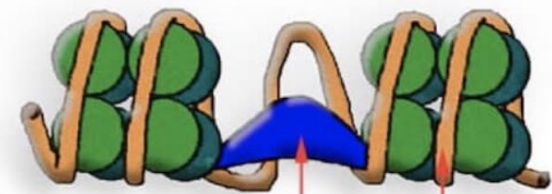
DNA linker, che varia in lunghezza da 8 a 114 coppie di nucleotidi

Si raggiunge un compattamento della molecola di DNA di circa 6 volte.

(b)

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

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

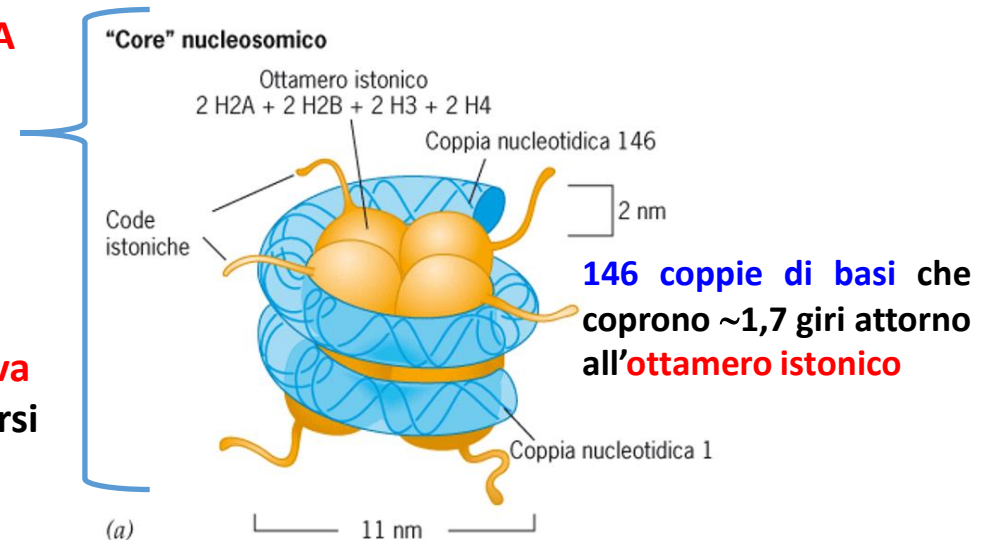


Ottamero istonico Istone H1 DNA

**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:

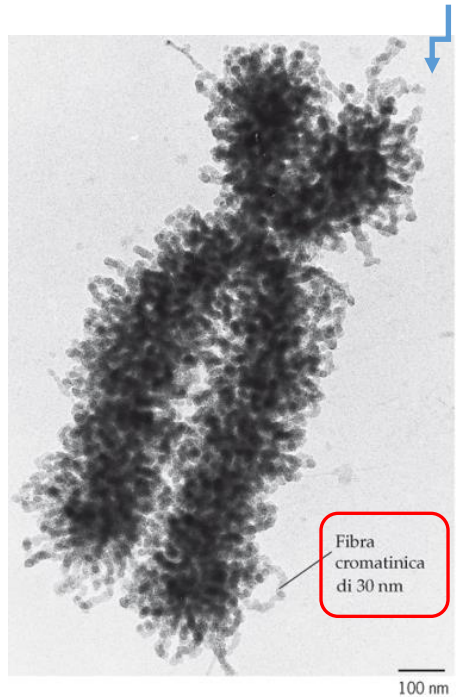
metilazione, acetilazione)



(a)

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)**

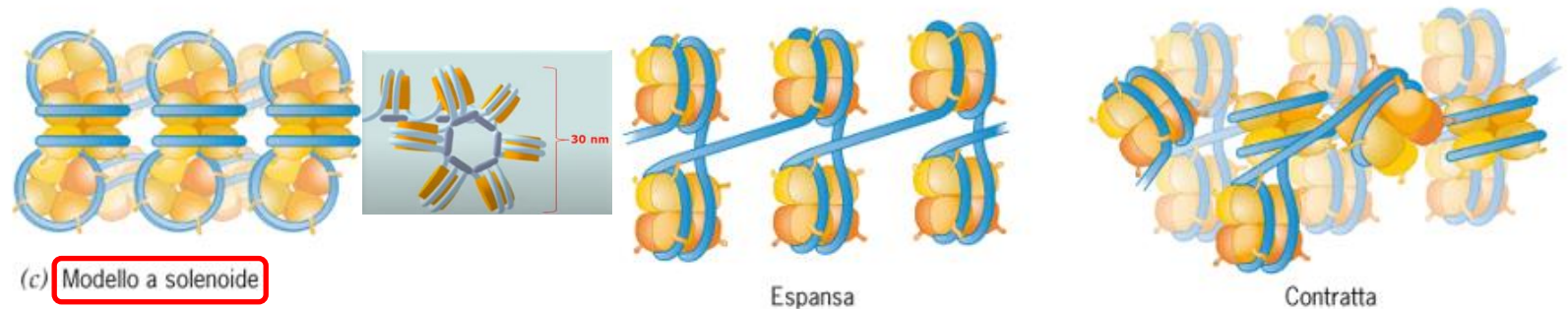
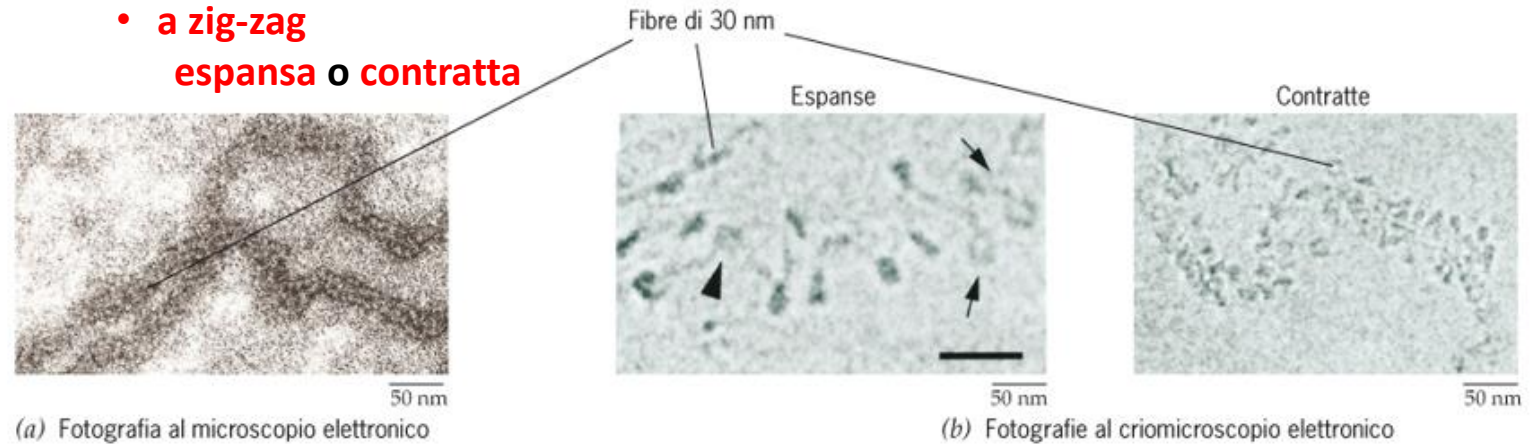


La **fibra di cromatina** ( $\varnothing$  30 nm) rappresenta l'unità strutturale di base del cromosoma metafasico.

### 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 **solenioide**
- a **zig-zag**  
**espansa o contratta**



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.

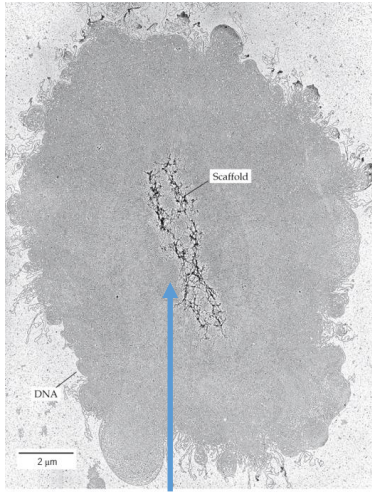
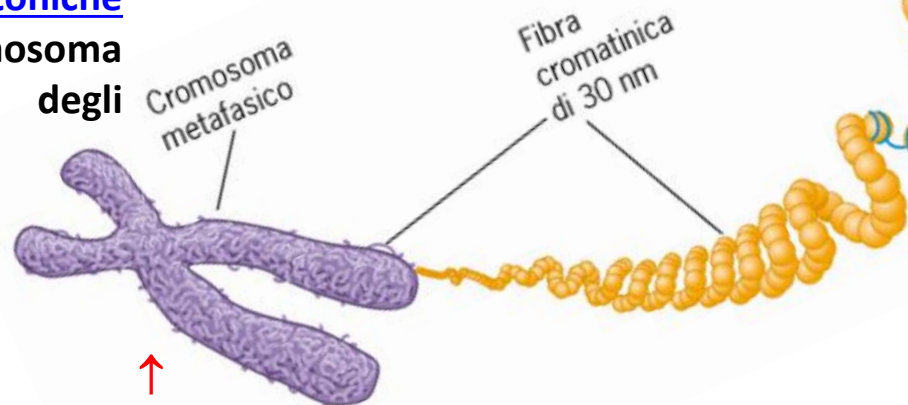


Immagine al m.e. dello **scaffold** (con forma ad x) di **proteine non istoniche** circondato da DNA in un cromosoma metafasico (dopo rimozione degli istoni).

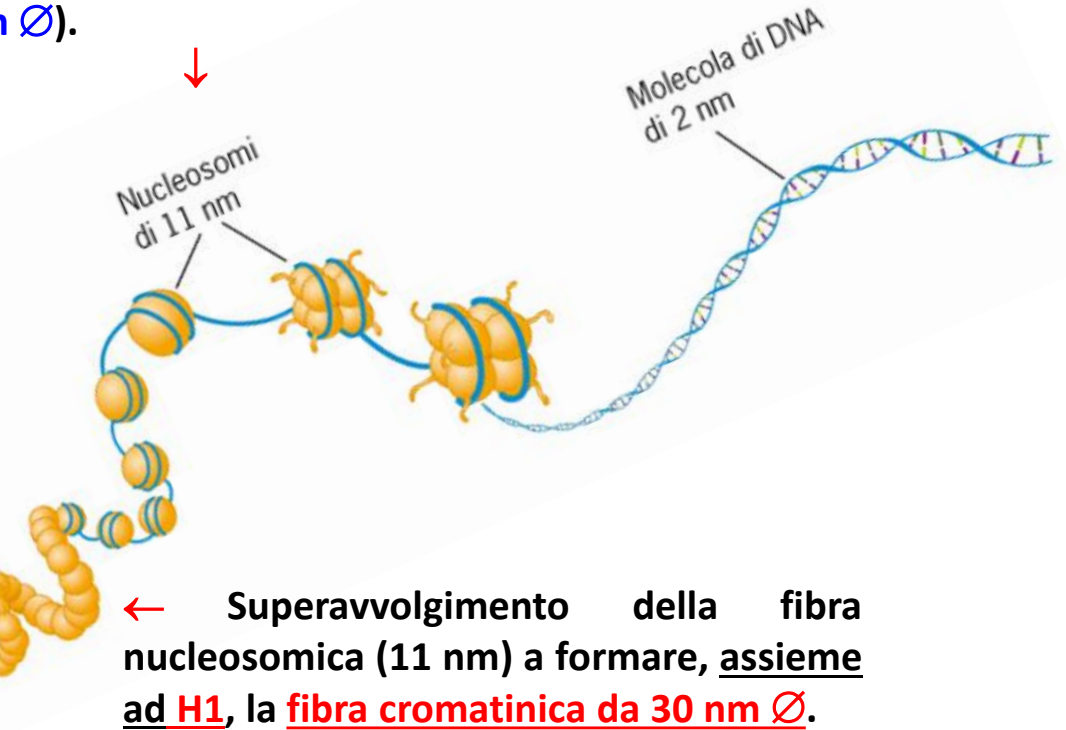


Formazione di uno **scaffold** di **proteine cromosomiche non istoniche** e condensazione della fibra cromatinica da 30 nm in una da **300 nm**, fino a formare i cromatidi del **cromosoma metafasico** con le caratteristiche anse superavvolte ed i cromatidi da **700 nm**.

## LIVELLI DI CONDENSAZIONE DEL DNA

### 3 principali livelli di condensazione

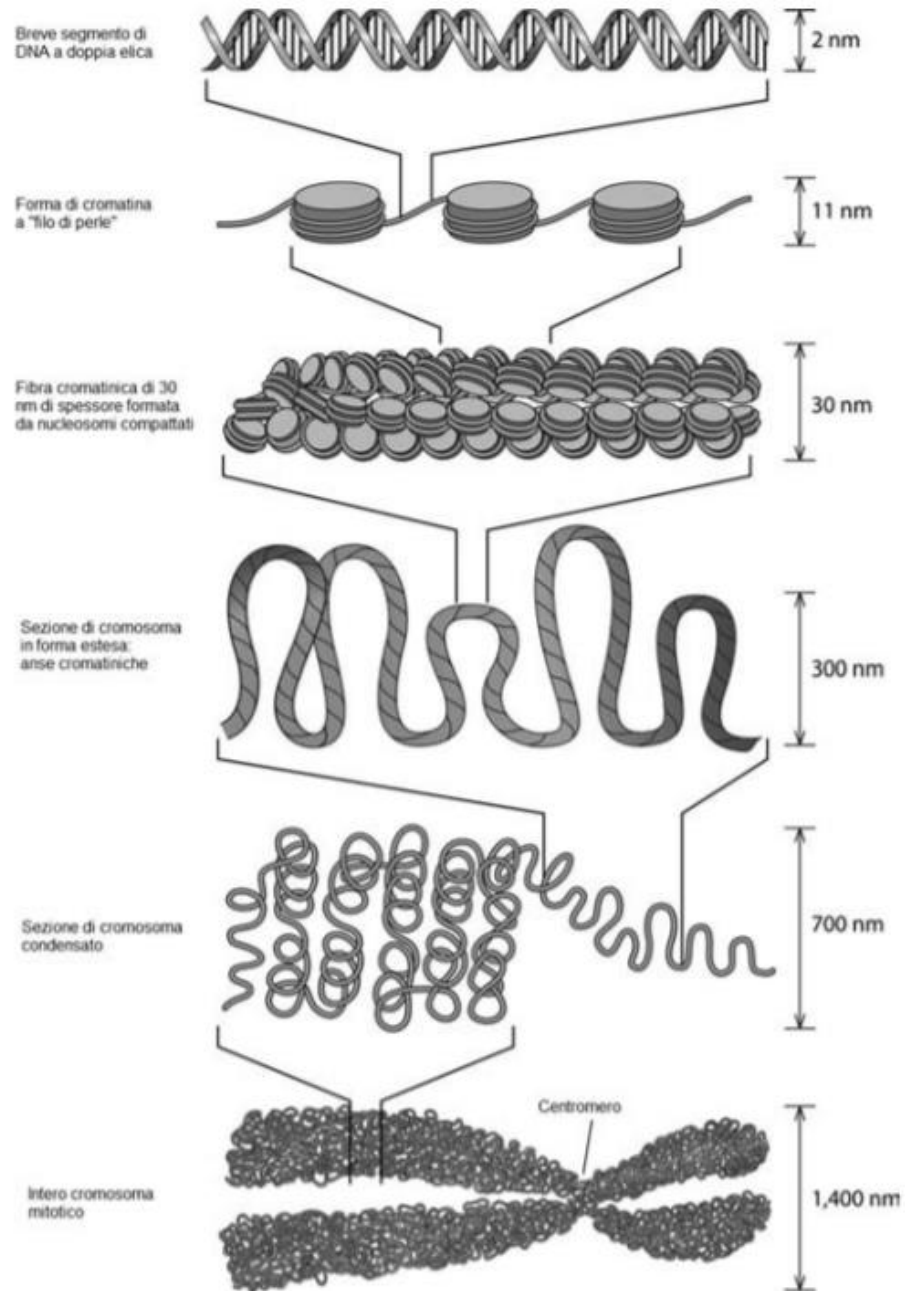
Superavvolgimento della molecola di DNA (2 nm) che, assieme ad H2A, H2B, H3 ed H4, formano la **fibra nucleosomica (fibra cromatinica interfascia da 11 nm Ø)**.



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

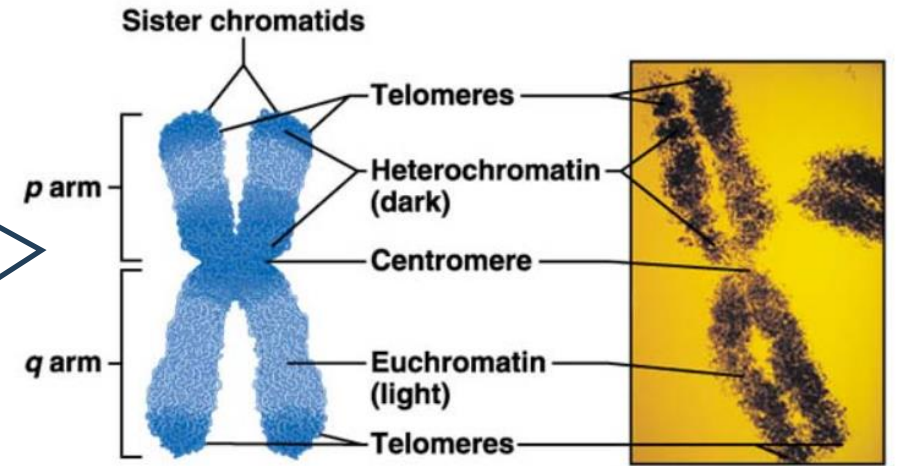
Le diverse regioni del cromosoma sono **strutture dinamiche**, che si srotolano e si ricompattano in risposta **meccanismi epigenetici** che controllano l'attività trascrizionale.





## ← Livelli di organizzazione del DNA

Colorazione cromatina con coloranti basici (ematossilina, blu di metilene, safranina, fucsina basica, ...)



### Eucromatina

Regioni del cromosoma che vanno incontro a cicli di condensazione decondensazione nel corso del ciclo cellulare.

- È attivamente trascritta (→ espressione dei geni).
- Non contiene sequenze ripetute.

### Eterocromatina

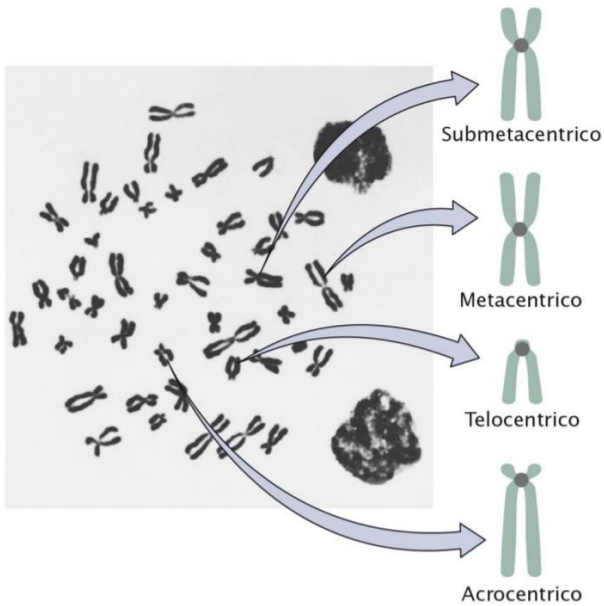
Regioni del cromosoma trascrizionalmente inattive

#### Eterocromatina costitutiva

Presente in tutte le cellule di un organismo, in entrambi i cromosomi omologhi e nella stessa posizione.

#### Eterocromatina facoltativa

Presente in parti variabili dei cromosomi, anche nell'ambito di cromosomi omologhi, a seconda del tipo cellulare, della fase di sviluppo, etc.  
*Corpo di Barr*



## CENTROMERO

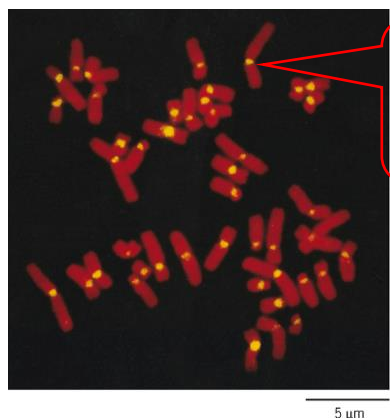
Durante l'**anafase**, il centromero consente il legame dei cromosomi ai **microtubuli** per una corretta distribuzione tra le cellule figlie.

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

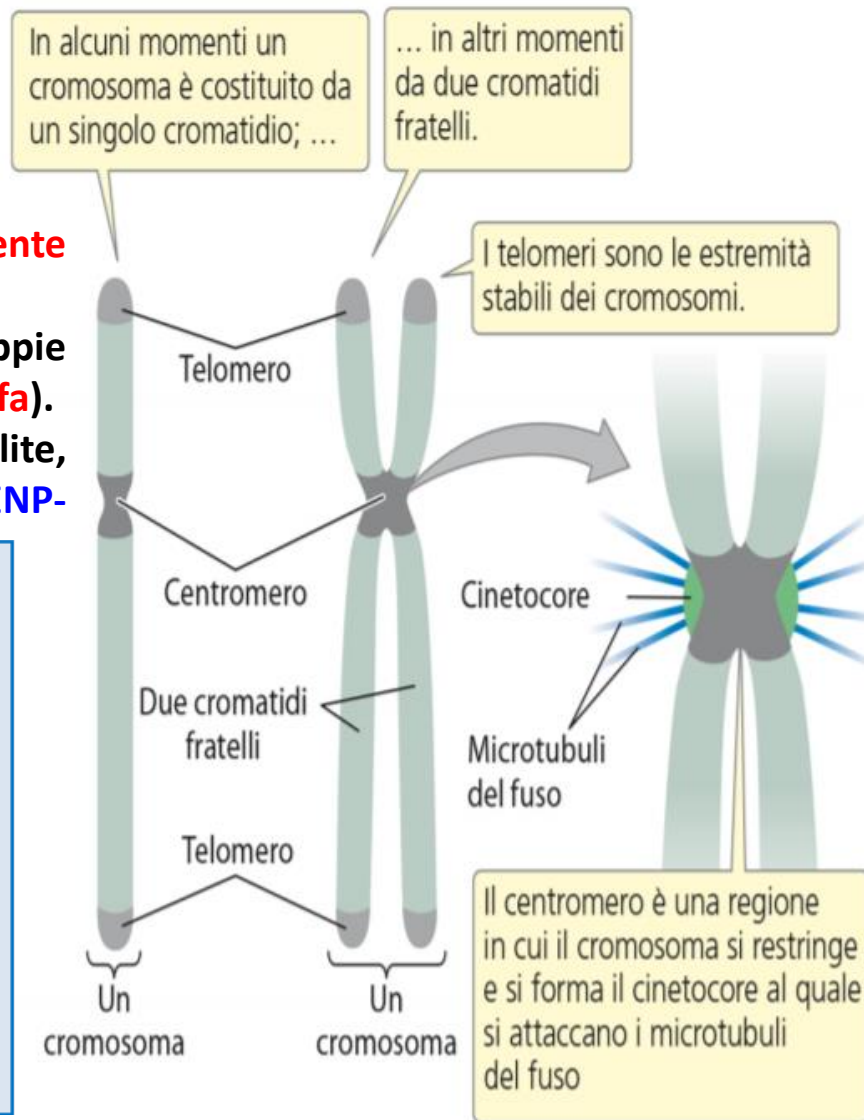
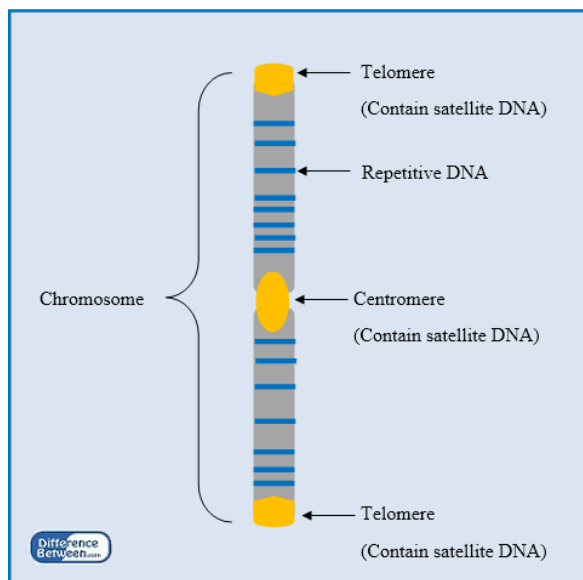
I centromeri contengono **sequenze di DNA altamente ripetute** (fino a migliaia copie), spesso in tandem.

I **centromeri umani** possiedono una sequenza di 171 coppie di basi ripetute 5.000-15.000 volte (**sequenze satelliti alfa**).

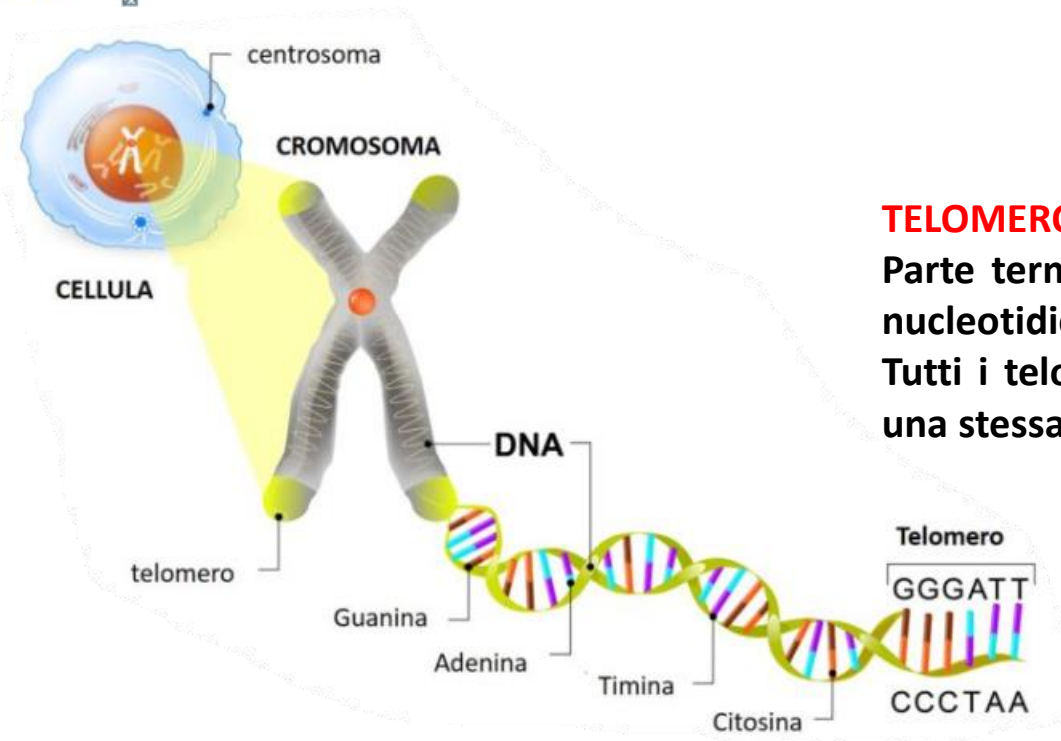
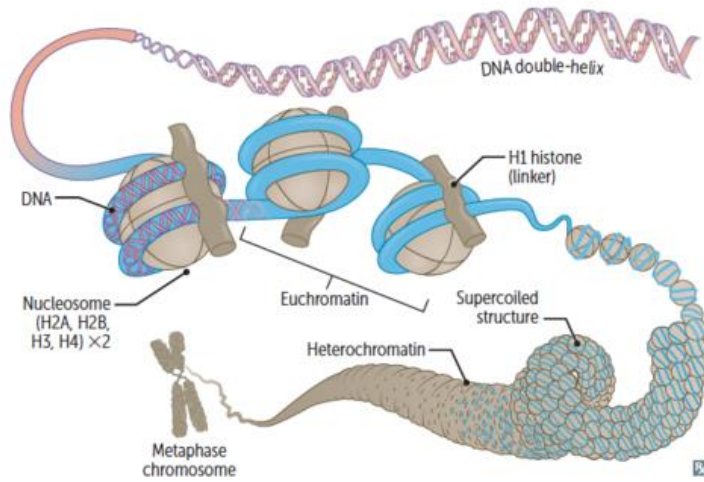
Il **cromosoma X** umano, all'interno del DNA satellite, possiede siti di legame per la proteina centromerica (**CENP-B box**).



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

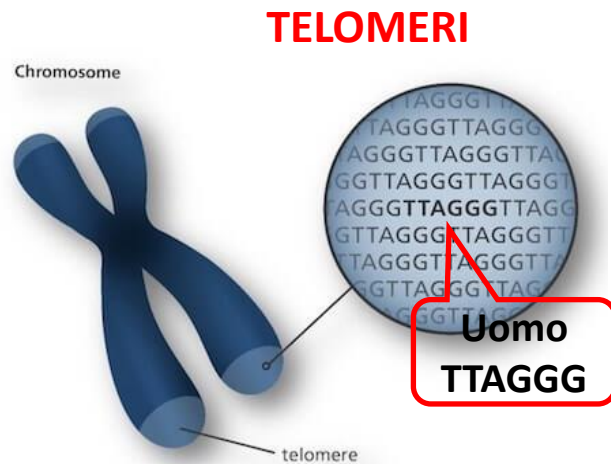


## Chromatin structure



## TELOMERO

Parte terminale del cromosoma con sequenze nucleotidiche ripetute specie-specifiche. Tutti i telomeri di una data specie presentano una stessa sequenza.



## 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**

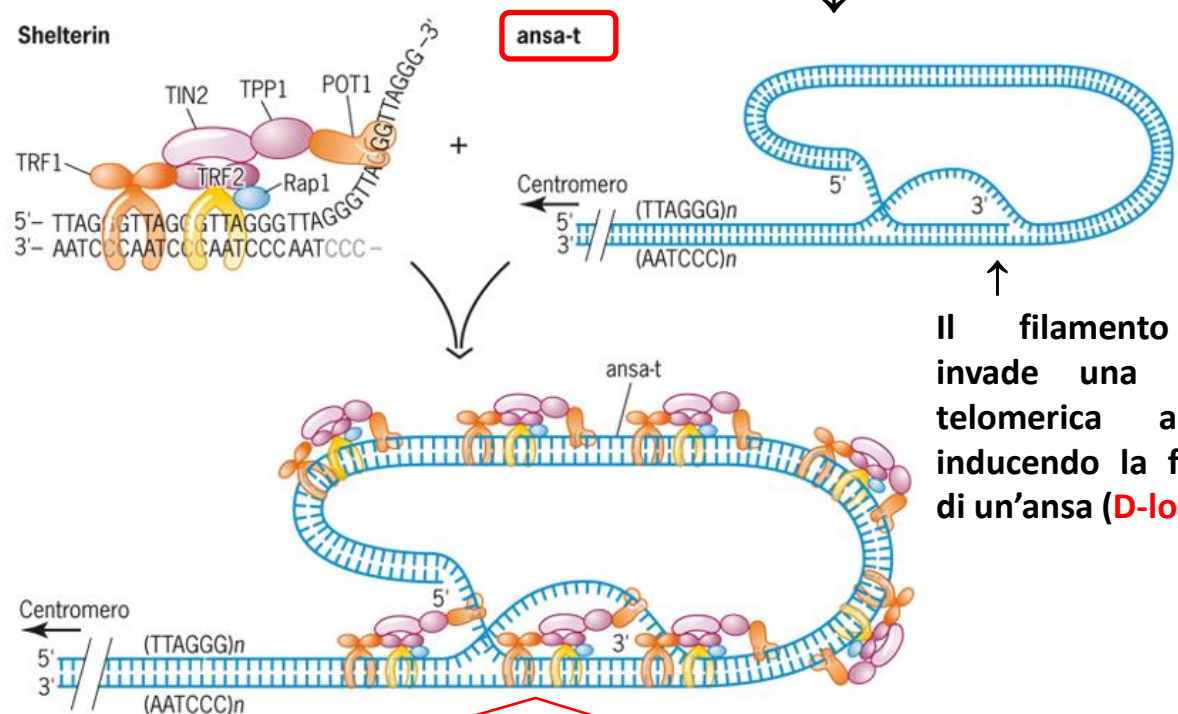
500-3000 ripetizioni della sequenza **5'-TTAGGG-3'**

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 monte e si appaia con il filamento complementare, fino a formare una struttura definita **ansa-T (T-loop)**.



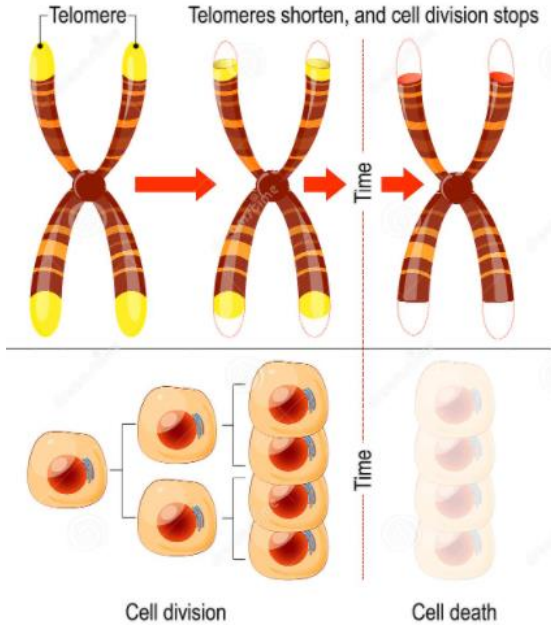
Il **filamento singolo** invade una ripetizione telomerica a monte, inducendo la formazione di un'ansa (**D-loop**).

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

**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

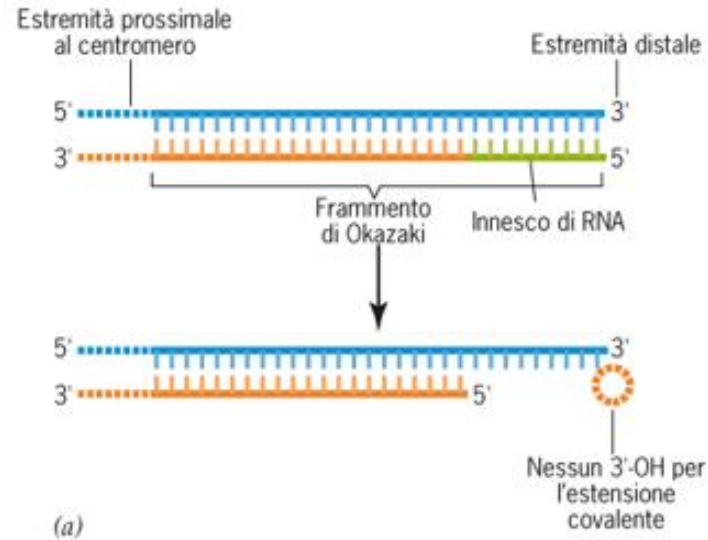
Con l'avanzare dell'età, nelle cellule somatiche, a causa della perdita di frammenti di telomeri i cromosomi si accorciano gradualmente.



Senescenza

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

Il problema dell'innescò del telomero sul filamento lento.

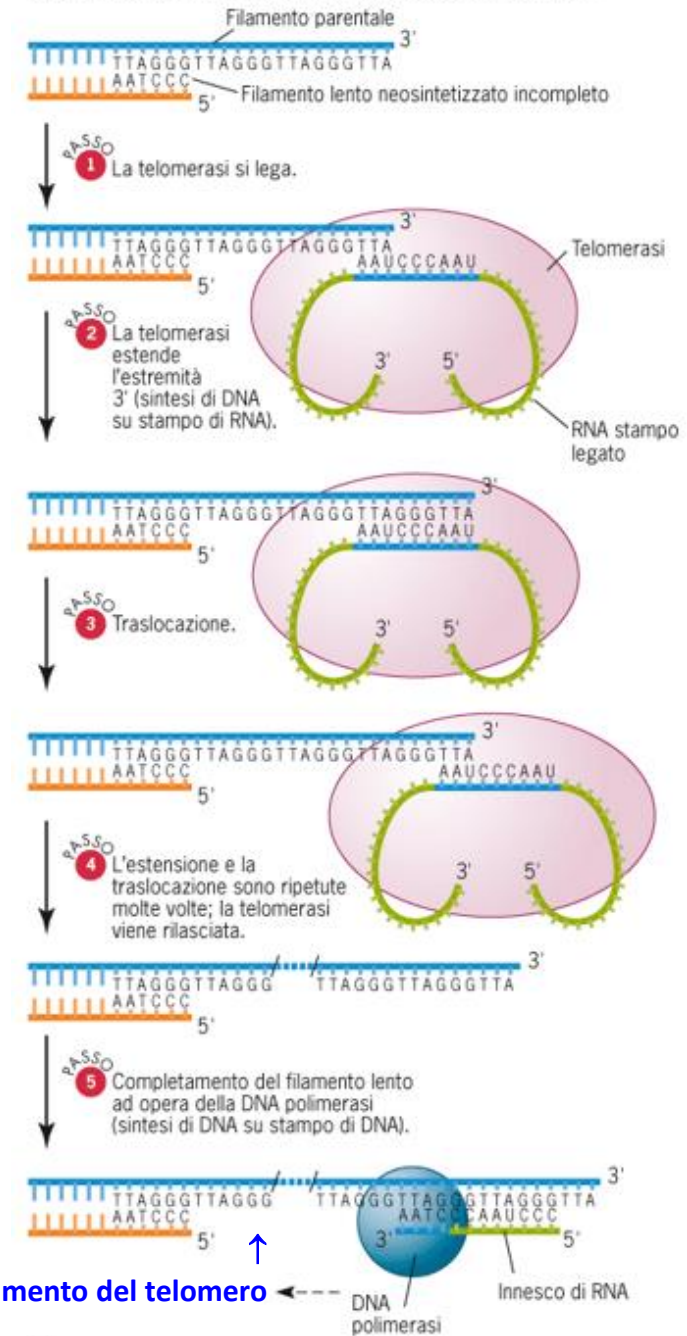


Esistono degli enzimi (**telomerasi**) che aggiungono brevi sequenze ripetitive all'estremità 3' del DNA.

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.

La telomerasi risolve il problema dell'innescò terminale.



Allungamento del telomero

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

↓  
**DNA ripetitivo (15-80%)**

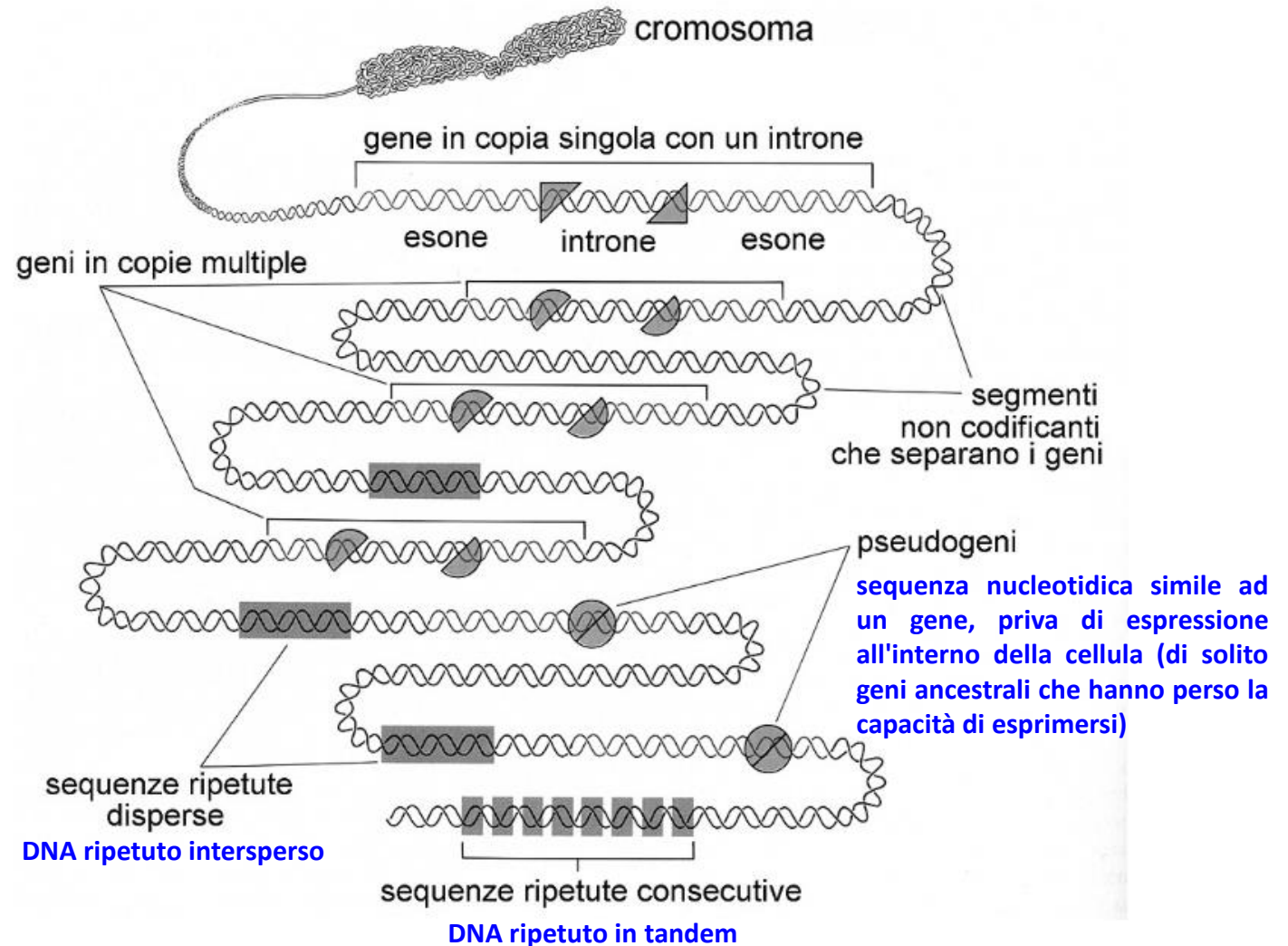
Quando frammenti di DNA genomico vengono separati su un gradiente di densità, oltre alla comparsa di una banda principale, si formano bande minori (**bande satelliti** → **DNA satellite**).

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

- **Sequenze di DNA altamente ripetute non vengono trascritte** (→ **non codificano proteine**).
- **Sequenze di DNA moderatamente 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 (trasposoni)** 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.**

## La sindrome di Werner causa invecchiamento precoce



**Figura 10.33** ► John Tacket, 15 anni, di Bay City, Michigan, mentre descrive la sua malattia, la progeria, nel corso di una conferenza stampa a Washington, tenutasi il 16 Aprile 2003, per annunciare la scoperta di un gene che causa questa condizione genetica rara e fatale, caratterizzata da invecchiamento precoce. A destra, il Dott. Francis Collins, direttore del National Human Genome Research Institute.



## 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.