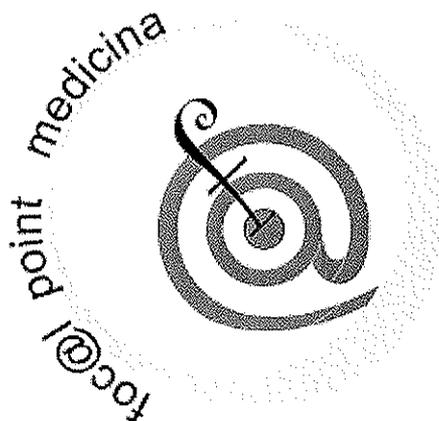


UNIVERSITA' degli STUDI di ROMA
TOR VERGATA

ODONTOIATRIA

Biologia



Adele Riccia

Biologia

Lezione I (18/01/01)

10 E

Biologia significa parlare della vita; dobbiamo quindi parlare del "vivente". Ma prima di parlare di vivente dobbiamo definirlo. Oggi può sembrare banale darne una definizione ma non lo è se si pensa che nei secoli passati si è ampiamente discusso sulla definizione di questo termine. Le discussioni, passate per diversi livelli, incluso quello filosofico, sono poi dovute rientrare su un livello più scientifico (vedremo che il metodo biologico coincide con un metodo scientifico). Pertanto, si sono dovute dare ai viventi delle caratteristiche che fossero facilmente riconoscibili e che permettessero senza ombra di dubbio di distinguere un vivente da un NON vivente. La sensazione "epidermica" di riconoscere un "cosa" da un "chi" non prescinde dalla necessità di poter stabilire senza dubbio se un essere è un vivente o meno secondo i nostri canoni. Ci sono quindi delle caratteristiche che sono tipiche del vivente: una di queste è l'organizzazione cellulare (termine dal quale deriva poi il termine organismo). non è un caso che quando si parla di organismo si parla di vivente; non è un caso che si parli di chimica organica come di quella branca che studia certe molecole che si ritrovano poi nella cellula, nei viventi. Quindi, una delle prime asserzioni che si possono fare è che alla base della vita c'è l'organizzazione cellulare. Da qui è partita tutta una teoria cellulare che si basa sul fatto che vi sia nel vivente una cellula, che la cellula sia circondata da una membrana che in qualche modo protegge dall'ambiente esterno ma permette anche la comunicazione con l'ambiente esterno, che questa membrana circoscriva un ambiente nel quale avvengono determinate reazioni biochimiche e dove vi sia del materiale particolare che porti l'informazione per tutta la vita della cellula stessa. Riguardo all'organizzazione cellulare, i viventi non sono tutti uguali: riguardo alla struttura della cellula possiamo distinguere i procarioti e gli eucarioti. Letteralmente, procariote significa "nucleo primitivo" ed eucariote "nucleo ben definito". Di fatto, le differenze tra queste due categorie non si fermano alla presenza di un nucleo: infatti nei procarioti mancano tutte le membrane interne cioè, all'interno di queste cellule non ci sono compartimenti ulteriori, non sono presenti divisioni, oltre quella data dalla membrana plasmatica. Negli eucarioti, invece, ci sono dei compartimenti all'interno della cellula e, tra i tanti, compartimenti specializzati che portano al meglio l'efficienza della cellula, c'è anche il nucleo che è uno dei tanti compartimenti strutturali e funzionali della cellula eucariote. Un'altra suddivisione che è facilmente individuabile negli organismi non è più a livello di struttura di singola cellula ma riguarda l'organismo in toto. Tra i viventi infatti sono rappresentati organismi unicellulari, ovvero tutto il loro corpo è costituito da un'unica cellula che è in grado di svolgere tutte le funzioni e ci sono organismi pluricellulari, con quantità maggiori di cellule (da poche decine a milioni) le quali sono, a seconda dell'evoluzione dell'organismo, più o meno specializzate a formare dei tessuti, poi degli organi, degli apparati e quindi a formare l'intero organismo. Questa organizzazione dell'organismo rispecchia poi diverse branche di studio: lo studio della cellula è appannaggio della biologia, l'organizzazione dei tessuti è argomento dell'istologia, gli organi e gli apparati sono argomento dell'anatomia.

In tutto questo va sottolineato che non esiste cellula se non c'è membrana plasmatica (tutte le cellule hanno la membrana) e poiché abbiamo detto che non c'è vivente se non c'è cellula, per assioma non c'è vivente se non c'è membrana. Pertanto, i VIRUS rappresentano una categoria a sé che non rientra in nessun Regno e tra i viventi possiamo definirli entità biologiche, ed il motivo fondamentale è che mancano di organizzazione cellulare perché mancano di membrana.

Un'altra caratteristica dei viventi è quella del metabolismo.

Definizione: lo scambio di materia e di energia che la cellula effettua con l'ambiente esterno.

Più propriamente non c'è uno scambio di energia ma un flusso di energia che va dal sole agli organismi. Parlando di metabolismo si identificano due momenti:

- uno **costruttivo**, in cui gli organismi costruiscono molecole, detto **ANABOLISMO**, che consuma energia per la formazione dei legami (condensazioni). In pratica uniamo tra loro piccole molecole o atomi per formare molecole più complesse, si formano dei legami fornendo energia;
- l'altro momento è il **CATABOLISMO** che è la fase di degradazione delle molecole. In questa fase abbiamo un recupero dell'energia che prima avevamo consumato e che era stata immagazzinata nei legami.

Anche in termini metabolici gli organismi non sono tutti uguali e per quel che riguarda l'anabolismo dobbiamo distinguere tra organismi **AUTOTROFI** ed **ETEROTROFI** e cioè tra organismi completamente autonomi nel costruire queste molecole ed organismi che non lo sono.

Ciò significa che anche se un organismo è capace di costruire una certa molecola, per esempio le proteine (uomo), in questa costruzione non è autonomo cioè ha bisogno di alcune sostanze, gli aminoacidi, che vengono dall'alimentazione. Per questo motivo l'uomo non è autonomo ma è un eterotrofo. Quindi essere eterotrofi non sempre vuol dire non essere capaci di costruire molecole ma vuol dire sempre non essere autonomi nel costruirle (l'uomo non sa costruire glucidi in nessun caso).

Quando invece parliamo di catabolismo, i viventi hanno un altro tipo di suddivisione che riguarda il modo in cui la degradazione delle molecole va avanti. Parlando di degradazione di molecole, in genere si parla di **ossidazione**. Questa ossidazione di molecole può avvenire in **presenza di ossigeno** ed allora è completa, molto vantaggiosa per l'organismo e riguarda gli organismi **aerobi** che sono gli organismi in grado di vivere in presenza di ossigeno.

L'ossidazione può essere anche incompleta, cioè avvenire in assenza di ossigeno e riguarda gli organismi che non possono vivere in presenza di questo elemento. Tali organismi sono gli **ANAEROBI**. {Un organismo può essere anaerobio e eterotrofo o anaerobio e autotrofo ed un eterotrofo può essere sia aerobio sia anaerobio.}

Un'altra caratteristica è l'**eccitabilità** cioè la capacità di rispondere agli stimoli esterni: una pianta è sessile, cioè non riesce a traslocare, non si sposta, ma risponde agli stimoli (es. girasole che orienta la corolla in direzione del sole, l'allungamento di un ramo dove c'è il sole o lo spostarsi delle radici dove c'è maggior nutrimento; le piante da questo punto di vista sono un continuo

rispondere agli stimoli). Anche i batteri, esseri unicellulari molto semplici, si spostano verso la fonte di sostentamento. Quindi, la risposta agli stimoli è presente in tutti i viventi. ←

Ultima delle caratteristiche principali distintive dei viventi è la RIPRODUZIONE che può essere asessuata o sessuata. Definizioni:

- *asessuata* non prevede la fusione di cellule diverse cioè non prevede quella che normalmente prende il nome di fecondazione;
- *sessuata* ha alla base la fusione di cellule diverse. Questa fusione di cellule può avvenire anche in ambiente extracorporeo, cioè non ha nulla a che vedere con l'accoppiamento (pesce: in questo caso è possibile perché la riproduzione avviene nell'acqua che trasporta i gameti gli uni verso gli altri).

Quando la vita è uscita dall'acqua, la riproduzione si è dovuta attuare con altri sistemi: per le piante si effettua tramite impollinazione (o la presenza di entrambi i sessi) e per gli animali, dotati di capacità di traslocazione, tramite l'accoppiamento che è un modo di assicurare la fecondazione intracorporea con minor rischio di perdere gameti, di perdere progenie. In termini evolutivisti si è assistito ad una affermazione della riproduzione sessuata perché la fusione di due cellule diverse fra loro permette di fondere informazioni diverse, di caratteristiche diverse.

Infatti, nelle cellule è presente il DNA e gli organismi che si riproducono per via *asessuata* trasmettono alla progenie sempre un solo programma, sempre lo stesso. Ciò porta allo svantaggio che se varia la situazione ambientale in cui quell'organismo vive, si corre il rischio che tutti gli organismi presenti soccombano perché non sono in grado di adattarsi al nuovo habitat.

È invece un grosso vantaggio della specie quella di avere individui tutti diversi tra loro con caratteristiche differenti che possano fare fronte ai cambiamenti ambientali e, soprattutto, avere figli che garantiscano il mantenimento della specie. Quindi, l'importanza di una caratteristica è legata non solo alla sua importanza ma anche alla *capacità di trasmetterla* (per es., il mulo deriva dall'unione di un asino con una cavalla, è un ibrido ed è sterile senza possibilità di trasmissione delle proprie caratteristiche alla progenie). Quindi le caratteristiche che possono essere selezionate hanno valore in quanto possono essere trasmesse.

Tornando alla riproduzione sessuata, la sua importanza deriva dal fatto di fondere insieme due programmi che a loro volta derivano da altri due programmi (genitori) e così via. Perciò ognuno di noi è il risultato di un tale miscuglio di materiale genetico, tanto da essere impossibile che un fratello sia uguale ad un altro fratello tranne che nel caso dei gemelli monovulari.

Quindi, ogni specie che si riproduca in questo modo si assicura un'ampia diversità che può garantirle di sopravvivere ad eventuali cambiamenti ambientali drastici.

{ REGNI }

Vedi appunti.

Lezione 2 (23/01/01)

Legami chimici

Un atomo è costituito da protoni ed elettroni, oltre che da neutroni che sono nel nucleo insieme ai protoni. Protoni ed elettroni hanno cariche diverse e normalmente sono in uguale quantità per cui l'atomo è neutro (stesso numero di protoni ed elettroni). I protoni si trovano nel nucleo mentre gli elettroni occupano le orbite esterne; più un elettrone è vicino al nucleo, maggiore è la forza con la quale viene tenuto dall'atomo. In realtà, ~~tutti i processi chimici sono dovuti proprio ai rapporti che intercorrono fra gli elettroni ed i vari atomi, cioè dalla capacità che hanno gli elettroni di formare legami di spostarsi, di localizzarsi su altre orbite e così via.~~ Tutti i rapporti fra atomi, i legami fra atomi, sono dovuti proprio alla capacità degli elettroni di dare origine a dei legami.

Perché dobbiamo parlare di legami? Perché durante questo corso parleremo di molecole complesse e inevitabilmente parleremo di legami tra atomi ed a volte anche di reazioni chimiche. Per esempio arriverà un momento in cui dovremo parlare di ossidazione riduzioni perciò dobbiamo avere una minima cognizione di quello che accade nei rapporti tra atomi e, in particolare, nei legami chimici.

~~ci sono dei concetti che non possiamo fare a meno di nominare:~~

- 1) ~~più un elettrone è vicino al nucleo, più forma un legame stabile e staccare questo elettrone dall'atomo è più difficile (occorre una maggiore energia),~~
- 2) ~~l'elettronegatività è una condizione per la quale un atomo ha la capacità di attirare su di sé elettroni. Questa definizione, seppur generica, è importantissima per la biologia perché vedremo che l'elettronegatività dà origine ad un tipo particolare di legame che è il legame idrogeno che è importantissimo per la biologia in quanto si ritrova continuamente nel mondo biologico.~~

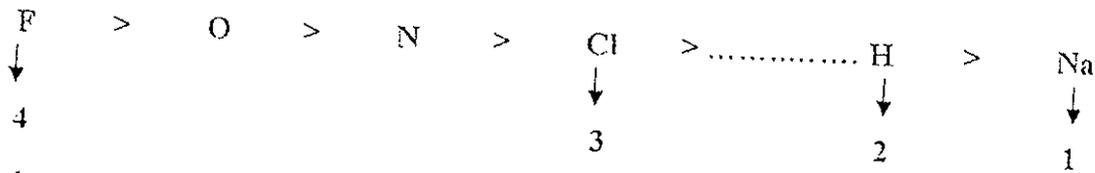
Prima di passare all'elettronegatività, è opportuno ricordare che esistono gli ISOTOPI, cioè atomi che hanno lo stesso numero di protoni ma diverso numero di neutroni (es. idrogeno, deuterio, trizio). Non sono sbilanciati da un punto di vista della carica ma hanno numero di massa differente.

È importante ricordarli perché nel mondo della medicina e della biologia sono molto usati; in biologia sono usati essenzialmente per la datazione dei reperti archeologici o fossili che viene eseguita proprio grazie al dosaggio, alla misurazione di un isotopo del Carbonio.

In medicina, gli isotopi sono correntemente usati nella diagnostica perché si comportano come traccianti: isotopi specifici vengono assorbiti da organi specifici e quindi possono essere usati per indagini diagnostiche (es.: iodio radioattivo per la diagnostica a carico della tiroide perché si fissa essenzialmente in quel tessuto). A volte possono essere usati anche come traccianti per esperimenti: per esempio per individuare specificamente gli acidi nucleici in genere viene usato il fosforo radioattivo, cioè un isotopo del fosforo in quanto nella molecola degli acidi nucleici è presente un gruppo fosfato marcando il quale si riesce a tracciare la strada percorsa o la localizzazione degli acidi nucleici. Ancora, lo zolfo viene impiegato per marcare specificatamente le proteine perché ~~esso~~, nel mondo organico, si ritrova esclusivamente nelle proteine.

Elettronegatività

È una scala di valori che possiamo fare sulla base dell'affinità che ogni atomo ha per gli elettroni:



Indica alcune cose utilissime ed importantissime. Per esempio, ~~l'ossigeno è l'elemento che, fluoro a parte, ha la massima elettronegatività (il fluoro non si trova nelle molecole biologiche).~~

~~Perciò, nelle molecole biologiche l'atomo che ha la maggiore affinità per gli elettroni è l'ossigeno, seguito dall'azoto.~~ Ossigeno e azoto sono gli atomi che maggiormente ritroviamo nelle molecole biologiche. La scala prosegue per ritrovare un altro atomo massicciamente presente nelle molecole biologiche, l'idrogeno, che ha un valore 2, decisamente inferiore rispetto a quello dell'ossigeno e dell'azoto.

Conseguenze: si possono formare legami idrogeno. Non entreremo nella descrizione dei vari tipi di legami che ritroveremo in chimica (legame covalente, con il suo "sottotipo" legame dativo) ma accenneremo soltanto a questo tipo. In effetti, non è un vero e proprio legame perché in genere, quando si parla di legami, si fa riferimento alla compartecipazione di elettroni da parte di atomi. Per chiarezza accenniamo soltanto al fatto che gli elettroni sono disposti sugli orbitali e che l'orbitale è completo quando si hanno 8 elettroni (il primo orbitale è completo con solo 2 elettroni). Tutte le reazioni fra atomi mirano a completare questo ottetto. I rapporti fra atomi consistono proprio nell'esigenza di completare l'ultimo orbitale e quindi nell'accettare o cedere e quindi mettere in comune degli elettroni.

In questo modo avvengono i legami, con la messa in comune di elettroni.

~~Il legame idrogeno è un legame molto particolare che non prevede la messa in comune di elettroni ma è una sorta di attrazione che si viene a formare in conseguenza della diversa elettronegatività degli atomi.~~ In particolare quando un atomo di idrogeno è impegnato in un legame covalente con un altro atomo molto più elettronegativo (vedi appunti), l'atomo più elettronegativo tende ad attirare verso di sé l'elettrone dell'idrogeno. Questo significa che l'H si carica parzialmente positivamente perché il suo elettrone si delocalizza cioè si sposta sugli orbitali più vicini all'altro atomo e quindi l'H viene a caricarsi positivamente. Allo stesso modo, l'atomo più elettronegativo che accetta l'elettrone dell'H, si carica negativamente. Quindi, ~~in una molecola che dovrebbe essere teoricamente neutra (perché quando si forma un legame chimico la molecola è neutra in quanto non c'è nessun cambiamento nel numero di protoni e di elettroni), viene invece a formarsi quello che si chiama un dipolo cioè la molecola presenta un polo positivo ed uno negativo; la molecola non è più neutra ma risulta leggermente carica.~~

La conseguenza è che se ci sono altre molecole nella stessa condizione, tra l'atomo caricato positivamente e l'eventuale atomo caricato negativamente, viene a formarsi un'attrazione che si chiama appunto legame idrogeno. ~~Un esempio classico è costituito dalle molecole di H₂O i legami che~~ **che** intercorrono a formare una molecola di acqua sono la conseguenza del fatto che all'ossigeno

mancano due elettroni per completare l'ottetto, l'H ha un elettrone soltanto nella sua orbita più esterna. Questi elettroni vengono messi in comune ed il risultato è il completamento dell'ottetto per l'ossigeno e del 1° orbitale per l'H. Questo è un legame covalente che avviene con una messa in comune di elettroni. Però, tra l'ossigeno e l'H c'è una grossa differenza di elettronegatività, essendo l'O molto più elettronegativo dell'H. Questo comporta che l'elettrone dell'H si delocalizzi in un'orbita più vicina a quella dell'ossigeno. Perciò l'H si carica positivamente e l'ossigeno negativamente, avendo i due elettroni dei due atomi di H che gravitano nella sua orbita.

Nell'acqua, tutte le molecole sono nella stessa condizione: questo significa che tra l'H di una molecola di H₂O e l'ossigeno di un'altra molecola, si può formare un legame idrogeno.

Il δ (delta) + o - scritti accanto alle molecole stanno ad indicare il dipolo, pur essendo la molecola nella sua globalità neutra.

Il legame idrogeno è importante in biologia perché è un legame molto debole (non è una compartecipazione di elettroni), si rompe con facilità e quindi nel mondo biologico è molto utile per avere legate assieme delle molecole ma in modo tale da poter rompere questa coesione facilmente e con poco consumo di energia. Per capire questo concetto basta pensare alla molecola di DNA, costituita da due filamenti appaiati e tenuti insieme da legami H. In questo caso il legame H è utile perché la molecola di DNA si deve aprire molto spesso, rompendo questi legami ogni volta che si duplica, ogni volta che deve formare proteine e fare il processo della trascrizione. Queste aperture frequenti devono avvenire senza un eccessivo spreco di energia.

Tuttavia, non si potrebbe fare a meno di questo legame nelle molecole biologiche (macromolecole: zuccheri, grassi, proteine, ac. nucleici) perché sono molto numerosi e ciò stabilizza la molecola, cioè la rende stabile nella sua conformazione ma allo stesso tempo si può rompere con facilità quando serve.

Elementi chimici più rilevanti (vedi tabella appunti)

Sono gli elementi più importanti che incontriamo nella nostra storia, comprendendo quelli che in qualche modo ci interessano più da vicino. Le ultime due colonne riportano la presenza % di ciascun elemento nella crosta terrestre e nell'uomo, inteso come vivente. Le percentuali servono per dimostrare che alcuni di questi elementi sono poco presenti nell'uomo, nei viventi e molto nel mondo inorganico e viceversa.

I primi 4 elementi, detti elementi primari, (idrogeno, carbonio, azoto, ossigeno), si riscontrano in minima quantità nella crosta terrestre (primi 3, fa eccezione l'ossigeno), ma in quantità abbondante nei viventi. L'O₂ ovviamente è molto presente nei viventi e non, in quanto uno dei componenti dell'atmosfera. Questi 4 atomi sono i costituenti essenziali che ritroviamo nelle macromolecole biologiche: glucidi (C, H, O), lipidi, proteine (dove c'è anche N per la presenza di un gruppo amminico negli amminoacidi), acidi nucleici.

Sodio, magnesio, fosforo, zolfo, cloro, potassio, calcio, sono chiamati elementi secondari (per quantità) ma indispensabili (non se ne può fare a meno, anche se le quantità sono minime) e sono importanti perché si trovano disciolti nei liquidi cellulari (la cellula è costituita essenzialmente di H₂O) e sono importantissimi per formare soluzioni di cui ripareremo e per assicurare determinate

connessioni tra le cellule; tutti conoscono l'importanza del Ca o del Mg o del K per il benessere dell'individuo. Peraltro, una sana alimentazione assicura tutte queste sostanze in quantità ottimale, senza necessità degli integratori alimentari. Ovviamente il Ca si trova anche sotto forma di fosfati di Ca ed è uno dei costituenti essenziali del tessuto osseo e quindi anche dei denti.

Il fosforo si ritrova negli ac. nucleici, lo zolfo nelle proteine, il Na nella pompa Na/K. Il magnesio è indispensabile per il corretto innesco e funzionamento di alcuni processi che avvengono nella cellula.

Il gruppo di sostanze che comprende fluoro, silicio, manganese, ferro, rame, zinco, litio, sono definiti biogeni rari ma indispensabili; sono infatti presenti solo in tracce nell'uomo mentre in natura sono più abbondanti (il silicio in natura è presente con un 27,7%), ma sono essenziali per lo sviluppo di alcune cose. Per esempio, il manganese è necessario per il corretto sviluppo della struttura ossea. Il ferro è presente nell'emoglobina ed è molto importante per la sua capacità di cambiare stato, passando da uno stato ridotto ad uno ossidato legando così l'O₂. Lo ritroviamo anche nei citocromi che sono delle particolari proteine che rientrano in funzioni di ossido-riduzione. Il rame nell'uomo si trova negli enzimi della catena respiratoria ed ha molta importanza per i molluschi dove, nella molecola dell'emocianina, svolge le funzioni che per noi ha il ferro.

Infine, vanadio, cromo e litio sono biogeni rari e speciali e sono delle curiosità. Per esempio il vanadio si ritrova nel sangue delle ascidie, dei cordati, nostri progenitori. Il cromo lo utilizziamo per il metabolismo dei lipidi.

Vista questa quantità così ampia di elementi, vale la pena di chiedersi perché il carbonio è così importante per il mondo dei viventi, tanto importante che lo studio delle molecole che lo contengono con le caratteristiche che ora definiremo, costituisce la branca della chimica organica, cioè la chimica che riguarda proprio un tipo di legami, di molecole dove sono rispettate alcune regole.

Importanza del carbonio nei viventi

Usualmente si dice che il C è così importante per i viventi perché è in grado di formare 4 legami covalenti con 4 atomi diversi. In effetti il C ha 4 elettroni spaiati sull'ultimo orbitale (ibrido sp³) vedi chimica - appunti lezione 26/01/01 e quindi è in grado di mettere in comune questi elettroni in un legame covalente con 4 atomi diversi. Possiede perciò una grande flessibilità.

Ma questo non è il solo motivo: osservando la tavola degli elementi di Mendeleiev, si vede che il C non è l'unico atomo in grado di formare 4 legami (silicio ha la stessa configurazione esterna del C). In realtà la grande importanza del C rispetto al Si o agli altri atomi con questa configurazione esterna, è data dal fatto che l'atomo di C è molto piccolo, il più piccolo a trovarsi ad avere 4 elettroni sull'orbita esterna. Questo ci riporta a quanto già affermato, cioè che più un elettrone è vicino al nucleo, più i legami che si formano sono stabili perché è difficile romperli in quanto c'è il nucleo che li stabilizza. In sintesi, i 4 legami covalenti che il C forma sono legami covalenti molto forti, molto stabili. Questo consente di formare degli "scheletri carboniosi", cioè gli atomi di C sono in grado di legarsi fra loro in modo molto stabile. Ciò è importante da un punto di vista biologico perché quando parleremo di macromolecole biologiche, proprio il termine MACRO

indica molecole molto grandi che contengono molti legami C-C ed il fatto che questi legami siano forti, rende ovviamente stabile la molecola.

Altri motivi meno importanti sono che il C può formare doppi legami e può formare legami con H, O, N, P, atomi con elettronegatività molto diversa e di conseguenza può dare origine a legami H (anche questi di grande interesse per la duttilità del C). Quindi, il C si ritrova nei 4 tipi di macromolecole biologiche che vedremo.

Inoltre, esiste in natura uno "ciclo del C" cioè uno scambio che avviene in natura, il famoso metabolismo al quale abbiamo accennato, che prevede che il C possa essere prelevato dall'atmosfera e dal terreno e utilizzato per formare molecole biologiche come glucidi e possa essere poi restituito all'atmosfera mediante la degradazione di queste molecole (schema del ciclo del C vedi appunti lezione); il C preso dall'atmosfera sotto forma di CO_2 - anidride carbonica - forma sostanze organiche attraverso processi che poi studieremo (fotosintesi e chemiosintesi) e poi può anche precipitare nel terreno, nell'humus, come precipitazione atmosferica e ritornare nell'atmosfera sotto forma di respirazione degli organismi che sono nell'humus o degli organismi come noi degradano il glucosio per ricavarne energia.

Prima di accennare alle 4 macromolecole biologiche, parleremo di una sostanza inorganica che è essenziale per la vita della cellula: l' H_2O .

H_2O

~~È un costituente essenziale della vita, ciò vuol dire che non solo è importante come molecola (tra i tanti motivi c'è n'è uno chimico cioè perché può formare legami idrogeno), ma anche perché è il componente quantitativamente maggiore della cellula. La sua importanza è dimostrata anche dal fatto che nell' H_2O ha avuto origine la vita; il motivo essenziale è che essa ha permesso di schermare i raggi ultravioletti presenti nell'atmosfera. Ricordiamoci che l' H_2O ricopre quasi $\frac{3}{4}$ del nostro pianeta e quindi la ritroviamo come elemento importante del nostro ambiente; H_2O può costituire fino al 90% del peso corporeo dell'organismo, in relazione alla specie (vi sono specie costituite presso che essenzialmente di questo elemento anche se 90% deve essere considerato il limite massimo), in relazione all'età (più un individuo è giovane, più i suoi tessuti ne sono ricchi e la sua massa corporea è ricca d' H_2O , più un individuo è anziano più tende a perdere H_2O . La senescenza delle cellule è dovuta anche alla perdita di H_2O -es.: rughe in cui le cellule si raggrinziscono -. Ovviamente un feto è molto più ricco d' H_2O che non un neonato e così via a scalare con il passare degli anni). Inoltre, c'è una variazione di tipo tissutale nel senso che non tutti i nostri tessuti contengono la stessa quantità di H_2O : il tessuto adiposo ne conterrà meno di altri come per esempio l'occhio o il liquido cefalo-rachidiano. Infatti, nel tessuto adiposo i lipidi sono preponderatamente presenti ed essi sono idrofobi perciò in una cellula ricca di lipidi non può esserci una presenza massiccia di H_2O . Tuttavia questo tessuto contiene un 10-20% di H_2O , quindi non pochissimo, per salire ad un 30-40% del tessuto osseo fino al 90% del~~

Rimane comunque il concetto generale di H_2O come costituente preponderante. ~~Inoltre esistono altri indizi che si fanno capire quanto l' H_2O sia importante per la vita: per esempio, esistono delle forme di ANABIOSI, cioè di vita latente o di apparente NON vita, che consistono proprio nella~~

perdita di H_2O . L'esempio più tipico sono i semi tra i quali possiamo prendere in rappresentanza quello del grano che apparentemente potrebbe sembrare qualcosa di morto ma basta metterlo a contatto con l' H_2O (piantarlo o reidratarlo) perché germogli. Ciò vuol dire che è una cellula, non è morta, ma è solo in una condizione di vita latente. Questa forma di vita latente viene utilizzata dalle spore, dai semi, a volte da interi organismi come per esempio i , che sono degli organismi particolari che in alcuni momenti perdono completamente l' H_2O e questa è una forma di difesa; si verifica una sorta di letargo della cellula, un apparente stato di non vita.

Questo ci dimostra come la presenza di H_2O sia legata direttamente alla vita perché il germogliare di un seme sta ad indicare proprio che c'è vita.

Da dove proviene l' H_2O (vedi appunti)

L'origine dell' H_2O può essere esogena od endogena;

- **esogena:** proviene dall'ambiente, strettamente legata all'alimentazione sia liquida (apporto in liquidi) che solida (frutta, verdura);
- **endogena:** interna. In moltissime reazioni chimiche che avvengono nel nostro organismo, specialmente quando nelle condensazioni, cioè la formazione di molecole più grandi attraverso l'unione di molecole più piccole (anabolismo), si produce H_2O . Semplicemente, durante la sintesi proteica nell'unione dei vari amminoacidi tra loro liberiamo una molecola di H_2O . Quindi l'origine endogena è dovuta esclusivamente alle reazioni chimiche che avvengono all'interno del nostro organismo.

Inoltre, l' H_2O si trova:

- libera cioè come liquido nelle nostre cellule e può dare origine a soluzioni;
- legata ad altre molecole in una sorta di idratazione;
- di costituzione, cioè cristallizzata.

La molecola dell' H_2O ha la caratteristica di essere neutra ma polare perché i legami covalenti tra l'O ed l'H fanno sì che la molecola sia carica perché l'O è più elettronegativo dell'H e perciò ha una maggiore affinità per gli elettroni per cui tende ad attrarli sulla propria orbita, caricandosi negativamente e di conseguenza impoverendo l'H del suo elettrone facendolo caricare positivamente.

Inoltre, la molecola dell' H_2O non è lineare ma forma un angolo di 105° . Questo è particolarmente importante perché si possono formare una sorta di vertici per cui si originano legami fra le varie molecole che fanno sì che l' H_2O possa andare incontro a cambiamenti di stato: a seconda della quantità di legami H che si vengono a formare tra le molecole, lo stato può essere solido (di massima coesione, ghiaccio), liquido (a t° ambiente, dove c'è un'equivalenza di molecole legate e non legate da legami H), vapore (le molecole sono indipendenti le une dalle altre, i legami H sono nulli). Questi cambiamenti di stato sono ovviamente legati a variazioni di t° : più la t° è bassa, più le molecole sono stabili, tendono ad essere una accanto all'altra e a formare legami H ed un reticolo cristallino che si forma grazie al fatto che la molecola non è lineare. All'aumentare della t° , alcuni legami H si rompono fino ad arrivare allo stato di vapore, che è quello in cui i legami H sono quasi

tutti rotti. Il fatto che possa cambiare stato è una delle caratteristiche che rendono l' H_2O importante per il mondo biologico.

Caratteristiche

- è stabile a temperatura ambiente. L' H_2O a t° ambiente non modifica la sua molecola, mantiene costante i rapporti con le altre molecole e quindi è una sostanza stabile;
- elevato calore specifico. I legami H sono deboli ma sono molti e stabilizzano l' H_2O ; perciò, per farla andare in ebollizione e trasformarla in vapore occorre un elevato calore specifico cioè bisogna fornire parecchio calore.
- elevata tensione superficiale. È la forza necessaria per strappare dalle superficie una molecola d' H_2O . Ciò vuol dire che la superficie dell' H_2O rimane costante (importante se si pensa alla superficie dei mari).

Vediamo nel dettaglio l'importanza dell' H_2O , cominciando da una di queste caratteristiche (vedi appunti):

elevato calore specifico.

Come dicevamo è correlato alla presenza dei legami H. Singolarmente essi assorbirebbero poco calore per rompersi ma essendo tanti c'è bisogno di molto calore per romperli. In sintesi, la causa è l'elevato numero di legami H, l'effetto è l'elevato calore specifico, il vantaggio biologico è che gli organismi acquatici possono vivere in un ambiente a t° piuttosto costante, in quanto, essendo necessario molto calore per mandare in ebollizione l' H_2O , i raggi solari non sono in grado di farlo e la t° resta appunto costante;

elevato calore di evaporazione.

È legato direttamente al precedente ed è utilizzato dagli animali e specialmente dall'uomo come metodo per raffreddare la superficie corporea.

Questo sta a significare che la nostra superficie corporea rimane a calore piuttosto costante e l'evaporazione viene utilizzata solo quando la t° raggiunge limiti che potrebbero essere dannosi per la cellula; è quindi una forma di difesa per il nostro organismo. Il fatto che occorra molto calore perché l' H_2O possa evaporare significa che noi raffreddiamo la superficie corporea nel cedere calore all' H_2O perché possa evaporare;

minore densità del ghiaccio.

È una conseguenza dei legami H. Nel ghiaccio, il fatto che si formino molti legami H perché le molecole formano dei cristalli, mantiene lontane le molecole d' H_2O . Ciò vuol dire che anche il legame H ha una sua lunghezza e quindi le molecole sono mantenute ferme e lontane le une dalle altre. La distanza fra le molecole fa sì che il ghiaccio sia meno denso dell' H_2O . Di conseguenza, il ghiaccio si forma solo in superficie in quanto essendo meno denso dell' H_2O , essa rimane sul fondo e la superficie si ghiaccia. In questo modo il ghiaccio diviene un isolante, cioè uno strato superficiale di protezione per gli animali che vivono nell' H_2O che impedisce al freddo di attraversare ulteriormente gli strati inferiori. Quindi gli animali che vivono a grandi profondità si trovano a t° costante grazie a questi due motivi, elevato calore specifico e minore densità del

ghiaccio perché laddove c'è freddo intenso si ghiaccia la superficie e questa fa sì che si tengano protetti gli abissi e quindi gli animali vi possano continuare a vivere;

coesione.

Riguarda poco gli animali e l'uomo ma è riguarda moltissimo le piante. Ancora una volta è dovuta alla presenza dei legami H ed è utilizzata dalle piante per il trasporto dalle radici alle foglie dei nutrienti, dei sali minerali ecc.;

alta polarità

il vantaggio biologico è che l' H_2O è un ottimo solvente e in più permette alle molecole che sono libere in essa di muoversi liberamente e questo favorisce le reazioni chimiche perché le molecole per reagire fra loro devono potersi muovere ed il fatto che l' H_2O garantisca loro di muoversi liberamente fa sì che le reazioni chimiche avvengano con molta facilità.

Abbiamo accennato all' H_2O come solvente; ripareremo di soluzioni, ma intanto possiamo dire che le sostanze presenti nelle nostre cellule possono essere classificate in generale come polari o apolari, a prescindere dall' H_2O . Questo vuol dire che, considerando l' H_2O come solvente, molte sostanze, dette polari, possono essere idratate cioè prendere contatto con l' H_2O , dare origine anche a soluzioni, ma comunque si idratano. ~~Le molecole polari che possono prendere contatto con l' H_2O si dicono IDROFILE.~~

~~Le sostanze apolari cioè senza carica elettrica, non si idratano, non entrano in contatto con l' H_2O e si chiamano IDROFOBE, di fatto sono insolubili in H_2O .~~

~~Esistono anche molecole anfipatiche (da anfi = doppio) cioè molecole con una doppia caratteristica in quanto una porzione è polare e quindi idrofila ed una porzione è apolare e quindi idrofoba.~~

Se si pensa che la struttura della membrana cellulare si basa proprio su molecole anfipatiche si capisce quanto sia importante la definizione appena fornita.

È ovvio che le sostanze idrofile possono sciogliersi in H_2O e dare origine a soluzioni acide o basiche di cui ripareremo. Accenniamo solo al fatto che molti di quegli atomi come cloro, magnesio, potassio, calcio che abbiamo nominato prima possono trovarsi disciolti in soluzione e dare origine a ioni cioè formano delle molecole che si dissociano dando origine a degli atomi che hanno perso elettroni e in tal caso sono ioni positivi o gli hanno acquistati ed allora sono ioni negativi.

Lezione 3 (25/01/01)

quindi, si comporta come molecola polare a causa della differenza di elettronegatività per cui gli elettroni si delocalizzano cioè si "spostano" sulle orbite più vicine all'ossigeno che si carica negativamente mentre l'H si carica positivamente. Abbiamo anche detto che le molecole polari si comportano nei confronti dell' H_2O come idrofile o idrofobe e abbiamo detto che le molecole polari possono essere disciolte nell' H_2O . L' H_2O tende a dissociare le molecole polari e questo significa che nel momento in cui una sostanza polare viene introdotta in acqua, tende a rompere i suoi legami, molto spesso gli elettroni non si spostano sugli atomi che compongono quella molecola ma possono spostarsi su uno degli atomi che la compongono e l'altro dal quale si sono allontanati positivamente.

Il cloruro di sodio NaCl, una volta che l' H_2O ne ha dissociato i legami, si dissocia in ioni Na^+ e Cl^- . L' Cl^- si sposta sull'atomo del Cl (ha elettronegatività discreta), lo carica negativamente e si carica a sua volta positivamente dando un ione Cl^- . Gli ioni Na^+ e Cl^- si trovano disciolti nell' H_2O danno origine a soluzioni che conducono corrente elettrica. L' H_2O a sua volta può dissociarsi in ioni H^+ e OH^- che danno origine a soluzioni acide o basiche. Quando nell' H_2O sono presenti sostanze che dissociandosi danno un maggior numero di ioni H^+ viene definita acida e quindi sostanze che si comportano come acide si comportano come acide e rilasciano un maggior quantità di protoni. Al contrario, sostanze che danno un maggior numero di ioni OH^- si comportano come basiche e rilasciano un maggior quantità di idrossidi. In comune nell' H_2O si dissociano dando maggiormente OH^- , sono dette basiche. Molto spesso ci troveremo a parlare di queste soluzioni in riferimento alla situazione della cellula.

L'acidità o basicità di una soluzione viene misurata con il pH; esso è il risultato di un calcolo matematico che tiene conto della concentrazione degli ioni che si sono dissociati. In una soluzione in cui la concentrazione degli ioni H^+ è maggiore di quella degli ioni OH^- avremo una soluzione acida e in una soluzione in cui la concentrazione maggiore è quella degli ioni OH^- , avremo una soluzione basica. Il pH è il risultato di una formula matematica che con una serie di passaggi sfocia in un valore che indica se una soluzione è neutra quando il suo pH è ≈ 7 , acida quando $pH < 7$, e basica quando $pH > 7$. Il citoplasma delle cellule e gran parte dei liquidi biologici hanno un pH intorno alla neutralità, tendente al basico; in breve il pH delle cellule è tra $7,4 \approx 7,6$ quindi non è acido ma piuttosto tendente al basico. Fanno eccezione alcuni organelli cellulari in cui il pH è acido, alcuni organelli cellulari, i lisosomi (di cui parleremo in seguito) che sono ricami di enzimi particolari di degradazione in cui, proprio per questioni di difesa della cellula il pH deve essere molto diverso da quello del citoplasma, per evitare danni alle molecole disciolte nel citoplasma.

I valori del pH nei lisosomi vengono mantenuti costanti con diversi meccanismi come le pompe (per esempio all'interno dei lisosomi il pH viene mantenuto acido e costante mediante una pompa protonica) e il sistema tampone.

I sistemi tampone del sangue sono particolarmente importanti, costituiti da proteinati, verranno approfonditi in Biochimica e Fisiologia; la loro definizione è quella di un sistema costituito da un acido forte e relativo sale debole e viceversa, per i dettagli dei quali si rimanda alla spiegazione del corso di Chimica. Vale comunque la pena di ricordare che i sistemi tampone sono necessari per mantenere costante un pH che rischierebbe di variare a causa delle reazioni biochimiche che avvengono all'interno della cellula e che molto spesso possono portare ad uno spostamento anche solo transitorio di ioni che però porterebbe a sbilanciare troppo il pH della cellula e quindi i sistemi tamponi biologici riescono ad assorbire queste variazioni di pH e a mantenerlo costante. Specifichiamo "biologici" perché i tamponi si usano normalmente in chimica (es. elettroforesi o ogni reazione alla cui base ci sia anche l'elettricità in cui chiaramente ci sia anche variazione di ioni che si deve evitare porti a variazioni di pH).

Inoltre, esistono le sostanze anfotere che sono capaci di comportarsi sia da acidi che da basi a seconda dell'ambiente in cui si trovano, in pratica, a seconda del pH dell'ambiente in cui si trova una stessa sostanza può comportarsi in maniera diversa e molto spesso ci sono sostanze come le proteine che hanno questo comportamento.

Tornando alle soluzioni, abbiamo detto che ci sono sostanze che si sciolgono e si comportano come ioni molti dei quali sono *sali minerali*.

Sali minerali

Sostanze presenti nel nostro organismo in piccole quantità ma che costituiscono una frazione importante dei componenti chimici della cellula perché sono indispensabili alla nostra vita; sono quasi tutti quegli elementi secondari che abbiamo citato nella scorsa lezione (vedi appunti).

Sono indispensabili alla vita perché intervengono in diversi processi biologici fondamentali come per esempio l'instaurarsi di potenziali elettrici a livello della membrana. In particolare, sono indispensabili per:

- 1) formazione di ossa e denti (Ca);
- 2) per la regolazione dell'equilibrio idro-salino e quindi all'eventuale instaurarsi di potenziali elettrici;
- 3) molti sali minerali sono indispensabili per attivare cicli metabolici (es. magnesio per attivare la sintesi proteica, come vedremo, favorisce la possibilità di associare ribosomi).

In relazione al punto 2), ci riferiamo in particolare a sali minerali che siano in soluzione (possono essere anche non in soluzione); quando i sali minerali sono in soluzione possono essere sotto forma di ioni, quando l' H_2O li dissocia, o meno. ~~Soltanto~~, la concentrazione di questi sali è uguale nell'ambiente cellulare e nell'ambiente extracellulare ovvero la situazione di una cellula nell'ambiente che la circonda è quella di ISOTONIA, cioè la concentrazione di sali è identica nell'ambiente interno e nell'ambiente esterno. Questa è una condizione importantissima che viene mantenuta grazie a:

• un meccanismo di passaggio di ioni verso la cellula e dalla cellula (lo rivedremo quando parleremo della membrana cellulare);

Osmosi, cioè lo spostamento dell' H_2O che tende ad andare nel compartimento dove la concentrazione di sali è maggiore per diluire la concentrazione per ritornare all'equilibrio idrosalino. È ovvio che normalmente gli spostamenti dell' H_2O sono di poca importanza perché la cellula è di base immersa in un ambiente isotonico e lo spostamento dell' H_2O o degli ioni servono solo a compensare eventuali piccoli differenze. Se così non fosse, verrebbero a crearsi situazioni di pericolo. Facciamo l'esempio di un Globulo Rosso immerso in un ambiente fortemente ipertonico (nell'ambiente extracellulare c'è una concentrazione di sali $>$ che nella cellula); l' H_2O tenderebbe ad uscire dalla cellula per andare a diluire la maggiore concentrazione di sali presente all'esterno. Il risultato sarebbe una perdita d' H_2O più o meno rapida da parte della cellula con una sua tendenza a raggrinzirsi e, dato che l' H_2O è fondamentale per la vita di una cellula, essa andrebbe incontro a morte. Nel caso contrario, cioè qualora la cellula fosse immersa in un ambiente ipotonico (ambiente extracellulare con $<$ concentrazione di sali), l' H_2O tenderebbe ad entrare, rigonfiando la cellula fino addirittura ad arrivare alla sua lisi (rottura). A causa di queste conseguenze, tutte le volte che si inseriscono dei liquidi in un organismo (reidratazione), si utilizza la soluzione fisiologica ovvero una soluzione che ha la stessa concentrazione dei sali presenti nei liquidi biologici.

Tuttavia, in alcuni casi l'equilibrio idrosalino non viene e non deve essere rispettato; per esempio se ci riferiamo al Na, K, e Cl, e ne verifichiamo il livelli intracellulari ed extracellulari, ci accorgiamo che i rapporti sono totalmente invertiti. All'interno della cellula troviamo molto K e all'esterno poco, mentre troviamo pochissimo sodio all'interno della cellula e tantissimo all'esterno. Questa non è la sola situazione di disequilibrio, la citiamo perché ad essa è correlata una pompa sodio/potassio che studieremo, ma ciò ci indica che a volte è necessario che ci sia nella cellula un disequilibrio di sali minerali perché questo crea un potenziale elettrico sulla membrana, il quale è alla base di molte conduzioni, per esempio molte comunicazioni tra cellule, o anche la conduzione degli stimoli nervosi. Allora, abbiamo queste due situazioni: normalmente la cellula tende all'isotonia in casi particolari, quando è necessario mantenere una differenza di potenziale elettrico tra l'interno e l'esterno della cellula, tale differenza viene mantenuta grazie meccanismi di trasporto di membrana (attivo) che studieremo più avanti.

~~Oltre che in soluzione, i sali minerali possono trovarsi anche:~~

- ~~crystalizzati per esempio nello scheletro e nei denti (rifarendoci ancora una volta al Ca sotto forma di fosfato tricalcico);~~
- ~~oppure combinati con altri composti organici, ci riferiamo alle proteine coniugate che poi studieremo ma abbiamo già accennato a due di questi sali:~~

→ il Ferro nell'emoglobina (fatta anche di una parte proteica e quindi una proteina coniugata perché sono insieme parte proteica e non); basilare per il trasporto dell' O_2 in quanto passa dallo stato ferroso Fe^{2+} a ferrico Fe^{3+} ;

il Rame per il quale abbiamo accennato all'emocianina dei molluschi, una molecola con funzioni simili a quelle dell'emoglobina.

Inoltre, il magnesio che troviamo nella clorofilla e quando parleremo di metabolismo vedremo che ci riguarda perché grazie alla clorofilla alcuni organismi possono costruire sostanze organiche che poi noi ingeriamo con l'alimentazione.

Le macromolecole biologiche

CARBOIDRATI O GLUCIDI

Il termine carboidrato fa riferimento ad una formula di struttura generale che in realtà è un po' confondente, cioè $(C_nH_{2n}O_n)$, che non ha niente a che vedere con la struttura dello zucchero in quanto nella molecola di uno zucchero non si trovano molecole di H_2O . Gli H e gli O sono presenti in gruppi diversi e perciò più corretto chiamarli GLUCIDI. Cosa sono i glucidi?

- Sono zuccheri semplici, con formula generale già citata dove n è compreso normalmente fra 3 e 7 e comunque un massimo di 9 atomi di carbonio; per esempio il glucosio, composto a 6 atomi di carbonio ha come formula generale $C_6H_{12}O_6$.

- chimicamente, i carboidrati sono alcoli polivalenti con una funzione aldeidica (CHO) o chetonica (CO). Gli alcoli sono dei composti in cui è presente il carbonio ed una funzione OH (CH_3CH_2OH) cioè un ossidrile; polivalenti vuol dire che ogni C ha una funzione alcolica (OH). Per esempio, il glicerolo è un alcol ha 3 atomi di C con tre funzioni OH. Inoltre, nelle nostre cellule non sono presenti sotto forma di alcoli ma in genere sono combinati con altre sostanze.

Quando questi alcoli polivalenti vengono ossidati, ovvero perdono H, si ottiene una funzione aldeidica se il C è terminale (CHO), oppure, al posto della funzione aldeidica ci può essere una funzione chetonica che deriva per ossidazione di un C secondario cioè legato ad altri due C ($C=O$).

Lezione 4 (30/01/01)

Riprendendo con gli zuccheri, abbiamo detto che possono essere definiti degli alcoli polivalenti con una funzione aldeidica o chetonica; avevamo definito gli alcoli come sostanze inorganiche con una funzione OH e avevamo detto che la funzione aldeidica e chetonica non sono altro che stati di ossidazione degli alcoli, ovvero la perdita di un elettrone, quindi di un H, da parte di un alcol primario (legato solo ad un altro C) nel caso della funzione aldeidica CHO, oppure di un alcol secondario (C legato a due carboni) nella chetonica C=O.

Proseguendo nelle caratteristiche non ancora trattate, ricordiamo che:

- gli zuccheri con più di 5 atomi di C hanno molecola ciclica; studi sulle loro caratteristiche fisico chimiche hanno dimostrato senza dubbi che le proprietà di questi zuccheri sono tali per cui non è possibile immaginare una struttura lineare, ma piuttosto una struttura ciclica (vedi appunti per formule). Ricordiamo che il C emiacetalico possiede un gruppo OH particolarmente reattivo il che significa che molto spesso quel C è coinvolto in altri legami, per esempio per formare glucidi più complessi che adesso nomineremo. Sulla molecola sono presenti vari asterischi per indicare che i C sono *asimmetrici*. Questo concetto in chimica è molto importante ed è dovuto al fatto che il C è legato a quattro atomi o gruppi diversi (per es., il C legato ad un H, ad un OH, ad un gruppo CH₂OH e ad un gruppo C₄H₇O₄ legato a quattro gruppi chimici diversi).

L'asimmetria è importante perché da origine a quella che viene definita ISOMERIA, cioè i gruppi, in particolar modo l'OH e l'H, si possono disporre nello spazio in maniera diversa (per convenzione diciamo a destra o a sinistra). Questa diversa disposizione nello spazio fa sì che le loro caratteristiche chimico fisiche cambino e quindi, pur avendo la stessa formula bruta (stesso n° di atomi di C, H, O), la sostanza è totalmente diversa cioè le caratteristiche sono diverse.

Ciò implica che gli zuccheri sono una categoria molto grande perché per ogni singola formula abbiamo variazioni di tipo di molecola.

Per quanto riguarda le caratteristiche fisiche, questi zuccheri fanno ruotare in maniera diversa la luce polarizzata (misurata nel polarimetro); alcuni zuccheri hanno la capacità di deviare la luce verso destra (destrogiri), altri verso sinistra (levogiri). Ciò si verifica tutte le volte che è presente un C asimmetrico (anche negli amminoacidi). In conclusione, gli zuccheri hanno molti isomeri il che amplia il numero delle sostanze che si possono ottenere con una singola formula grezza.

Riguardo alla **classificazione**, vediamo scritti i termini aldoso, aldopentoso: i termini esoso e pentoso si riferiscono al n° di C, rispettivamente 6 e 5; ovviamente un "trioso" avrà 3 atomi di C, ecc. Il termine "aldo" (aldeide) indica il gruppo funzionale presente e "cheto" indica che nello zucchero è presente una funzione chetonica. Quindi, un primo modo per classificare gli zuccheri (necessario visto l'abbondanza della classe) è quello di individuare il tipo di funzione che c'è (aldeidica o chetonica) e poi di indicare il n° di atomi di C presenti.

- ~~Sono composti polari~~, sono polialcoli, con molte funzioni OH e ~~quindi sono solubili in H₂O~~. Questa caratteristica è molto importante perché fa sì che ne derivi un grosso utilizzo; infatti, quando parleremo di catabolismo, cioè la degradazione delle molecole energetiche, vedremo che ci sarà un

comportamento diverso nel tempo tra l'utilizzo degli zuccheri e quello dei lipidi proprio per questa caratteristica. Lo zucchero si idrata molto facilmente, cioè attira a se molecole di H_2O , e quindi una molecola di zucchero, detto molto semplicemente, occupa più spazio all'interno di una cellula di quanto ne possa occupare una molecola di lipide che essendo essenzialmente apolare ovviamente rifugge l' H_2O e si impacchetta meglio. Questo fa sì che si tenda a consumare immediatamente gli zuccheri (energia a pronta cassa), mentre tendiamo a conservare i lipidi. Questo è il motivo per cui quando ci si sottopone (uomo o animale) ad un intenso sforzo muscolare e si ha bisogno di molta energia, non vengono somministrati grassi, più energetici, ma carboidrati perché si utilizzano immediatamente.

classificazione degli zuccheri

Monosaccaridi. Sono singole unità glucidiche con un numero di atomi di C compreso tra 3 e 9 (in media 7); danno origine a composti diversi per il fenomeno dell'isomeria. Ne citiamo alcuni di interesse biologico (formule sugli appunti): l'aldeide glicerica e il diossiacetone entrambi zuccheri (un aldoso ed un chetoso) a tre atomi di C che ritroveremo nel metabolismo del glucosio.

Queste due molecole sono un punto di "scambio" molto importante perché sono il risultato della scissione della molecola del glucosio che da 6 atomi di C nella prima tappa della sua degradazione viene scisso in due molecole di 3 atomi di C. Questo è un momento importante perché è a questo livello che, in base alle proprie necessità, l'organismo decide se continuare la degradazione del glucosio se c'è bisogno di energia o di convertire queste molecole in glicerolo (cioè ritornare indietro all'alcol); è un punto importante perché, come vedremo, il glicerolo è la molecola di sintesi dei lipidi e quindi dopo la prima scissione del glucosio a due molecole con 3 atomi di C, l'organismo decide se continuare la degradazione, se c'è bisogno di energia, o di convertire in lipidi, con accumulo di grassi.

Il ribosio e ed il desossiribosio (sapere formula di struttura ciclica) sono due zuccheri che ritroveremo negli acidi nucleici, rispettivamente nell'RNA e nel DNA, e quindi la loro importanza biologica. Sono dei pentosi, quindi scriveremo 5 C ad ogni vertice, mentre uno è fuori della struttura ciclica (cioè che accade sempre tutte le volte che la molecola si ciclicizza); la differenza sta in un H al posto di un OH (da qui il nome desossi o deossi) per quanto riguarda il desossiribosio. Inoltre, i C dello zucchero vengono numerati (per non confonderli con altri atomi di C eventualmente presenti nella molecola di DNA) a partire dal primo C dopo l'ossigeno in senso antiorario. La differenza tra ribosio e deossiribosio sta nel C_2 che nel ribosio è legato ad un OH e nel desossiribosio è legato ad un H. Le altre molecole (glucosio, galattosio, fruttosio) sono mostrate per evidenziare l'isomeria e perché sono importanti a livello energetico. In realtà, questi monosaccaridi non sono gli unici zuccheri che noi utilizziamo ma possono legarsi fra loro per formare degli oligosaccaridi oppure dei polisaccaridi. Quindi, quando parliamo di oligosaccaridi parliamo di molecole che hanno pochi monosaccaridi uniti fra loro (max qualche decina); ~~molto~~ sono le molecole che hanno due unità monosaccaridiche e queste costituiscono i **DISACCARIDI**; molto spesso entra in gioco quel C particolarmente reattivo (il gruppo OH in particolare) dove si è ottenuta la chiusura della catena, formando legami con altri monosaccaridi.

→ A questo punto, inseriamo il concetto di POLIMERO. Si usa dire che le macromolecole biologiche (glucidi, lipidi, proteine, acidi nucleici), sono dei polimeri. Sono cioè delle molecole derivate dall'unione fra loro di più unità; parleremo perciò di polimeri per quello che riguarda gli oligosaccaridi ed in particolar modo per i polisaccaridi. È ovvio che ogni polimero nasce dalla condensazione di più unità monomeriche (nel caso degli oligo e polisaccaridi saranno più unità monosaccaridiche, nel caso delle proteine saranno più aminoacidi, nel caso degli acidi nucleici saranno più nucleotidi), ovvero ci sono delle unità di base, non sempre identiche fra loro ma molto simili, che si ripetono. A proposito di identiche o non identiche diciamo subito che sia i polisaccaridi che gli oligosaccaridi possono essere la ripetizione di una stessa unità saccaridica o possono essere il risultato dell'unione di diverse unità monosaccaridiche fra loro; come esempio possiamo portare:

- il saccarosio, dato dal legame tra glucosio e fruttosio (disaccaride con due unità monosaccaridiche diverse);
- il lattosio, lo zucchero del latte, dato dal galattosio più glucosio;
- il maltosio, dato dall'unione di 2 molecole di glucosio (quindi, due unità monosaccaridiche uguali).

Questi semplici esempi ci fanno immaginare quante combinazioni sono possibili dall'unione di ogni monosaccaride con se stesso o con tutti quanti gli altri.

Polisaccaridi. Sono anch'essi polimeri, dovuti quindi alla condensazione di più monomeri tra loro, ma in questo caso si parla di centinaia e migliaia di unità monosaccaridiche. Ne ricordiamo solo alcuni, quelli con i quali veniamo maggiormente in contatto e sono il risultato della condensazione della molecola di glucosio. Quello che varia, dando caratteristiche completamente differenti alle tre molecole è il tipo di legame:

. nell'*amido* è presente un legame lineare (detto alfa-alfa), con la successiva formazione di una struttura elicoidale;

. nel *glicogeno* troviamo invece delle ramificazioni;

. nella *cellulosa* troviamo dei legami alfa-beta con una struttura successiva non ramificata e non elicoidale. In particolare, la struttura della cellulosa risulta piuttosto compatta e ciò ci fa immaginare che la sua funzione sia di sostegno perché costituisce una specie di trama all'interno della cellula e questa è proprio la funzione di questo polisaccaride. La troviamo nelle piante, in particolare a costituire la parete delle cellule vegetali alle quali dà forma e sostegno. Essa è particolarmente interessante per l'uomo dal punto di vista nutrizionale perché tutti gli animali non sono in grado di rompere quei legami, mancando gli enzimi che degradano la cellulosa in glucosio.

Ciò comporta che la cellulosa non venga metabolizzata; anche gli erbivori in realtà digeriscono la cellulosa solo perché nel loro stomaco ci sono dei batteri che sono in grado di digerire la cellulosa (nessun animale è in grado di farlo). Dal punto di vista nutrizionale è chiaro che alimenti ricchi di cellulosa assumono un'importanza molto particolare.

Negli animali ci sono dei polisaccaridi che sono l'equivalente (come funzione) della cellulosa, cioè servono a dare sostegno; tra questi ricordiamo la CHITINA che è un polisaccaride particolarmente

importante perché è un componente essenziale dell'esoscheletro degli insetti (prima di avere lo scheletro interno, negli animali si è evoluto uno scheletro esterno e gli insetti ne sono un esempio, come pure gli scarafaggi o le mosche che hanno uno "scutello" esterno).

L'EPARINA, è un polisaccaride di struttura ed ha un'importante azione anticoagulante.

Il CONDRITINSOLFATO che è uno dei tanti polisaccaridi di matrice che troviamo nel tessuto osseo; quindi, equivalenti della cellulosa in termini di funzione si trovano anche nell'uomo.

Amido e glicogeno hanno invece funzione di riserva, cioè costituiscono un accumulo di glucosio che verrà poi utilizzato nel momento della necessità. Facciamo riferimento alla caratteristica della polarità del glucosio: se è vero che il glucosio è altamente polare, viene facilmente idratato con le conseguenze già citate, una molecola costituita da migliaia di unità di glucosio con peso molecolare molto alto, ovviamente è meno solubile del glucosio, meno idratabile e quindi può essere conservato meglio. Perciò, ~~tutte le volte che un organismo vuole fare una scorta di glucosio, lo conserva come polisaccaride come AMIDO nelle piante e come GLICOGENO negli animali (uomo compreso).~~ Nelle piante, l'amido costituisce un'ottima riserva energetica che può essere utilizzata quando la pianta ha bisogno di energia e quindi intacca le propri riserve di amido, ma costituisce anche un'importante fonte nutritizia per gli animali; infatti, gli organismi *eterotrofi* (tra cui l'uomo) devono prendere dall'esterno, mediante l'alimentazione, alcune sostanze necessarie, tra cui il glucosio. ~~Buona parte della nostra energia deriva dal glucosio, che non sappiamo costruire ma dobbiamo assumere attraverso l'alimentazione.~~ L'amido contenuto nelle piante è una fonte di glucosio che viene ingerita come amido e degradata a glucosio del quale una parte viene convertito in glicogeno per una piccola riserva e la restante parte viene utilizzata per produrre energia. Quindi, tutte le piante ricche di amido, le patate piuttosto che il grano, sono fonte di glucosio; al contrario, piante con la foglia particolarmente carnosa, come lattuga ed insalata, sono più ricche in cellulosa e quindi di scarso valore nutritizio ma importante come fonte di fibre.

Il glicogeno, costituisce una riserva per l'uomo anche se si ritrova in poche cellule; in parte nelle cellule muscolari, molto nel fegato. È responsabile del mantenimento della glicemia (quantità di glucosio nel sangue); quando il metabolismo del glicogeno funziona bene, la nostra glicemia mantiene un certo valore che non sale al di sopra di 1,10 g/l (a digiuno), ma non scende al di sotto di una certa quantità per evitare il coma ipoglicemico. Quindi funzione estremamente importante volta a riequilibrare l'accumulo o la carenza di glucosio nel sangue.

Riassumendo, per gli zuccheri abbiamo diverse funzioni:

- *strutturale*, evidente nei polisaccaridi (meno nei monosaccaridi);
- *energetica*, che può essere di pronto utilizzo per i monosaccaridi o per gli oligosaccaridi e di maggior riserva per quanto riguarda i polisaccaridi;
- *riconoscimento cellulare* o comunicazione fra cellule: quando parleremo di membrana plasmatica vedremo delle corte catene monosaccaridiche legate alle proteine.

Sono oligosaccaridi con due funzioni molto importanti:

sono segnali molecolari, cioè caratterizzano una certa cellula essendo importanti segnali specie specifici. Le reazioni immunologiche anticorpali [anticorpo = molecola costruita dal nostro

organismo in risposta a ciò che non ha riconosciuto come proprio] sono mediate da segnali dati da corte catene di monosaccaridi (quindi da oligosaccaridi). Per esempio, la specificità degli antigeni A, B, AB, 0 (assenti) dei gruppi sanguigni è proprio data dalla presenza di zuccheri diversi su una tipoproteina di base. Inoltre, possono essere anche utilizzati come riconoscimento, come recettori di membrana, che riconoscono determinate sostanze che devono entrare nella cellula e quindi poi veicolano al suo interno.

Ricordiamo poi che ci sono dei polisaccaridi particolari, DESTRANI e LEVANI, che sono prodotti da batteri anaerobi autotrofi tipici del cavo orale. I destrani danno origine alla placca dentaria, e i levani causano lesioni ai tessuti molli dei denti. Ciò sta a significare che l'alimentazione e quindi la presenza di alcune molecole nel nostro cavo orale, possono essere causa di danni.

LIPIDI

Sono i costituenti strutturali essenziali della membrana plasmatica (m.p.). Si suddividono in lipidi semplici e complessi.

Lipidi semplici: Sono i gliceridi la cui molecola di base è il glicerolo (vedi appunti), un alcol a tre funzioni alcoliche. Se ricordiamo la gliceraldeide ed il diossiacetone, ci accorgiamo come entrambi questi zuccheri derivino dal glicerolo (sono particolarmente importanti per lo swith metabolico prima accennato). Il glicerolo si lega ad una molecola di acido grasso (sostanza inorganica con funzione acida $-COOH$ ed una lunga catena carboniosa formata da un gruppo CH_2 preso n volte); al cambiare dell'acido grasso abbiamo un lipide diverso con una categoria ampissima di molecole.

Il legame che si forma tra glicerolo e acido grasso è detto ESTERE, e vede un ossigeno del glicerolo che si lega al C dell'acido grasso. Perché possa avvenire il legame, l'ossidrile del glicerolo perde un H, l'acido grasso perde un OH della funzione acida, si forma una molecola di H_2O (va a costituire fonte endogena); a seconda del numero di funzioni OH del glicerolo esterificate con altrettante catene di acidi grassi, possiamo avere MONO-, DI- e TRIGLICERIDI (che fanno parte delle analisi di routine fatte per valutare il quadro lipidico di un soggetto).

Come dicevamo, gli acidi grassi sono costituiti da lunghe catene carboniose legate fra loro da singoli legami o da doppi legami $C=C$; in questo caso vengono definiti insaturi e presentano differenze in termini di digeribilità e, soprattutto, di danno che questi possono indurre rispetto agli acidi grassi saturi. La presenza del doppio legame rende la catena più aggredibile, in quanto il doppio legame si rompe più facilmente. Gli acidi grassi sono insolubili in H_2O ; perciò, la molecola dei lipidi semplici, in particolare i trigliceridi, risulta apolare.

LIPIDI COMPLESSI ?

La categoria dei lipidi semplici può essere "complicata" dalla presenza di un gruppo FOSFATO e dalla presenza di $AlCOH$ legati al fosfato. Si formano infatti i FOSFOLIPIDI, costituiti da glicerolo, due catene di acidi grassi e la terza funzione alcolica legata ad un gruppo fosfato.

A loro volta, i fosfolipidi possono essere molecole ancora più complesse se al gruppo fosfato sono legati degli alcoli; questi alcoli possono essere di diverse categorie, tra cui la colina, l'inositolo, la serina, l'etanolamina, ecc. Questi fosfolipidi hanno una caratteristica estremamente importante per il mondo biologico: tenuto conto del fatto che abbiamo più volte ripetuto che nelle nostre cellule e nell'ambiente extracellulare è presente H_2O in quantità massicce, il fatto che insieme agli acidi

grassi ci siano un gruppo fosfato e soprattutto degli alcoli, rende la molecola capace di un doppio comportamento: una parte è apolare e insolubile in H_2O (acidi grassi), un'altra parte è polare e solubile in H_2O (alcoli). Quindi, queste molecole sono ANFIPATICHE e si usa comunemente dire che i fosfolipidi hanno una "testa" idrofila (il gruppo fosfato/alcol), e due "code" idrofobe (le due catene di acidi grassi); ne consegue una rappresentazione del fosfolipide con una parte circolare (testa polare) e due stanghette (code o catene dell'acido grasso).

I fosfolipidi sono, come detto, i componenti strutturali di base della membrana plasmatica perché grazie a questo duplice comportamento nei confronti dell' H_2O , basterà che rivolgano le teste polari verso l' H_2O e le code idrofobiche verso l'ambiente privo di H_2O per risolvere i problemi legati alla presenza dell' H_2O dentro e fuori la cellula. In particolare vedremo che le m. p. saranno costituite da un doppio strato di fosfolipidi in modo che le teste siano rivolte rispettivamente verso l'esterno e verso l'interno della cellula, dove c'è H_2O . La disposizione verso l'interno delle code idrofobiche rende la m. p. molto stabile il che vuol dire che l' H_2O attraversa la membrana senza soffermarsi mai nel doppio strato lipidico che la devierà verso l'esterno o verso l'interno della cellula.

Quindi, questa struttura garantisce una particolare stabilità strutturale alla membrana (gli altri componenti la m. p. saranno descritti in seguito).

Le molecole di lipidi possono essere ancora più complesse di quanto visto per esempio, le **SFINGOMIELINE**, dove al posto del glicerolo c'è una sfingosina, sono lipidi particolari presenti in alcune cellule, come quelle nervose.

Tra i lipidi semplici dobbiamo nominare anche le **CERE** che negli animali hanno una funzione di protezione molto importante.

Oltre ai lipidi semplici e complessi (fosfolipidi, sfingolipidi ecc.), ci sono due categorie di molecole che vengono inserite tra i lipidi per il loro comportamento idrofobo, pur non avendo nulla della struttura lipidica appena vista. Sono gli **STEROIDI** ed i **TERPENI**.

Gli **steroidi** sono una classe di molecole che hanno varie funzioni (acidi biliari, ormoni sessuali, ormoni adrenocorticali) e derivano tutti dalla molecola ciclopentano-peridrofenantrene, come il colesterolo, componente tipico della m. p. degli eucarioti, dove è presente un gruppo alcolico che può essere esterificato con acidi grassi. Tra gli steroidi ci sono anche il cortisone, dalle note proprietà antinfiammatorie, il progesterone e l'estradiolo, ormoni sessuali femminili, il testosterone, ormone sessuale maschile, la vitamina D_3 , e così via, in rappresentanza di una classe molto ampia.

I **terpeni** derivano dalla molecola del caucciù, l'**ISOPRENE** (vedi molecola appunti e ricordare), che può legarsi in vario modo formando polimeri. In questa categoria fanno parte alcune vitamine liposolubili, A (visione), D (calcificazione), E, K (coagulazione), essenziali per la vita in giusta quantità; infatti, mentre le idrosolubili, come la C e la B, non danno rischi di accumulo perché escrete nei liquidi biologici, le liposolubili danno accumulo e ipervitaminosi, se la quantità assunta è superiore al fabbisogno giornaliero.

Lezione 5 (01/02/01)

LIPIDI

Abbiamo detto che la loro principale funzione è quella strutturale, essendo componenti essenziali della m. p. di tutti i viventi. Vedremo che negli eucarioti tra i lipidi, oltre ai fosfolipidi, ci sarà anche il colesterolo che serve per aumentare la fluidità della m. p., mentre nei procarioti sono presenti essenzialmente fosfolipidi.

Un'altra funzione importante è quella energetica in quanto i lipidi costituiscono un'ottima riserva energetica per tutti i viventi, in modo particolare per gli animali. Non parleremo dell'ossidazione dei lipidi ma quando parleremo dell'ossidazione del glucosio vedremo che la produzione di ATP (energia) è dovuta all'ossidazione dei legami C-H e poiché la struttura degli acidi grassi è ricca di questi legami, possiamo immaginare come i lipidi siano un ottimo materiale di riserva energetica. Riserva perché, al contrario degli zuccheri che sono immediatamente utilizzati, i lipidi per la loro struttura idrofobica sono impacchettati molto facilmente e quindi costituiscono un materiale energetico essenzialmente di riserva. Inoltre, il lipide è ancora più energetico del glucosio (più del doppio) e tuttavia l'organismo tende a conservarlo proprio perché è impacchettato; è tuttavia

possibile una conversione da zucchero a lipide se nell'organismo non occorre energia, cioè se si ingeriscono carboidrati in quantità eccessiva rispetto al fabbisogno. Infatti, l'organismo comincia a degradare gli zuccheri e, arrivati alla gliceraldeide e diossiacetone che possono convertirsi in glicerolo, da qui parte poi la conversione degli zuccheri in lipidi (con conseguente accumulo).

Altre funzioni più specifiche sono quelle di trasporto (i lipidi possono essere un buon meccanismo di trasporto di sostanze) e di protezione (abbiamo accennato alle cere che sulle foglie, sulla pelle, sulle penne degli uccelli costituiscono uno strato di lipidi di protezione dal freddo e dall' H_2O). A questo proposito si può ricordare che esiste una diversa distribuzione del grasso corporeo a seconda di dove vive un popolo; gli Eschimesi hanno una distribuzione di cellule adipose molto particolare, in virtù del clima in cui vivono.

Inoltre, i lipidi sono importanti come precursori di vitamine (o lo sono direttamente) e ormoni.

Anche i lipidi come i glucidi possono essere considerati dei polimeri, ovvero molecole che sono il risultato della condensazione di molecole più semplici (monomeri). Per queste diverse funzioni, i lipidi si trovano tra le macromolecole direttamente connesse con la vita.

PROTEINE

Non è evidente la struttura polimerica; sono il risultato della condensazione di molecole dei 20 aminoacidi (A.A.) di base. La formula di struttura generale degli A.A. prevede un C asimmetrico, legato ai seguenti 4 gruppi diversi:

- un gruppo amminico (NH_2);
- un gruppo acido (o carbossilico) ($COOH$);
- H ;
- un radicale R.

In pratica, tutti i precedenti gruppi sono identici mentre la specificità chimica di un AA e, di conseguenza, della proteina, è data da questo gruppo che varia di volta in volta.

Il C asimmetrico, escluso l'AA più piccolo, la glicina (gruppo R = H), dà origine ad un'isomeria ottica con due serie di AA: una levogira (L) ed una destrogira (D); tuttavia, le proteine di tutti i viventi contengono AA della serie L.

Legame peptidico: È il legame tipico delle proteine, unendo i vari AA tra loro. ^{con eliminazione di H₂O} Si realizza sempre tra il gruppo carbossilico di un AA ed il gruppo amminico dell'AA successivo; quest'ordine è importante a tal punto che alcuni organismi hanno creato un meccanismo volto a non sbagliare. In pratica, tengono impegnato il primo gruppo amminico del primo AA per evitare che possa legarsi in maniera sbagliata. Abbiamo parlato di reazione tra due gruppi: in realtà il legame vero e proprio, come messa in compartecipazione di elettroni, avviene tra il C e l'N. Quindi, ~~due gruppi che reagiscono sono il carbossilico e l'amminico, gli atomi che si legano sono C e N.~~ Questo legame covalente comporta una delocalizzazione di cariche sull'N che è più elettronegativo del C e ciò è importante per la formazione delle strutture successive delle proteine; da notare che nella formazione del legame si libera H₂O andando a dare un contributo ulteriore alla quota endogena di questa molecola. Scendendo nel dettaglio della formazione del legame, l'OH del gruppo COOH forma H₂O con un H del gruppo NH₂; rimangono C e N con un legame libero e vanno a formare il legame peptidico.

A proposito della specificità dei 20 diversi AA, esiste una classificazione in base ai gruppi chimici funzionali; di seguito citiamo le classi più rappresentative, citando alcuni nomi che devono essere ricordati:

- monoamminodicarbossilici (R = COOH); hanno comportamento acido, sono l'acido aspartico ed il glutammico;
- amidi, derivano da una trasformazione dei precedenti e contengono un gruppo amminico in più (diamminici). Hanno carattere basico e sono l'asparagina, la glutammina, l'arginina e la lisina. Li ritroveremo in una categoria di proteine che studieremo a parte, gli ISTONI (in particolare arginina e lisina) importantissimi per la condensazione di DNA;
- solforati, contengono un gruppo S (zolfo). Sono la cisteina e la metionina e danno alla proteina la specificità di poter formare legami (o ponti) disolfuro che non troveremo in nessun'altra molecola organica, anche perché lo zolfo si trova solo nelle proteine e viene perciò usato per marcare selettivamente le proteine con gli isotopi radioattivi (per marcare selettivamente un acido nucleico usiamo il fosforo).

Struttura primaria delle proteine

^{Scrive M. P.} È la lunga catena degli AA tenuti assieme dal legame peptidico la cui sequenza è dettata dal DNA. Questo è il modo in cui l'informazione che il DNA porta può arrivare al funzionamento di tutta la cellula. Infatti, le proteine entrano in tutte le funzioni della cellula: basti pensare alla categoria di proteine che costituisce gli enzimi, che sono coinvolti in tutte le reazioni biochimiche della cellula, permettendo al DNA di regolare tutto il lavoro della cellula. Infatti che la catena primaria degli AA derivi direttamente dal tratto di DNA che la codifica è stata una scoperta importantissima degli anni

60 ed è stata chiamata dogma centrale della biologia. Infatti, la scoperta delle modalità con cui il DNA codificava per le proteine ha significato aprirsi un mondo per spiegarsi tante cose già note. Questo significa che se c'è un cambiamento nella sequenza del DNA, ci sarà molto probabilmente un cambiamento nella proteina che può essere di poca importanza, gradevole (colore occhi), ma che può essere anche estremamente dannoso per l'organismo. A esempio si può portare la falcemia che è dovuta al cambiamento di un singolo nucleotide che si ripercuote sul cambiamento di un AA che è tanto importante nella funzione dell'emoglobina da portare a grossi problemi clinici (la falcemia è chiamata *sindrome* proprio per il suo complesso quadro clinico).

Struttura secondaria delle proteine

È dovuta alla presenza di atomi a diversa elettronegatività e quindi alla possibilità di formare legami H. In pratica, la struttura secondaria serve esclusivamente a stabilizzare la catena degli AA. Abbiamo due tipi più frequenti di struttura: l'alfa elica ed il foglietto beta. Queste due strutture si possono alternare nella stessa molecola dando origine a tratti con struttura elicoidale e tratti ripiegati.

L'alfa elica è un'elica; fu individuata negli anni 40 da Pauling e negli anni 50 Watson e Crick pensarono a questa elica come probabile modello, poi confermato, per il DNA.

La catena si avvolge attorno ad un asse immaginario formando un'elica destrorsa; questa struttura è stabilizzata dai legami H che si formano tra i C e gli N (H e O) degli scheletri (non sono interessati i radicali). La struttura beta è un ripiegamento a fisarmonica.

La struttura secondaria avvicina i radicali che si possono trovare distanti di diversi AA, ma quando la catena si ripiega o si avvolge, si possono trovare vicini tra loro e possono interagire tra loro. Ricordando che i radicali danno la specificità all'AA, si possono instaurare dei legami che sono specifici di quell'AA e di quella proteina.

Struttura terziaria delle proteine

È basilare e specifica. Fino a questo momento, infatti, parlando correttamente non dovremmo parlare di proteina ma di catena peptidica perché non si è ancora formato nessun particolare ripiegamento, nessun sito che possa dare una specifica funzione alla proteina. La funzione della proteina, invece, è dovuta proprio ad un ripiegamento con formazione di siti funzionali che si formano in seguito ai legami che intercorrono tra i radicali. Perciò né la lunga catena né l'elica né il foglietto beta costituiscono siti funzionali e quindi non è corretto parlare di proteina perché non funziona come tale. Infatti, la rottura della struttura terziaria (o per alcune la quaternaria) provoca il non funzionamento della proteina. In pratica, l'avvicinamento dei radicali dato dalla struttura secondaria, ne induce l'interazione, si ha una quantità enorme di legami possibili, a seconda dei vari gruppi coinvolti. L'ulteriore ripiegamento è innanzitutto dovuto all'ambiente in cui la proteina andrà a lavorare. Ricordiamo che la proteina è una molecola anfipatica perché alcuni AA sono polari ed altri apolari. Il primo ripiegamento consiste nel mettere all'esterno gli AA polari se la proteina deve lavorare in ambiente acquoso. Avverrà il contrario se la proteina deve lavorare in ambiente apolare. Ciò consentirà ad alcuni AA di avvicinarsi ancora di più con la possibilità di instaurare ulteriori legami. I legami rappresentati sono vari: idrofobici, elettrostatici, legami H,

ed in particolare, tra i legami covalenti, il ponte disolfuro (-S-S-). Per alcune proteine la struttura terziaria corrisponde a quella definitiva con acquisizione del suo perfetto funzionamento.

S distinguono due categorie di proteine: le globulari e le fibrose.

Le globulari formano un ripiegamento molto stretto (gomitolo) che dà origine a siti attivi. Le fibrose sono più distese per prevalenza della struttura secondaria rispetto alla terziaria (poche zone si sono ripiegate).

Struttura quaternaria delle proteine

Caratteristica di alcune proteine è data dall'unione di due o più catene polipeptidiche che possono essere uguali o diverse. Per es. l'emoglobina è data da quattro catene uguali due a due, due catene α e due beta (tale nomenclatura è convenzionale e non c'entra con la primaria), la cui sintesi è controllata da due geni (uno per l'alfa ed uno per la beta).

Lezione 6 (06/02/01)

Riprendiamo brevemente le strutture delle proteine:

struttura primaria

È la sequenza di AA legati tra loro dal legame peptidico (siamo in presenza di polimeri). La sequenza degli AA è determinata dalla sequenza di nucleotidi presenti sul DNA. Vedremo che esiste un processo abbastanza complesso che permette di trasformare la sequenza di nucleotidi in una sequenza di AA. Questo comporta che una mutazione, un qualsiasi cambiamento del DNA può determinare un cambiamento nella sequenza degli AA.

Struttura secondaria

Abbiamo visto che è rappresentata da un' *alfa elica* o un *foglietto beta*, con stabilizzazione dovuta al legame H che permette ai radicali di avvicinarsi tra loro e quindi di prendere contatto chimico (vale la pena solo di accennare al fatto che esiste anche la struttura secondaria tipica del collagene che però non tratteremo per non complicare le cose). Da qui si origina la

struttura terziaria

è proprio l'instaurarsi dei legami tra i radicali e quindi cominciano a essere dei legami specifici, cominciano a formarsi dei siti specifici. Abbiamo affermato che il primo ripiegamento che la proteina effettua è quello relativo all'ambiente in cui andrà a lavorare: se è l'ambiente è acquoso esporrà all'esterno i radicali polari, se è privo di H₂O esporrà i radicali apolari. ~~Dopo questo primo ripiegamento, intercorrono legami chimici veri tra i radicali e si formano i siti attivi.~~ Da questo momento, per la maggior parte delle proteine possiamo cominciare veramente a parlare di proteina, in altre parole non di una catena polipeptidica ma di una molecola funzionante che riesce a svolgere le funzioni proprie delle proteine.

Ricordiamo ancora che rispetto alla struttura primaria (verificare, dovrebbe essere terziaria) possiamo distinguere proteine fibrose (nelle quali prevale la struttura secondaria e quindi c'è uno scarso ripiegamento) o globulari.

Struttura quaternaria

Può essere assunta da alcune proteine. È data dall'unione di più catene polipeptidiche che prendono il nome di *monomeri* e possono essere uguali o diverse (es.: l'emoglobina formata da due catene alfa e due beta).

Ovviamente una proteina è funzionante quando raggiunge la sua massima struttura possibile.

~~In realtà nella proteina è possibile anche riconoscere dei domini strutturali che sono dei nuclei della proteina relativamente autonomi che risultano dal ripiegamento di un segmento continuo di catena: molto spesso il dominio strutturale corrisponde ad un dominio funzionale, cioè quel dato tratto ha una specifica funzione;~~ ed è stata individuata una corrispondenza probabile tra dominio ed ESONE (tratto di DNA che codifica per una catena polipeptidica). Spesso il DNA degli eucarioti è discontinuo cioè, all'interno di uno stesso gene si alternano tratti che si tramuteranno in AA e tratti che non codificheranno per nessun AA e vengono eliminati. Spesso i domini strutturali

corrispondono con gli esoni (riprenderemo l'argomento quando faremo meglio la struttura del gene eucariotico).

Sulle caratteristiche delle proteine possiamo ancora dire che sono sostanze ANFIPATICHE e ANFOTERE. Ricordiamo che il termine *anfipatica* indica una molecola che contiene tratti polari e apolari, le proteine, proprio per la diversità dei radicali degli AA contengono sia AA polari che apolari, il ripiegamento è relativo all'ambiente in cui andranno a lavorare il che vuol dire che se una proteina lavora a metà tra un ambiente polare e uno apolare, può essere considerata a tutti gli effetti una molecola anfipatica, cioè con un doppio comportamento.

Anfotero, invece, si riferisce alla capacità della proteina di dissociarsi in un ambiente. Va detto che la proteina è una molecola che NON ha un proprio pH ma assume un certo pH a seconda dell'ambiente in cui è disciolta. Questa caratteristica è detta "anfoteria". Si può dire che a pH acido la proteina dissocia protoni (H^+), comportandosi come un acido, a pH basico dissocia ioni OH^- .

In realtà, quando parliamo di pH basico o acido, non ci riferiamo ad un concetto assoluto ma ci riferiamo ad una comparazione con il punto isoelettrico.

Punto isoelettrico (p. i.)

s'intende un valore di pH al quale la proteina ha carica nulla (il numero delle cariche positive equivale a quello delle cariche negative). Varia da proteina a proteina e non è possibile dare un p. i. comune a tutte le proteine. Quando parliamo di ambiente acido o basico e del dissociarsi della proteina in maniera diversa a seconda del pH cui si trova, ci riferiamo al punto isoelettrico.

In pratica, quando parliamo di pH acido, ci riferiamo ad un pH minore del p. i. il che vuol dire che se una proteina avesse p. i. = 5, un pH di 5,2 non sarebbe più acido per quella proteina. Quindi, ad un pH inferiore al p. i., la proteina dissocia essenzialmente le sue cariche positive, ad un pH uguale al p. i. la proteina presenta cariche positive uguali a quelle negative, ad un pH superiore al p. i. la proteina dissocia maggiormente le cariche negative.

Classi proteiche

Si parla di proteine semplici o di proteine coniugate.

Le semplici sono costituite esclusivamente dalla catena polipeptidica; quindi vi è una sola parte proteica dettata dall'informazione portata dal DNA.

Le coniugate hanno anche una parte non proteica, denominata gruppo prostetico. Quindi, nelle proteine coniugate parliamo di una parte definita APOPROTEINA che è la parte proteica vera e propria, cioè la catena aminoacidica, e di un gruppo che non è chimicamente una proteina ma può essere un lipide (lipoproteina), una catena carboidratica (glicoproteina), un metallo (metallo proteina - Fe per l'emoglobina), ecc. Perciò abbiamo una classificazione che fa riferimento al gruppo prostetico legato alla parte proteica. Il gruppo prostetico si unisce alla parte proteica dopo che essa è terminata, cioè la catena è stata completamente codificata e dopo che c'è stato il massimo raggiungimento della struttura.

funzioni delle proteine

Quando abbiamo una proteina coniugata, molto spesso la specificità della funzione è data proprio dal gruppo prostetico: la funzione dell'emoglobina, che è quella di trasportare l'ossigeno, è svolta dal ferro e quindi è proprio il gruppo prostetico che svolge la funzione cui è deputata la proteina.

Le funzioni possono essere svariate. Di seguito elenchiamo le più importanti ma prima ricordiamo che il DNA guida la vita della cellula codificando effettivamente solo proteine ma grazie alla grande varietà di funzioni che le proteine possono svolgere, in qualche modo dirigono la vita di tutta la cellula.

1) **Enzimi.** Sono definiti catalizzatori biologici (catalizzatore = sostanza capace di accelerare la velocità di una reazione; il concetto verrà approfondito più avanti). Quando si parla di catalizzatore biologico, ci si riferisce ad una sostanza biologica in grado di svolgere questa funzione. La caratteristica dei catalizzatori biologici è quella innanzitutto di essere specifici per una data reazione e quindi rientrano in tutti i processi biochimici della cellula. Da ciò si capisce che se un enzima è diverso da quello che dovrebbe essere perché c'è stato un cambiamento del DNA, la reazione può cambiare e quindi possiamo immaginare un modo in cui il DNA entra nella vita della cellula.

2) **Proteine strutturali.** Sono quelle proteine che hanno la funzione di sostegno della cellula; sono le proteine del citoscheletro, il collagene, l'elastina, la cheratina.

3) **Carriers.** Sono proteine di membrana che si occupano del trasporto di membrana. Ricordiamo che la m. p. è. è selettivamente permeabile cioè seleziona ciò che deve entrare ed uscire e molto di questo trasporto è mediato da queste proteine che fungono da trasportatori.

4) **Proteine contrattili.** Sono quelle che si occupano della mobilità delle cellule e degli organismi. Per es., nelle cellule muscolari l'actina e la miosina sono proteine di tipo contrattile.

5) **Ormoni proteici.** Come ci sono degli ormoni tra i lipidi, ci sono anche delle proteine che svolgono funzione ormonale (l'insulina).

6) **Proteine di trasporto.** Sono diverse dalle "carriers" che si occupano di trasporto a breve distanza, attraverso la membrana, dentro e fuori la cellula; queste proteine, invece, sono di trasporto a lunga distanza (es. emoglobina che contiene ferro e attraverso la quale l'ossigeno è trasportato in tutto il corpo).

7) **Proteine di deposito.** Di solito le proteine ingerite con l'alimentazione vengono scisse per utilizzare gli AA per costruire le proprie proteine; in realtà, degradando le proteine si può recuperare energia ed alcune proteine possono essere considerate di riserva, di deposito (per es. l'ovalbumina dell'uovo che da nutrimento all'embrione; la caseina di cui è ricco il latte).

8) **Anticorpi e tossine.** Le proteine possono avere la funzione di essere sia una tossina, cioè una molecola che non viene riconosciuta da una specie come proprio (alcuni batteri per es. rilasciano tossine che causano il quadro clinico e che devono essere riconosciute dalle proteine che costituiscono gli anticorpi), sia un anticorpo. La reazione antigene/anticorpo molto spesso è di rapporto tra due proteine. Spesso gli antigeni sono proteine coniugate ed in questo caso la specificità è data dal gruppo prostetico; la produzione di anticorpi (salvo qualche eccezione che

diremo) è stimolata dalla presenza dell'antigene. In pratica, l'anticorpo è una molecola che è il risultato della modificazione di un precursore sulla base dell'antigene presente in modo da riconoscerlo perfettamente ed eliminarlo.

In pratica, antigene e tossina sono dal punto di vista chimico entrambi proteine e danno lo stesso tipo di reazione anticorpale. In realtà per antigene si intende qualcosa di diverso, spesso riferendoci agli antigeni di membrana (come gli antigeni A, B, 0 dei gruppi sanguigni); la tossina invece è formata all'interno della cellula e viene poi espulsa.

ACIDI NUCLEICI

Si dicono nucleici perché sono stati rinvenuti nel nucleo, acidi perché messi in evidenza con coloranti basici, quindi acidofili. La loro struttura tridimensionale viene conosciuta intorno agli anni '50 ('52-'53) (la data è imprecisa perché ai tempi i metodi di divulgazione erano meno rapidi e precisi di oggi ed i risultati venivano diffusi in più riprese, provocando qualche discrepanza nell'attribuzione della data ad un certo studio).

Questo ritardo è dovuto al fatto che solo negli anni '40 si era capita la funzione del DNA: fino ad allora si era capito che c'era una molecola che veniva trasmessa di generazione in generazione e dava origine a determinate caratteristiche che si ritrovavano ed erano state chiamate genetiche (la genetica, nata con Mendel intorno al 1865 aveva già fatto passi da gigante), ma non si era ancora capito quale fosse la molecola coinvolta nella trasmissione. Quando negli anni '40 si è capita la funzione del DNA, ha assunto un altro significato studiare la molecola da un punto di vista chimico.

I primi studi sugli acidi nucleici si erano basati sull'idrolisi prima parziale e poi, con vari passaggi, completa della molecola, dai quali si era visto che la molecola si rompeva in vari parti:

- dopo una prima idrolisi, un componente che si ripeteva sempre, formato da un acido fosforico, uno zucchero ed una base (componente) azotata che era diversa di volta in volta;
- idrolisi successive, che riuscirono a scomporre questi tre componenti evidenziando che c'erano un acido fosforico, 4 basi azotate diverse tra loro che si alternavano ed infine uno zucchero che era il deossiribosio (nel DNA) in cui il C_{2'} è legato ad un H e non ad un OH come nel ribosio dell'RNA.

Quindi, gli acidi nucleici sono polimeri derivati dall'unione tra loro di più monomeri chiamati nucleotidi, formati dall'unione di un gruppo fosfato, uno zucchero ed una base azotata, la componente formata soltanto dallo zucchero e la base azotata viene chiamata nucleoside. Se si aggiunge un gruppo fosfato, la molecola prende il nome di nucleoside mono fosfato, del quale il termine nucleotide è sinonimo (nei processi biochimici cellulari a volte faremo riferimento a nucleosidi trifosfato, ricordando che sono formati da uno zucchero, una base azotata e 3 gruppi fosfato -ATP-).

Basi azotate degli acidi nucleici

Si distinguono in due gruppi: le purine (più grandi) e le pirimidine. Dalla diversa dimensione delle basi è partita la proposta della struttura del DNA che poi è stata effettivamente trovata. Tra le purine troviamo due basi, l'ADENINA e la GUANINA, tra le pirimidine troviamo tre basi, la TIMINA e la CITOSINA (presenti nel DNA), l'URACILE (che sostituisce la timina nell'RNA).

Dal punto di vista chimico, quindi, oltre che per lo zucchero, DNA e RNA differiscono anche per la base azotata appena citata.

In un nucleotide i tre componenti sono legati tra loro nel seguente modo: lo zucchero (struttura ciclica con ossigeno al vertice superiore, a 5 atomi di C, numerati in senso orario, l'ultimo fuori dall'anello, gli altri ai restanti vertici del pentagono), è legato al gruppo fosfato con un legame estere (legame fosfoesterico) che coinvolge il C₅; la base azotata è sempre legata al C₁ ed il legame che unisce l'azoto (N) al C è detto N-glicosidico (il legame glicosidico è quello tipico che coinvolge il C degli zuccheri).

La polimerizzazione, cioè la condensazione di più monomeri tra loro, è un processo che richiede energia (che vedremo da dove proviene). Essa avviene con l'aggiunta successiva di nucleotidi e con la formazione di un legame estere tra il fosforo e l'ossigeno di un carbonio dello zucchero, con liberazione di H₂O. Non è difficile ricordare quali sono gli atomi interessati; infatti, il C₁ è impegnato con la base azotata, il C₂ non ha ossigeno ed è quello che fa la differenza, il C₄ è escluso per ingombro sterico, C₅ è legato al fosforo e quindi rimane soltanto il C₃ che forma un legame estere tra l'ossigeno ed il gruppo fosfato del nucleotide successivo. Una volta che si è formato il legame ci accorgiamo che il gruppo fosfato è come se facesse da ponte tra due nucleotidi e si evidenziano due legami estere, uno quello del nucleotide e l'altro della polimerizzazione. Per questo si usa dire che c'è un legame "fosfo di estere" ma senza dimenticare che se si effettua l'idrolisi del DNA, il gruppo fosfato non resta isolato ma fa parte del nucleotide al quale rimane legato attraverso il C₅.

Per semplicità ricordiamo che la polimerizzazione avviene con un legame estere tra l'ossigeno del C₃ di un nucleotide ed il gruppo fosfato del nucleotide successivo.

Quindi, ogni volta il nuovo nucleotide viene aggiunto al C₃ e questo ci permette di dire che la direzione di sintesi è 5' - 3'. In realtà, se questa sequenza di nucleotidi è vera per l'RNA, per il DNA le cose sono molto più complesse. Studi chimico-fisici avevano già fatto capire agli studiosi (Watson e Crick) che la molecola del DNA era più complessa, si era intanto postulato che ci fosse un doppio filamento e non una singola sequenza di nucleotidi. In più, intorno agli anni '40, il chimico Chargaff, senza sapere ancora quale fosse la struttura tridimensionale del DNA, aveva voluto valutare la quantità delle basi. Gli interessanti risultati mostravano che la quantità di adenina era statisticamente uguale (solo una piccola differenza non significativa) a quella di timina, allo stesso modo, la quantità di guanina era uguale a quella della citosina. Inoltre, dagli studi di spettrometria, il diametro del DNA risultava costante. Ciò aveva già fatto pensare che, se era vero che il DNA era costituito da due filamenti e considerando il fatto che le purine e le pirimidine avevano dimensioni diverse, una purina fosse sempre accoppiata ad una pirimidine consentendo così il diametro costante (intuitivamente, avendo due molecole a due anelli e due molecole ad un anello, se la combinazione fosse casuale potremmo avere combinazioni di due, tre o quattro anelli e la molecola subirebbe continue variazioni di diametro). Ma questo lavoro di Chargaff sembrava dimostrare che non solo si appaiavano purine e pirimidine, ma che le basi fossero specificamente accoppiate: adenina con timina e guanina con citosina. Il motivo di questo appaiamento obbligato è dato da una necessità chimica, cioè dal numero di legami H che queste basi possono fare tra loro. Quando si va ad

analizzare il numero di legami H possibili, si vede che tra guanina e citosina possono esserci al massimo ³ legami H ed adenina e timina ne possono fare al massimo ² due. Il motivo per il quale l'appaiamento delle basi non è casuale ma obbligato è dato dal fatto che i legami H servono a stabilizzare la molecola e se non saturassimo tutti i legami H possibili la molecola sarebbe instabile. Immaginiamo infatti di legare una guanina con una timina: rispettiamo il rapporto purina/pirimidina ma la timina può fare al massimo due legami H mentre la guanina può farne tre e quindi rimarrebbe a disposizione un legame H della guanina, con instabilità della molecola perché qualunque altra sostanza potrebbe instaurare un legame H con la guanina. Al contrario, i legami tra adenina / timina e guanina / citosina rispettano la fisica della molecola che avrà sempre un certo diametro e la condizione chimica di saturazione del massimo dei legami H possibili. Questo legame obbligato prende il nome di **COMPLEMENTARITÀ** ed è importantissimo per la biologia perché dà la certezza matematica che tutte le volte che il DNA è usato come stampo (o per rifare se stesso o per dare origine alle proteine), la copiatura sarà perfetta (l'unione tra le basi è immediata; tutte le volte che apriamo la molecola del DNA, processo detto **DENATURAZIONE**, se non la manteniamo aperta con appositi provvedimenti, il DNA tende immediatamente a rinaturarsi. Non c'è quindi grosso rischio che si possano intromettere altre molecole. Qualche volta succede che un analogo delle basi, molecole simili alle basi stesse, sia incorporato nel DNA, costituendo un errore nella duplicazione del DNA).

Devi essere
Riassumendo, un singolo nucleotide si unisce ad altri nucleotidi formando un filamento di DNA che si appaia con un altro filamento mettendo all'interno le basi azotate (legate fra loro da legami H) e all'esterno lo scheletro zucchero-fosfato. I legami che si riscontrano nel DNA sono legami estere. N-glicosidici, legami H. *tra le due basi* Questi ultimi sono utilissimi perché essendo legami deboli, si rompono facilmente quando la molecola si deve aprire e, essendo tanti, rendono stabile la molecola. La parte variabile del DNA è rappresentata dalle basi, la cui sequenza porta l'informazione; quindi non è un caso che siamo all'interno, come non è un caso che il DNA sia un doppio filamento, al fine di proteggere la parte più preziosa della molecola e renderla meno soggetta a tagli, cambiamenti, attacchi da altre sostanze, ecc. Cominciamo perciò ad immaginare questa molecola come il risultato di un processo evolutivo (la prima molecola informazionale è stata sicuramente l'RNA e poi si è evoluto il DNA come molecola più idonea a questo scopo). Notiamo ancora che un filamento presenta ad un'estremità un fosfato 5' ed all'altra una estremità 3', il filamento appaiato è **ANTIPARALLELO**, cioè gli estremi appena citati sono opposti. I motivi dell'antiparallelismo dei filamenti è duplice:

1. i gruppi fosfati sono dissociati e la presenza di cariche negative vicine avrebbe creato repulsione (meno importante);
2. se si ribaltasse il filamento, i legami H non si formerebbero più, risulterebbero sfasati, pur mantenendo il rapporto adenina/timina.

Quindi, una molecola di DNA, costituita da due filamenti. Ritorniamo allo spessore della molecola che risulta di 20 angstrom (2 nm). Inoltre, la molecola forma un'elica, l'idea dell'elica è di Watson e Crick anche se poco tempo prima Pauling aveva descritto la struttura ad alfa elica delle proteine e

A

gruppi fosforici
carboni 3 dell
molecole

gli studi cristallografici (a livello fisico) indicavano che non si fosse in presenza di una struttura lineare. Perciò, la molecola si avvolge intorno ad un asse immaginario formando un solco maggiore ed uno minore che si ripetono costantemente: la distanza tra i solchi è costante, ed è di 34 angstrom cioè i solchi si ripetono ogni 10 nucleotidi. Esistono forme diverse di DNA: un DNA z, un a, la forma fisiologica definita b (elica destrorsa). La conformazione z si ritrova in brevi tratti, ha un'elica sinistrorsa ed ha proprietà antigeniche cioè induce la formazione di anticorpi in quanto non viene riconosciuto come specifico. Il DNA a si ritrova in condizioni chimico fisiche diverse cioè se si estrae il DNA e lo si pone in condizioni diverse. Di nostro interesse è solo la forma fisiologica b. Per concludere, dopo aver ricordato le differenze chimiche tra DNA e RNA (lo zucchero e le puracile), sottolineiamo quelle fisiche:

- il DNA è una molecola a doppio filamento con filamenti antiparalleli;
- l'RNA è una molecola a singolo filamento; ciò lo rende particolarmente utile per le funzioni che deve svolgere.

Lezione 7 (08/02/01)

Riprendiamo brevemente le differenze tra DNA e RNA:

- lo **zucchero**: È un ribosio nell'RNA mentre nel DNA è presente un desossiribosio.
 - la **struttura**: Il DNA è un doppio filamento con una struttura ad alfa elica destrorsa (si avvita verso destra). L'RNA è un singolo filamento con una struttura lineare non elicoidale.
- Inoltre, esistono differenti tipi di RNA:

| Tipi di RNA | Sigla | Tipi presenti nelle cellule | Traducibilità | Stabilità metabolica | Funzione |
|------------------------|-------|--|-----------------|----------------------|---|
| Ribosomiale | rRNA | 3 o 4 tipi | Non traducibile | Turnover lento | Sintesi proteine |
| Transfer | tRNA | Circa 35 tipi | Non traducibile | Turnover lento | Trasporto degli aminoacidi (AA) per la sintesi delle proteine |
| Messaggero | mRNA | Moltissimi (in relazione alle proteine sintetizzate dalle cellule) | Traducibile | Turnover rapido | Trasferimento dell'informazione per la sintesi delle proteine |
| Piccoli RNA plasmatici | | Vari tipi | Non traducibili | Turnover lento | Parte del "macchinario" di smistamento delle proteine |

ritroveremo tutti coinvolti nella sintesi delle proteine ovvero, con diverse funzioni, li ritroviamo nella trasformazione in proteine dell'informazione che è portata dal DNA.

RNA ribosomiale. La sigla è rRNA; se ne conoscono 3 (procarioti) o 4 (eucarioti) tipi che, forse vedremo, derivano tutti dalla maturazione di una singola molecola (ad esclusione di uno negli eucarioti); è un RNA non traducibile cioè, non dà origine a sintesi di catene polipeptidiche; come vedremo, lo ritroviamo nella sintesi delle proteine ed i vari tipi li ritroviamo nel **RIBOSOMA** che sono costituiti da due subunità, una maggiore ed una minore, e sono costituiti unicamente da un insieme di proteine ed RNA ribosomiale. L'informazione per questo RNA si trova su tratti specifici del DNA che poi vanno a costituire il **nucleolo**; riprenderemo questo concetto ma intanto è importante ricordare che l'RNA ribosomiale viene sintetizzato in zone particolari che vanno a costituire il nucleolo. Per turnover lento si intende che viene rinnovato poco, piuttosto stabile come molecola, cioè viene utilizzata più volte.

RNA transfer. Viene indicato come tRNA; sono circa 35 tipi ma diciamo che, e lo capiremo meglio in seguito, sono sicuramente più di 20 (ne esiste almeno un tipo per ogni AA) ma meno di vedremo poi il significato di termini come "tripletta" "codoni" e ne ripareremo trattando la sintesi proteica). La sua funzione è proprio quella di trasportare gli AA verso l'RNA messaggero

N.B. il tRNA è nel CITRIZASO

ed ha un ruolo centrale nella sintesi della catena aminoacidica; in altre parole sarà proprio questo RNA che sarà in grado di tradurre un'informazione che è data da una sequenza di nucleotidi, dai quali è costituito il DNA, in una sequenza di AA, dai quali è costituita una proteina. Anch'esso non è traducibile, cioè svolge la sua funzione come molecola di tRNA e non dà luogo a sintesi di catena peptidica.

• **RNA messaggero.** La sua sigla è mRNA; i tipi sono numerosissimi e sono in relazione al numero di proteine che viene sintetizzato nella cellula. Infatti, l'mRNA svolge la funzione di portare il messaggio cioè rappresenta una copia del DNA, una copia dell'informazione data dal DNA per una certa proteina, e deve essere tradotto in proteine. Ne ripareremo quando faremo la sintesi proteica, ma perché è necessario questo "messaggero"? Istitivamente verrebbe da collegarlo al fatto che il DNA è contenuto solo nel nucleo mentre la sintesi proteica avviene nel citoplasma con l'ovvia necessità di una molecola che faccia da intermediario (ma mRNA si ritrova anche in cellule più semplici che non hanno un nucleo definito, circondato da membrana). È invece verosimile pensare che l'mRNA è necessario perché è una molecola più semplice del DNA, è una singola elica, e quindi è immediatamente disponibile senza doversi aprire, senza interferenze con la catena complementare, soprattutto contiene l'informazione per una singola proteina (o al massimo 2-3 negli eucarioti) e non tutto il patrimonio genetico così come è per il DNA. Naturalmente, per quanto detto finora è una molecola traducibile, cioè da origine a sintesi di proteine; ha un turnover rapido in quanto viene usata poche volte e poi viene degradata. Questo proprio perché è una molecola di base, ha porta l'informazione e quindi se è stato commesso uno sbaglio nella sua formazione il turnover rapido porterà a poche proteine errate; inoltre, il turnover rapido mette al riparo dal fatto che possa essere degradato e quindi in qualche modo modificato il messaggio, ecc. In pratica, è un modo per assicurare che il messaggio sia il più possibile corretto e rimanga il più possibile integro.

piccoli RNA citoplasmatici. Sono coinvolti nella maturazione degli RNA messaggeri. Lo riprenderemo quando parleremo di sintesi proteica, ma accenniamo che l'mRNA che ritroviamo nel citoplasma non è identico a quello che si è formato sullo stampo di DNA, viene "maturato" come si dice, subisce delle modificazioni necessarie per il suo funzionamento.

Adesso facciamo un passo indietro per mostrare due esperimenti che hanno dimostrato senza ombra di dubbio che il DNA porta l'informazione genetica. La scorsa lezione accennavamo che l'interesse per la molecola del DNA è scaturito dal fatto che si era dimostrata la sua funzione. Fino agli anni 40 si immaginava che ci fosse una molecola che portasse l'informazione genetica, si sapeva che c'era una diversità, una specificità nei vari organismi, che questa specificità erano di origine genetica, e che erano ereditate; era evidente che un figlio somigliava alla specie a cui apparteneva ed in particolare alla famiglia da cui originava e tuttavia non era identico ai genitori. Quindi, c'era già un'idea che ci fosse qualcosa che venisse trasmesso di generazione in generazione, che portasse le informazioni generali per la specie (lo stesso "stampo") ed in più la diversità tra individuo ed individuo. Era stato già messo in relazione che ci fossero delle proteine coinvolte in errori genetici: Mendel verso il 1910 aveva studiato le malattie metaboliche cioè quelle che hanno origine dalla mancanza di un enzima, di una proteina con l'interruzione di una catena metabolica. Si era visto che

queste malattie erano ereditarie facendo pensare a qualcosa che venisse ereditato e che facesse da stampo per le proteine. Tuttavia la discussione era ancora molto aperta: alcuni pensavano che fossero le proteine stesse ad essere ereditate dai genitori, che non ci fossero molecole intermediarie. Negli anni '40, fu effettuato un primo esperimento chiarificatore (in realtà sfruttava un'idea della fine degli anni '20), che chiarì senza dubbio che il DNA era il fattore dell'informazione genetica.

La definizione di "portatore" dell'informazione viene ancora usata per il DNA anche se non è molto corretta in quanto il DNA è l'informazione. Tuttavia la dicitura è ancora in uso, anche da parte degli addetti ai lavori; a volte si dice che i cromosomi "portano" i geni, ma effettivamente essi sono i geni, essendo la sequenza di una molecola di DNA. Questa primo modo di dire è stato dovuto al fatto che, pur non sapendo come funzionasse il DNA, non sapendo nulla della sintesi proteica, si riuscì a mettere in correlazione il fatto che il DNA era coinvolto nell'ereditarietà.

Esperimento I

Fu iniziato da Griffith nel '28 che ne pubblicò anche i risultati, senza però saper dare una spiegazione. Negli anni '40, Avery, McCleod e McCarty ripresero l'esperimento e, con procedure più idonee, riuscirono a completarlo e a darne una spiegazione completa.

Esperimento di Griffith. Si basa sul fatto che esistono due ceppi di batteri entrambi della polmonite (diplococcus pneumoniae), che si comportano in maniera diversa: il ceppo S (liscio), che iniettato nel topo ne provoca la morte, il ceppo R (rugoso), che iniettato non provoca la morte del topo. La differenza tra questi due ceppi sta nel fatto che l'S ha la cellula rivestita da una capsula (proteica) che riesce a nascondere gli antigeni di membrana per cui la cellula ospite non riconosce il batterio come elemento estraneo e quindi non attiva la risposta anticorpale. Quindi, il batterio si moltiplica e causa la morte dell'animale. Al contrario, il ceppo R non ha questa capsula, viene riconosciuto dall'organismo ospite, provoca la risposta anticorpale di difesa dell'organismo e combatte l'infezione (l'animale non muore). Si notò che uccidendo le cellule S con il calore, esse perdevano la capacità di infettare (venivano distrutte le proteine della capsula ed il ceppo diventava innocuo).

Inoltre, si effettuò una miscela di cellule del ceppo R vive e di cellule del ceppo S uccise che, iniettata, provocò la morte del topo. Griffith concluse che esisteva un "principio trasformante", cioè qualcosa che riusciva a passare dalle cellule S alle cellule R, rendendole virulente.

È chiaro che questo "principio trasformante" che trasforma le cellule R in S deve essere un qualcosa che porta l'informazione per la capsula e quindi individuare la molecola "trasformante" significa individuare la molecola che porta l'informazione per i geni.

Avery, McCleod e McCarty, con i mezzi in loro possesso negli anni '40, attraverso due esperimenti piuttosto complessi riuscirono ad isolare le varie molecole, soprattutto DNA e proteine, ed ad iniettare non più l'intero batterio S ma la singola molecola (DNA o miscela di proteine), insieme alle cellule R. Si accorsero che la miscela di proteine non dava origine alla trasformazione del ceppo R (anche perché proteine distrutte al calore non funzionavano), mentre la miscela DNA del ceppo S + batteri del ceppo R dava origine alla trasformazione di R in S cioè il ceppo R risultava patogeno.

Oggi noi sappiamo che i batteri possono scambiarsi dei tratti di DNA: gli scambi quindi devono esserci qualcosa, nelle cellule uccise al calore, capace di convertire cellule non virulente nella forma letale.

prendono il nome di parasessualità batterica ed in modo particolare in questo caso si parla di TRASFORMAZIONE intendendo un processo che permette ai batteri di scambiarsi materiale genetico (esiste anche la TRASDUZIONE di cui parleremo a proposito dei virus e la COMMUTAZIONE (?) di cui parleremo poco).

In questo modo, indirettamente era stato dimostrato che il DNA era il latore dell'informazione genetica. In biologia sperimentalmente c'è spesso questa differenza tra una spiegazione *deduttiva*, cioè qualcosa che si deduce da altro, e delle prove che sono *dirette* cioè non lasciano dubbi.

L'esperimento appena citato era deduttivo ma mancava la prova diretta.

Esperimento 2

La prova diretta arrivò con altri due ricercatori, Hershey e Chase, con esperimenti effettuati negli anni '50. Tali esperimenti non lasciarono dubbi (quando un esperimento ha questa caratteristica si usa definirlo "elegante"). Vennero effettuati sui batteriofagi, di cui non abbiamo ancora parlato perché diciamo che esistono dei virus che infettano tutte le cellule, inclusi i batteri. Questi ^{VIRUS} batteri, che si chiamano batteriofagi, lasciano fuori una serie di strutture ^{PROTEICHE} proprie e fanno penetrare all'interno della cellula ospite solo il materiale genetico. Il materiale genetico così penetrato sfrutta la cellula ospite duplicandosi, producendo le proprie proteine e riformando le molecole infettanti che poi fuoriescono per andare ad infettare altre cellule. Il punto basilare era che la molecola che entra nella cellula ospite deve avere le informazioni per ricostruire tutto. Perciò si deve riuscire ad individuare la molecola che entra. Ciò fu fatto marcando selettivamente il DNA (con il fosforo) e le proteine (con lo zolfo). Era ovvio che laddove avessimo ritrovato la radioattività, dentro o fuori della cellula, avremmo saputo cosa entrava e cosa rimaneva fuori.

Per prima cosa fu marcato solo il DNA di un ceppo virale con il ^{32}P -fosforo- (marcare vuol dire far formare quella molecola, proteina o acido nucleico, in presenza di un atomo che quella molecola incorpora, che sia radioattivo, per esempio, se si fa crescere un batterio per almeno tre generazioni in un mezzo nutritivo nel quale si mette P radioattivo, dopo qualche tempo tutti i nucleotidi che si formano, avendo a disposizione solo P radioattivo saranno costretti ad incorporarlo, marcando così la molecola del DNA. Per le proteine, si fa avvenire la sintesi proteica in presenza di zolfo radioattivo). Quando si andò a ricercare la radioattività si vide che si trovava all'interno della cellula batterica. La controprova fu che marcando le proteine con zolfo e seguendo la radioattività, ci si accorse che in questo caso la si ritrovava fuori dalla cellula mentre al suo interno non se ne ritrovava. La conclusione, questa volta senza ombra di dubbio, fu che ad entrare nella cellula batterica era il DNA e poiché la molecola che entrava doveva avere tutta l'informazione possibile per ricostruire il virus, il DNA portava l'informazione genetica.

Rimaneva solo un dubbio in quanto si sapeva che alcuni virus non contengono DNA (vedremo che i virus contengono sempre una sola molecola di acido nucleico che può essere DNA o RNA) e quindi ci si domandava se anche l'RNA poteva essere il latore dell'informazione genetica. Un esperimento effettuato su virus ad RNA ha dimostrato che effettivamente l'RNA di questi virus porta l'informazione genetica. Questa è un'eccezione ^{CNS} non appartiene al mondo dei viventi ed il virus è un'entità biologica (parassita obbligato), non classificabile nei regni che abbiamo visto, in quanto non possiede membrana plasmatica, cioè di un'organizzazione cellulare.

Lezione 8 (13/02/01)

Riferiamoci alle misure a partire dalle cellule per arrivare ai vari organismi ed anche ai mezzi con i quali poterli studiare. Cominciamo con i viventi più grandi, visibili ad occhio nudo, come le piante, gli animali, l'uomo, ancora animali ed alcune uova che, pur essendo delle cellule, sono macroscopiche e quindi visibili ad occhio nudo.

Entriamo poi nel mondo visibile con il microscopio ottico (M. O.) che ci permette di vedere misure che vanno *dal millimetro* (che con un po' di fatica può anche essere visto con uno stereoscopio, apparecchio diverso dal M. O.) al *micron* (1/1000 di millimetro).

- In questo range di misure rientrano tutte le cellule animali e vegetali, le loro dimensioni sono comprese tra 10 e 100 micron, con una media per il mondo animale di 40 micron (dovuta alla differenza tra le varie specie e tra i vari tessuti negli organismi pluricellulari);
- inoltre, possono essere visti la maggior parte dei batteri (procarioti) la cui grandezza va da 1 a 10 micron,
- ancora, è possibile vedere dimensioni di 1-2 micron, cioè la struttura (non l'ultrastruttura) di alcuni *organelli cellulari* come i cloroplasti ed i mitocondri. Ciò vuol dire che con un M. O. ad un ingrandimento molto buono vediamo le strutture ma non ne distinguiamo i particolari.

Per poter vedere le *ultrastrutture* degli organelli citoplasmatici, cloroplasti, mitocondri, apparato del Golgi ecc., dobbiamo usare il *microscopio elettronico* (M. E.) che copre fino a 100 micron, ma soprattutto *scende fino a 0,1 nanometri* (= 1 angstrom). Il nanometro è la millesima parte del micron (la milionesima parte del millimetro) e l'angstrom è la decima parte del nanometro.

Con l'angstrom si misurano tutti gli atomi, le molecole più piccole (1 nm o 10 angstrom), al massimo le macromolecole perché saliamo già a dimensioni di 0,1 micron e quindi utilizziamo altre unità di misura.

In sintesi, ~~se volessimo fare una classificazione in base all'unità di misura diremo che gli atomi si misurano in angstrom~~ (al massimo in nanometri, come abbiamo visto per il DNA il cui spessore è di 2 nm o 20 angstrom); ~~quando si comincia a parlare di virus (come il fago T2), e di organelli cellulari, possiamo usare il nanometro~~ e ci possiamo spingere fino al micron perché siamo nell'ordine di 1-2 micron. ~~Quando parliamo di cellule siamo obbligati ad usare il micron che rappresenta l'unità di misura specifica delle cellule~~ (il nanometro è troppo piccolo, il millimetro troppo grande). ~~Come abbiamo detto, le cellule procarioti sono quelle più piccole e variano da 1 a 10 micron, quelle degli eucarioti sono più grandi con un range compreso tra 10 e 100 micron.~~

Dicevamo inoltre che questo range è abbastanza ampio e ciò è dovuto al fatto che abbiamo differenti misure per le varie specie e differenti misure e forme per i vari tessuti quando parliamo di organismi pluricellulari. Ecco alcuni esempi di cellule con morfologie differenti: le cellule (c.) procarioti sono decisamente inferiori come dimensioni anche alla più piccola c. eucarioti (quella del lievito che appartiene al regno dei funghi). Le grandezze delle c. eucarioti sono molto variabili: una c. di un fungo è decisamente più piccola di una cellula vegetale e un'alga, protista autotrofo, si colloca più o meno a metà tra queste. Quando passiamo alle c. animali, la grandezza è molto

variabile (es. c. epatica, c. nervosa, c. uovo); da qui la necessità di parlare di grandezza media per le c. umane ed animali. Si può notare che anche la morfologia è molto diversa ed è fondamentale per la funzione della cellula; infatti, quando si mettono cellule in coltura, ci si accorge che hanno perso il loro differenziamento (si sono sdifferenziate) proprio dalla perdita della loro morfologia tipica.

Apriamo una parentesi per dire che quando parliamo di organismi pluricellulari la principale differenza con quelli unicellulari è che i primi specializzano le proprie c. e si comincia a parlare di organizzazione tissutale. Ovviamente, le c. che appartengono allo stesso tessuto hanno le stesse caratteristiche e c. che appartengono a tessuti diversi hanno caratteristiche diverse. A ciò si arriva in quanto un organismo pluricellulare che si riproduce (quasi sempre per via sessuale), deriva dall'unione di 2 c., dette gameti, che formano uno zigote, un'unica c. che ha tutte le caratteristiche della specie. Da quest'unica c. si arriva non solo ai milioni di c. che costituiscono un organismo (attraverso la moltiplicazione), ma anche alla loro specializzazione. Perciò, ad un certo punto dello sviluppo dell'embrione e poi del feto le c. cominciano a specializzarsi o, come si dice, a differenziarsi. Ciò avviene, come vedremo, mediante la *regolazione genetica*, cioè, mentre alcuni geni continuano a funzionare, altri cessano di produrre proteine. Per es., una cellula muscolare, oltre ad un funzionamento generale, si specializzerà a produrre proteine che servono per la contrazione, e così via. Quindi, quando si arriva alla nascita, l'organismo è già pronto con i propri apparati, organi, tessuti e c. specializzate. In vivo, la specializzazione è mantenuta tramite una comunicazione costante tra c. attraverso messaggi che arrivano a geni che vengono attivati o disattivati. Quando però portiamo la c. in vitro, cioè la coltiviamo al di fuori dell'organismo, in seconda dei vari tipi di cellule può capitare che la mancanza della comunicazione con altre parti ad una *sdifferenziazione*. Per es., metto in coltura c. nervose e, se non fornisco determinati supporti chimici di appoggio, dopo qualche giorno perdono la loro caratteristica divenendo normali c. con il patrimonio genetico iniziale ma senza il funzionamento specifico che avevano come c. specializzate. Il primo campanello di allarme dello *differenziamento* è la perdita della forma (oltre ovviamente alle indagini chimico-fisiche ed istologiche che possono essere fatte per determinare se sono ancora prodotte le proteine specifiche).

La forma è importante perché contribuisce a favorire certe funzioni: non è un caso che la c. nervosa sia ricca di prolungamenti (dendriti e assone) che sono necessari per prendere contatti tra le varie cellule e quindi per la trasmissione degli impulsi nervosi. Perdendo questa caratteristica morfologia si perde la capacità di contatto tra le c. e quindi la capacità di svolgere il proprio lavoro. Così, una c. muscolare appare piuttosto allungata con la sua capacità di contrarsi e rilasciarsi che assicura la funzione muscolare. La c. uovo è molto grande rispetto alle altre, è tondeggiante e anche qui possiamo identificare una funzione visto che quando si formerà lo zigote e dovrà andare nell'utero dovendo spostarsi e la forma può favorire la precipitazione verso quest'ultimo; soprattutto è molto grande perché, come vedremo quando studieremo la gametogenesi, raccoglie il citoplasma di ben 4 cellule (tutto il citoplasma della divisione meiotica, processo che porta alla formazione dei gameti nell'uomo). Infatti, la proporzione tra nucleo e citoplasma è molto diversa in questa c. rispetto alle altre. Nella c. vegetale abbiamo una forma piuttosto poligonale e rigida, la forma assicura una stretta adesione tra le c. (la ritroviamo anche nel tessuto epiteliale proprio perché questo deve fare uno strato continuo e compatto), con l'aggiunta della rigidità perché la c. vegetale, così come quella dei funghi, dei protisti, dei procaritoti ha una parete cellulare (struttura ovviamente diversa dalla membrana plasmatica). L'unico Regno a non avere parete cellula è quello animale.

ORGANIZZAZIONE CELLULARE

La membrana plasmatica (m. p.) è la struttura che identifica una c. e che quindi indirettamente identifica un vivente (indirettamente perché abbiamo già detto che la c. è l'unità strutturale e funzionale del vivente). Descriveremo il *modello a mosaico fluido*. La m. p. è costituita da un doppio strato fosfolipidico che costituisce la struttura di base, quella che da la continuità alla m. p. e le consente di esporre all'ambiente acquoso le sue parti polari. Sappiamo che l'ambiente acquoso si trova sia all'interno che all'esterno della c. quindi, l'unico modo per poter esporre parti polari è quello di avere un doppio strato con le code idrofobiche rivolte verso l'interno. Questo modello consente una grande stabilità alla m. p. perché se l'acqua l'attraversa non si ferma mai nello strato interno idrofobico, garantendo una notevole compattezza e quindi protezione a ciò che è contenuto all'interno della c. Contemporaneamente, la m. p. deve assicurare la comunicazione tra c. e ciò avviene grazie al fatto che è semipermeabile, cioè selettivamente permeabile (consente di far entrare ed uscire solo determinate sostanze).

Al doppio strato lipidico si aggiunge la presenza di alcune proteine che sono le protagoniste più importanti della funzione della m. p. se i fosfolipidi garantiscono la struttura, le proteine in modo particolare ne garantiscono la funzione. Quindi, le proteine della m. hanno diverse funzioni di trasporto, recettori, antigeni. Va aggiunto che molte di queste funzioni sono svolte da corte catene carboidratiche legate alle proteine a costituire delle glicoproteine o legate ai lipidi di struttura a costituire dei glicolipidi. Se quindi ci vogliamo riferire ai componenti della m. p. sia a livello strutturale che funzionale, diremo che la m. p. è di natura glico- lipo- proteica; se invece parliamo proprio della struttura di base, ci riferiamo soltanto ai fosfolipidi.

Inoltre, le proteine di membrana possono essere integrali, quando attraversano completamente il doppio strato fosfolipidico, o periferiche, quando non lo attraversano. Ricordiamo ancora che le proteine sono anfipatiche e quindi dispongono i gruppi polari verso l'ambiente acquoso mentre la porzione apolare rimarrà immersa nel doppio strato fosfolipidico. Ovviamente, le proteine periferiche saranno essenzialmente polari, non attraversando completamente la m. p.

Inoltre, osservando la m. p. ci si accorge che le corte catene carboidratiche sono presenti solo su un versante; infatti, un'altra caratteristica della m. p. è l'asimmetria perché, nonostante sia l'ambiente interno sia quello esterno siano acquosi, sono tuttavia diversi in quanto uno è ambiente intracellulare mentre l'altro è extra cellulare. Quindi, i due strati della m. p. prendono contatto con ambienti diversi (uno interno e l'altro esterno) e non è un caso che le catene carboidratiche siano tutte rivolte verso l'ambiente esterno perché il più delle volte si comportano da recettori (riconoscono le molecole che devono entrare) oppure devono avere funzioni antigeniche cioè caratterizzano la cellula (funzioni che non servono nei confronti dell'ambiente intracellulare).

La terza caratteristica della m. p. è la fluidità. Essa è data dal fatto che le code idrofobiche si possono muovere, fluttuare e quindi garantire il passaggio per esempio di alcune sostanze. Nelle sole c. eucariotiche oltre ai fosfolipidi troviamo anche la molecola del colesterolo che assicura proprio una maggiore fluidità della membrana.

Riassumendo, la m. p. ha le seguenti funzioni: protezione della c., cioè garantire l'individualità cellulare, l'integrità chimica (che tutte le reazioni biochimiche rimangano circoscritte alla c.), ma contemporaneamente la necessità di comunicare con le altre c.

La comunicazione può avvenire in vari modi, con un passaggio selettivo di molecole (il trasporto di membrana di cui parleremo), oppure garantire la ricezione dall'esterno di stimoli che originano il differenziamento e l'adattamento. Inoltre, la m. p. garantisce un'integrazione funzionale ed una compartimentazione: la membrana cioè può essere utilizzata come supporto, come ancoraggio per determinate reazioni metaboliche. Ciò consente anche una maggiore integrazione cioè, se servono dieci enzimi per una certa reazione, se essi sono tutti raggruppati in un punto la reazione avverrà molto più rapidamente che se fossero sparsi nel citoplasma. La conseguenza diretta di questo è la presenza di compartimenti all'interno della cellula eucariotica cioè, la presenza di organelli rivestiti di membrana (detti membranosi), come conseguenza diretta della necessità di integrazione o comunque del fatto che moltissime reazioni biochimiche utilizzino la membrana come supporto; nei procarioti sarà la membrana cellulare, negli eucarioti gli organelli fatti di membrana che assicurano alla c. compartimenti specializzati ed il motivo essenziale per cui si sono formati è legato alla necessità di integrare le fra loro varie reazioni.)

Trasporto di membrana

Parlando del passaggio dell' H_2O , abbiamo definito l'osmosi come il passaggio di H_2O verso ambienti a maggiore concentrazione di soluti in quanto la c. tende all'isotonia.

Ora parleremo di trasporto di molecole che non siano H_2O . Si distinguono due tipi di trasporto:

- **passivo**: non si consuma energia perché avviene secondo gradiente di concentrazione, cioè le molecole si spostano verso la concentrazione minore ed il loro trasporto avviene spontaneamente (diffusione semplice). Qualche volta, questo trasporto può essere mediato da proteine ed in tal caso parliamo di diffusione facilitata, ma sempre senza consumo di energia e seguendo il gradiente di concentrazione.
- **attivo**: consuma energia ed il passaggio di molecole avviene contro gradiente di concentrazione; è sempre mediato da proteine (carriers) che riconoscono le molecole da trasportare fuori o dentro la c.; da notare che in questo caso la c. compie uno sforzo energetico per mantenere un dislivello nella concentrazione di alcune sostanze. Abbiamo già visto, parlando dei sali minerali, che esiste una diversa concentrazione di Na (maggiore fuori), di K (maggiore dentro) e di altri ioni, tra l'esterno e l'interno della c., con formazione di una differenza di potenziale (differenti ioni con differenti cariche che si localizzano fuori e dentro la m. p.) che è importante ad esempio per il trasporto di alcuni impulsi, come quello nervoso. In altri organelli, come i lisosomi, c'è la necessità di accumulare protoni per creare un ambiente acido. Parleremo di pompa Na / K e parleremo di pompa protonica.

Il trasporto attivo può essere di diversi tipi: si parla di UNIPORTO quando il trasporto avviene in un solo verso, cioè c'è una proteina che si incarica di trasportare una molecola attraverso la m. p.; si parla di COTRASPORTO quando la stessa proteina trasporta due tipi diversi di molecole. In modo particolare parliamo di SIMPORTO se le due molecole vanno nello stesso verso (esterno o interno)

o di ANTIPORTO quando le due molecole vanno in senso opposto (come nel caso della pompa Na/K in cui la proteina ha siti di riconoscimento diversi per i due ioni che si rendono disponibili con un cambio di conformazione per il trasporto del Na verso l'esterno e del K verso l'interno).

Da notare che le pompe non solo accumulano ioni verso la loro maggiore concentrazione ma contrastano anche l'azione dell'osmosi che tenderebbe a diluire.

Più avanti parleremo di un altro tipo di trasporto (endocitosi, esocitosi e fagocitosi) di membrana che coinvolge molecole di altissimo peso molecolare che quindi non riescono ad attraversare la m. p., o quantità importanti di soluti.

Cellula procariote

non c'è la membrana nucleare

una cellula procariote

Il componente quantitativamente più importante è l'H₂O (fino al 70%). Partiamo dalla membrana plasmatica o plasmalemma per procedere prima verso l'interno e poi descrivere alcune strutture presenti all'esterno. La m. p. è stata appena descritta, quindi descriviamo l'interno della cellula e vi troviamo una sostanza gel/sol (vischiosa), il citoplasma, che riempie tutta la cellula; in esso avvengono anche alcune funzioni ed è praticamente l'unica sostanza presente. Inoltre, si identifica una zona, detta nucleotide, nella quale si trova localizzato il DNA della cellula (uguale a quello descritto) che ha la particolarità di essere una singola molecola circolare. Sono poi presenti delle piccole molecole di DNA accessorio dette plasmidi, sono estremamente importanti perché possono contenere dei geni specifici, per es. geni per la resistenza agli antibiotici, e la cosa importante è che durante la CONIUGAZIONE può accadere che i batteri si scambino questi plasmidi. Ciò significa che se in una colonia di batteri qualcuno presenta questi fattori di resistenza, questi si selezioneranno al momento della somministrazione sconosciuta di antibiotici, rendendo il battere insensibile al farmaco. Proseguendo, l'unico organello citoplasmatico presente nella cellula procariote è il ribosoma, costituito da RNA ribosomiale e proteine, e coinvolto nella sintesi proteica. Da notare che il ribosoma non è circondato da membrana e questo conferma ancora una volta che all'interno della cellula procariote non troviamo organelli membranosi ed in senso più ampio non troviamo compartimentazioni. Sicuramente questa cellula è in grado di svolgere tutte le funzioni di un organismo, i procarioti sono tutti unicellulari e laddove serve il supporto di una membrana come supporto per certe reazioni, viene utilizzata la m. p. che a volte si può ripiegare verso l'interno per aumentare la propria superficie (alcuni testi riportano il vecchio termine "mesosomi" per indicare questi ripiegamenti).

Andando verso l'esterno, troviamo la parete cellulare, struttura presente in tutti i Regni, tranne quello animale. I batteri possono averne 1 o 2: la prima è uno strato di peptidoglicani (zuccheri e proteine), mentre la seconda, più esterna è costituita essenzialmente da lipopolisaccaridi (zuccheri coniugati con lipidi). La presenza di una o due pareti è molto importante per classificare i batteri e per la successiva cura farmacologica:

I gram + (positivi) hanno una sola parete (il colorante riesce ad entrare ed a colorare la cellula);

I gram - (negativi) hanno due pareti, con lo strato più esterno costituito di lipoproteine e polisaccaridi.

Ricordiamo che la parete batterica non è presente solo nei micoplasmi e ciò ci riporta all'importanza della parete batterica: essa serve a contrastare la pressione osmotica ed è quindi presente in tutti quegli organismi che si trovano in un ambiente che presenta una tonicità diversa dalla propria e quindi devono sopportare questa pressione osmotica e se ne devono difendere. Perciò la troviamo nei batteri che si trovano in liquidi non a loro isotonici, nei protisti, nei funghi, nelle piante, ma non la troviamo negli animali che solitamente non sono a contatto con ambienti a tonicità diversa dalla propria.

Per concludere, la capsula esterna che può esserci o non esserci (diplococco) ed è associata ad una maggiore patogenicità del batterio.

Questa è la struttura più semplice della c. batterica, complicata poi all'esterno dalla presenza di flagelli e di pili.

Flagelli: Sono strutture lunghe che servono a garantire il movimento della c. procariote. Sono estremamente più semplici di quelli degli eucarioti essendo costituiti da un'unica proteina che prende il nome di *flagellina* che con un movimento essenzialmente ondulatorio consente il movimento della c. procariote. Contemporaneamente, ci sono anche delle strutture più corte e rigide a forma di cilindretto, che prendono il nome di pili.

Pili: Sono il risultato dell'assemblamento di proteine. Anche in questo caso la proteina è unica e prende il nome di *pilina*. I pili servono soprattutto ad attaccare il batterio ad una fonte nutritiva e servono anche al processo della CONIUGAZIONE, cioè al passaggio di materiale genetico da un batterio all'altro.

Infine, i batteri possono avere forme diverse:

- i bacilli hanno struttura allungata, ovoide, hanno dimensioni entro i 5 micron;
- i cocchi hanno forma tonda e spesso sono raggruppati a due (diplococco) o più insieme;
- gli spirilli, hanno forma spiralizzata ed hanno dimensioni più piccole degli altri.

La riproduzione dei batteri è ASESSUATA, avviene per SCISSIONE, cioè la c. procariote innanzitutto duplica il proprio DNA circolare; la duplicazione avviene ancorando il DNA alla m. p. e questo facilita un meccanismo di duplicazione che si chiama "forma a teta" (di cui ripareremo). Dopo che il DNA si è duplicato comincia a formarsi un setto di separazione, la c. si divide in due ed abbiamo quella che viene definita riproduzione per scissione. Ricordiamo ancora che esiste il fenomeno della parasessualità batterica che è l'unica possibilità che hanno i batteri di scambiarsi materiale genetico. Questo ci fa capire quanto è importante lo scambio di materiale genetico se già organismi semplici come i batteri hanno evoluto un meccanismo per effettuarlo.

Tre meccanismi della parasessualità batterica sono:

- 1) coniugazione, che avviene attraverso i pili;
- 2) trasformazione, il passaggio di alcuni principi trasformanti tra un batterio e l'altro;
- 3) trasduzione (che vedremo in maniera più dettagliata) che avviene con la mediazione dei virus.

BATTERI - duplicazione del DNA circolare, forma di duplicazione
duplicazione a teta

CONIUGAZIONE - + batteri di duplicazione;
trasmissione di DNA

Lezione 9 (20/02/01)

CELLULA EUCARIOTE

Ricordiamo le differenze tra la c. procarioti e quella eucarioti: innanzitutto, il nome si riferisce alla mancanza nelle c. procarioti della membrana nucleare. Tuttavia la differenza è molto più ampia, riguardando tutte le membrane interne: infatti, nella c. procariote non c'è compartimentazione interna, cioè all'interno della c. non si riscontrano dei compartimenti delimitati da membrana. Quindi, manca una delle funzioni della membrana che è quella di suddividere la c. in tante zone funzionali. Ciò non vuol dire che la c. procariote non sia in grado di avere tutte le funzioni che ha la c. eucariote ma significa che laddove la c. eucariote, più evoluta, utilizza un particolare settore, la c. procariote utilizzerà la membrana plasmatica. Questo è uno dei motivi per cui spesso la m. p. dei procarioti è invaginata cioè ripiegata verso l'interno e questo vedremo potrebbe essere stato un momento evolutivo da cui è partita la c. eucariote. Da questi presupposti ci aspettiamo che una c. eucariote sia più complessa, più articolata di quella procariote.

Per prima vediamo una cellula animale i cui organelli sono presenti anche nelle altre c. eucarioti, cioè c. vegetale, funghi e protisti, con la differenza che la c. animale è l'unica ad essere priva di parete cellulare. Quindi, non prendiamo la parete cellulare come elemento distintivo dei procarioti ma prendiamo la sua assenza come elemento distintivo della c. animale. Perciò, l'unica delimitazione dall'ambiente esterno è data dalla m. p., che abbiamo già descritto:

All'interno troviamo anche qui una soluzione gel/sol che si chiama citoplasma, molto ricco di H_2O , in cui sono immersi degli organelli ed in cui esiste una rete di fibre con varie funzioni, detta citoscheletro. Accenniamo ai vari organelli che descriveremo mano a mano:

Mitocondri. Di forma ovoidale, sono molto simili ai cloroplasti (della c. vegetale) essendo formati da due membrane, una esterna ed una interna. Nel mitocondrio la membrana interna è molto frastagliata, molto ripiegata e forma le cosiddette *creste mitocondriali*, molto importanti perché su di esse si svolge la fosforilazione ossidativa cioè quel processo che porta alla formazione dell'ATP. Il fatto che la membrana interna dei mitocondri sia così ripiegata rappresenta un meccanismo per aumentarne la superficie e quindi per dedicare una maggiore superficie alle funzioni che vi si devono svolgere. Pur essendo diversi dai cloroplasti ed avendo funzioni totalmente diverse, mitocondri e cloroplasti hanno un'origine comune per la quale si fa riferimento alla teoria SIMBIONTICA (da simbiosi) che prevede la derivazione di questi organelli da organismi ancestralmente autonomi (ne ripareremo). I motivi per cui si fa riferimento a questa teoria sono:

- 1) la presenza di una doppia membrana, che fa immaginare l'inglobamento di una cellula da parte di un'altra e soprattutto,
- 2) la presenza di un DNA autonomo (il DNA mitocondriale) che è di tipo batterico cioè una molecola di DNA circolare.

Da notare che nelle nostre c. i mitocondri sono tutti di origine materna, al contrario del DNA genomico che è ereditato per metà dal padre e per metà dalla madre. Quindi, è facilmente

utilizzabile per tutti i riconoscimenti che si basano sul DNA (cadaveri, figli, ecc.) in quanto l'analisi del DNA mitocondriale è molto più facile di quella del DNA genomico.

~~I mitocondri sono adibiti al processo della respirazione cellulare (costituita dal ciclo di Krebs e dalla fosforilazione ossidativa) e quindi, sono presenti in tutti gli organismi eucarioti aerobi.~~

~~Il DNA mitocondriale è immerso in una sostanza gel/sol che somiglia molto al citoplasma e che viene chiamata *matrice mitocondriale*. Insieme al DNA, nei mitocondri è presente un intero apparato per la sintesi proteica: ciò conferma ancora una volta che questi organelli derivano da c. autonome.~~

membr. plasm.

Reticolo endoplasmatico

~~Ne esistono due tipi: il liscio (REL) ed il rugoso (REG). La differenza, oltre ad essere funzionale è strutturale in quanto la superficie del REG è circondata da ribosomi, da cui il suo nome. Ovviamente, il REG serve per la sintesi proteica, come conferma la presenza dei ribosomi. In realtà sappiamo che sul REG vengono sintetizzate solo le proteine definite di *secrezione* cioè quelle che o sono proteine di membrana oppure non svolgono la loro funzione nella c., dovendo fuoriuscirla ed andare a compiere la propria funzione in altre strutture cellulari. In tutto il citoplasma sono presenti i cosiddetti *ribosomi liberi* che fanno parte di quell'apparato di sintesi proteica che riguarda la sintesi di tutte le proteine che vengono utilizzate dalla c. stessa e quindi proteine non di secrezione.~~

~~La c. vegetale differisce per la presenza della *parete*, una struttura un po' più rigida che si trova all'esterno della m. p. e che serve a proteggere la c. dalla pressione osmotica. Presenta tutti gli organelli che abbiamo nominato per la c. animale ed in più abbiamo i cloroplasti, con una struttura a doppia membrana di cui quella interna ripiegata a formare dei *tilacoidi* (verificare). Sono utilizzati dalle c. eucarioti per svolgere la *fotosintesi*, un processo biochimico che consente di costruire in maniera autonoma molecole organiche, in particolare glucosio. Perciò, troviamo i cloroplasti in tutte le c. eucarioti in grado di fare fotosintesi quindi anche nei protisti autotrofi cioè le alghe (non nella c. animale e nei funghi). Naturalmente nella c. vegetale sono presenti anche i mitocondri che hanno funzioni diverse perché i cloroplasti producono glucosio mentre i mitocondri lo degradano per ricavare energia. Un'altra differenza della c. vegetale è la presenza di un *grosso vacuolo* pieno di acqua che si allarga e si restringe per regolare la pressione osmotica.~~

~~Andiamo adesso nei dettagli alcune strutture citate cominciando dal *citoscheletro*.~~

~~È una rete di fibre presente nella c. che garantisce innanzitutto la forma, la morfologia (che abbiamo detto essere molto importante per la funzione della c.), ma anche il *movimento* delle c. in particolare agli organismi unicellulari che abbiamo anche tra gli eucarioti (nei protisti abbiamo solo organismi unicellulari con qualche accenno di colonia). Inoltre, il citoscheletro garantisce anche la *stabilità* agli organelli in quanto, attraversando tutta la c., mantiene stabili ed in sede gli organelli *citoplasmatici* per evitare che possano "navigare" nella massa gel/sol e restino fermi e ben organizzati (la c. è una struttura organizzata ed ordinata). In più il citoscheletro garantisce la *direzione del traffico interno*: con ciò intendiamo che tutte le volte che una struttura cellulare, come i cromosomi o gli organelli, si devono spostare (come nella divisione cellulare in cui gli~~

VACUOLO: vescicola in cui si accumula acqua
o prodotti metabolici di scarto che lo pianta
non serve ad eliminare

U.E. è presente anche in diverse cellule animali

organelli si devono dividere tra le due cellule). Il loro movimento è diretto dal citoscheletro per evitare che ci siano problemi di suddivisione.

Struttura del citoscheletro. Abbiamo 3 tipi di fibre:

- i **microtubuli**, costituiti da una proteina formata da due monomeri (struttura quaternaria) la α -tubulina e la β -tubulina, costituiscono il microtubulo che ha la forma di un cilindro cavo con un diametro di 25 nm;
- i **microfilamenti** sono decisamente più piccoli (7 nm) con andamento elicoidale e sono costituiti da actina e da miosina, soprattutto quando sono coinvolti nei processi di contrazione;
- i **filamenti intermedi** (10 nm) sono costituiti da 3 filamenti che si uniscono insieme a formare un'unica struttura. Le proteine sono diverse tra le quali citiamo la cheratina che dà forma e struttura ai capelli e alle unghie, la desmina, la vimentina. Quindi, la loro funzione è quella di dare una struttura alla c. mentre i microfilamenti servono maggiormente al movimento ed alla contrazione.

Funzioni del citoscheletro. Accennavamo che il citoscheletro è presente in tutta la c. a formare una rete continua e dà stabilità agli organelli citoplasmatici. Inoltre, accennavamo alla mobilità della c. e dell'intero organismo se ci riferiamo ad organismi unicellulari. A questo proposito descriviamo il flagello, che abbiamo già citato per i batteri nei quali ha una struttura molto semplice costituita da una sola proteina, la flagellina, ed un movimento ondulatorio. Il flagello eucariotico, invece, è molto più complesso, presenta un *corpo basale* che è collegato direttamente alla cellula ed un flagello molto lungo che dà il movimento alla cellula. Il flagello è essenzialmente costituito da microtubuli, con una disposizione a triplette radiate per quanto riguarda il corpo basale, ed una a coppie di microtubuli con una coppia centrale, tenute insieme da braccia di dineina, un'altra proteina del citoscheletro. Anche il movimento è diverso, non essendo più ondulatorio ma *rotatorio*. Moltissimi organismi tra i protisti si muovono con un flagello (flagellati); tra le c. del Regno animale troviamo una c. dei mammiferi, compreso l'uomo, cioè lo spermatozoo, gamete motile per la sua funzione. La formazione del flagello è uno dei momenti più importanti della spermiogenesi cioè del differenziamento dello spermatozoo. Infine, avevamo accennato al traffico interno della c. che vede coinvolti i centrioli, strutture presenti a coppia ed in posizione ortogonale l'una rispetto all'altra. I centrioli sono importantissimi nella divisione cellulare, in particolare modo nella tappa della formazione del *fuso mitotico* (del quale ripareremo ampiamente) cioè di un altro sistema di microtubuli che interverrà nel movimento dei cromosomi. Quindi, quando accennavamo al fatto che i microtubuli dirigono il traffico interno della c., ci si riferiva anche al ruolo primario che assumono nel dirigere la suddivisione del materiale genetico durante la divisione cellulare.

Ribosomi

Sono costituiti da due subunità di cui una maggiore ed una minore. I R. dei procarioti sono più piccoli di quelli degli eucarioti (è l'unica differenza strutturale). Sono l'unico organello citoplasmatico che non è circondato da membrana (infatti si ritrova anche nei procarioti) e sono

costituiti da proteine e RNA ribosomiale. Sia il tipo di proteine sia il tipo di RNA sono diversi nelle due subunità, sono diversi tra procarioti ed eucarioti (differenza di composizione chimica).

I R. degli eucarioti si formano nel nucleo in una struttura particolare detta nucleolo, costituito dal DNA che porta l'informazione per l'RNA ribosomiale (si parla di struttura anche se in realtà è una zona dove è presente il DNA che porta l'informazione per l'rRNA. Infatti, si parla di regione organizzatrice del nucleolo). L'rRNA, sia nei procarioti che negli eucarioti, nasce come unica molecola che poi viene tagliata nelle varie subunità; negli eucarioti, nella subunità maggiore troviamo rRNA denominato 28S, 5S e 5.8S ('S' è lo Svedberg, cioè la costante di sedimentazione che si riferisce al peso molecolare). Nella subunità minore troviamo soltanto un tipo di rRNA, il 18S. Nei procarioti, le molecole di rRNA sono più piccole, nella subunità maggiore ne troviamo due, 23S e 5S, nella subunità minore troviamo il 16S.

Reticolo Endoplasmatico

È costituito da una serie di cisterne (?) che comunicano tra loro; il R.E.G. è in connessione con la membrana nucleare, si continua con essa, è in continuità strutturale con la membrana nucleare (m. n.). Ciò è importante perché la m. n. deve ingrandirsi in alcuni momenti e scomparire in altri; si ingrandisce quando si duplica il materiale genetico perché se la c. si deve dividere, è ovvio che lo spazio deve essere maggiore e la m. n. si deve per forza dilatare. In altri momenti della divisione cellulare, invece, la m. n. deve scomparire perché citoplasma e materiale genetico siano in contatto in quanto per la divisione cellulare sono necessarie determinate strutture che sono nel citoplasma (abbiamo accennato al citoscheletro che serve per spostare i cromosomi, con la necessità che le due strutture non siano separate dalla m. n.). Perciò, l'ingrandimento della m. n. o la sua scomparsa avvengono sempre a carico del R. E.; in pratica, se la m. n. si deve ingrandire prende un po' di materiale dal reticolo, lo fa a carico del reticolo, se la m. n. scompare, viene inglobata nel reticolo. Da qui l'importanza del legame strutturale tra m. n. e reticolo endoplasmatico.

Apparato del Golgi

È costituito da sacchi appiattiti indipendenti l'uno dall'altro, sempre formati da membrana. Tra R.E.R. e a. del Golgi c'è un rapporto di tipo funzionale. Infatti, abbiamo accennato che sul R.E.R. vengono sintetizzate o le proteine della membrana o quelle di secrezione (che devono fuoriuscire dalla c.); queste proteine di secrezione devono essere modificate con l'aggiunta alla catena peptidica di gruppi vari (carboidrati, lipidi). Tali modificazioni avvengono all'interno dell'apparato del Golgi. In pratica, la proteina viene sintetizzata sul R.E.R., da questo si stacca una vescicola che contiene le proteine e si porta sull'apparato del Golgi. Qui, la vescicola, fatta di membrana, si fonde con la membrana del Golgi ed entra nell'apparato. Utilizzando sempre questo sistema di vescicole che si staccano, raggiungono e si fondono con un'altra zona, la proteina attraversa tutti i sacchi, dette facce dell'apparato del Golgi. Durante questo percorso, la proteina viene modificata; in genere si parla di glicosilazione ma in realtà avvengono anche altre trasformazioni. Infine, le proteine inglobate in una vescicola finale sono pronte per essere utilizzate. Le facce intermedie dell'a. del Golgi sono dette "di maturazione", l'ultima faccia (pare concava) è detta "di secrezione" dalla quale vengono espulse le vescicole che contengono la proteina modificata. Quest'ultima si porta

verso la m. p. le due membrane si fondono e la proteina fuoriesce dalla c., oppure, se una proteina che serve per la membrana, viene integrata in essa. Il fenomeno appena descritto prende il nome di esocitosi e, più raramente, può avvenire anche che siano le proteine senza la vescicola a portarsi verso la m. p. e in questo caso la m. p. evagina verso l'esterno staccando una vescicola. Questo avviene tutte le volte che escono dalla c. proteine che non sono passate dal Golgi. Questo tipo di trasporto non si realizza attraverso la membrana perché le quantità di materiale sono più importanti e quindi è coinvolto un meccanismo diverso dal trasporto attivo e passivo già descritti.

l'ultimo tipo di trasporto che descriviamo è l'endocitosi. Facciamo l'esempio di una particella alimentare che viene dall'esterno, si avvicina alla m. p. di una c., viene inglobata in una invaginazione della m. p. che la racchiude in una vescicola. Questa, poi, si fonde con un lisosoma; si forma una struttura più grande formata dalla particella inglobata e dagli enzimi del lisosoma. La particella viene digerita ed i prodotti della digestione, se sono prodotti di rifiuto che devono uscire dalla c., vengono veicolati mediante una vescicola verso l'esterno. Il meccanismo con il quale vengono prelevate sostanze dall'esterno che vengono veicolate all'interno della c. prende il nome di endocitosi (o fagocitosi). Esiste un'altra modalità che si attua quando le sostanze arrivano racchiuse in una vescicola; in questo caso, la m. p. e quella della vescicola si fondono ed il materiale passa all'interno. Approfittiamo per ricapitolare i due tipi di trasporto:

- attraverso la membrana, che non vede cambiamenti della sua configurazione;
- il trasporto che riguarda sostanze ad alto peso molecolare o quantità abbondanti di sostanze, che prevede una invaginazione o una evaginazione della m. p.; si parla di esocitosi (fuoriuscita di sostanze) e di endocitosi (ingresso di sostanze nella c.).

Lisosomi

sono vescicole di forma sferica circondate da membrana. Alcuni autori li definiscono gli "spazzini" della cellula, termine che rende l'idea della loro funzione. Infatti, nei lisosomi ci sono una serie di enzimi idrolitici che, immettendo una molecola di H_2O , degradano le macromolecole biologiche (compiono la reazione inversa alla formazione dei vari legami delle macromolecole: i legami fosfodiesterico, estere, peptidico, si formavano con la perdita di una molecola di H_2O). In pratica i lisosomi sono deputati alla distruzione di tutte quelle molecole che non servono più o che devono essere metabolizzate per essere utilizzate dal metabolismo cellulare. Si deve notare che se questi enzimi si riversassero in massa nella c., potrebbero distruggere anche molecole ancora necessarie. Perciò, abbiamo due meccanismi di difesa: il primo è proprio quello di avere una vescicola chiusa che racchiude tutti gli enzimi, il secondo è costituito dal fatto che questi enzimi lavorano ad un pH molto acido (intorno a 5), mentre la c. si trova ad un pH neutro tendente al basico (7,4-7,6). Perciò, se il lisosoma si rompe e gli enzimi si riversano nel citoplasma, non sono in grado di funzionare a causa del pH.

Gli enzimi presenti nei lisosomi non vengono mai in contatto con la c., sono prodotti dal RER che li passa all'apparato del Golgi nel quale vengono elaborati e dal quale, sotto forma di vescicola si distaccano. Per mantenere acido l'ambiente del lisosoma è necessario aumentare la concentrazione in H^+ , per superare la naturale tendenza all'isotonia, entra in gioco una pompa protonica che preleva

ioni H^+ dalla c. e li immette nel lisosoma, facendo l'inverso con gli ioni OH^- . In questo modo il pH del lisosoma viene mantenuto basso. Esiste una patologia nella quale si rompono molti lisosomi continuamente; questo comporta che nella c. si ritrovino non solo gli enzimi ma anche una grande quantità di protoni che abbassano il pH della c. e consentono il funzionamento degli enzimi.

Perossisomi

Sono vescicole nelle quali si svolge una funzione di tipo metabolico. Infatti, in queste vescicole si svolgono tutte quelle reazioni metaboliche che prevedono la formazione di intermedi dannosi.

In pratica, spesso accade che una reazione metabolica preveda più passaggi (es. $A \rightarrow C$ trasformandosi prima nel prodotto B). I prodotti iniziale e finale non sono dannosi per la c., mentre l'intermedio lo è. Per evitare che la c. venga in contatto con questi prodotti intermedi dannosi, la reazione avviene in ambiente chiuso. Perciò, nel perossisoma arriva il prodotto A ed esce il prodotto C; B non viene in contatto con la cellula. Il prefisso "perossi" si riferisce alla tipologia delle reazioni che sono essenzialmente delle ossido riduzioni che vedono la formazione di intermedi che sono dei perossidi, composti che possono scindersi dando radicali liberi dannosi per la c. perché innescano a loro volta reazioni di perossidazione (perossisoma = corpi dove avvengono perossidazioni).

Lezione 10 (22/02/01)

Il nucleo

Nella c. eucariote è circondato da una membrana deputata a circoscrivere la zona nella quale è presente il materiale genetico. Dal punto di vista chimico, la m. nucleare è identica alla m. plasmatica già descritta. Dal punto di vista strutturale, ci troviamo di fronte ad un doppia membrana che costituisce delle vescicole; in pratica, quindi, non abbiamo due membrane (una esterna ed una interna) ma delle vescicole interrotte in zone che prendono il nome di *pori nucleari*. In realtà, il reticolo endoplasmatico rugoso (RER) è in continuità strutturale con la m. nucleare. Da ciò si comprende come quando la m. nucleare ha bisogno di aumentare le proprie dimensioni (per aumento del volume del nucleo) o debba scomparire, ciò avvenga a carico del RER.

Porì nucleari.

Sono strutture a forma di cilindro piuttosto rigide e complesse da un punto di vista proteico, tanto da essere definite *complesso del poro*. È formato da granuli proteici dei quali uno disposto al centro e gli altri periferici a costituire dei cilindretti il cui diametro costante è di 100 nanometri (nm).

Questa struttura è molto importante per la c. perché serve per il passaggio di particolari molecole da e verso il nucleo. Data la complessità della m. n. non possiamo immaginare un passaggio semplice, se pur mediato da proteine, come è il passaggio attraverso la membrana, ma un passaggio più complesso ed i porì servono ad assicurare la comunicazione tra nucleo e citoplasma. ←

Quali sono le molecole che devono passare attraverso la m. n.?

Come poi vedremo, la sintesi proteica avviene nel citoplasma, quindi, tutte le volte che per le attività nucleari servono delle proteine, esse devono entrare nel nucleo. Inoltre, dal nucleo escono i ribosomi, abbiamo accennato che questi ultimi si formano nel nucleo, in una particolare struttura che è il nucleolo, ma servono nel citoplasma dove li troviamo, liberi o sul RER, coinvolti nelle sintesi proteica. In più, non possiamo dimenticare l'attività biochimica del nucleo: tutte le volte che il DNA in esso contenuto si deve duplicare, servirà una quantità importante di enzimi (proteine) che devono entrare nel nucleo, come già detto. Ma l'attività del DNA non è solo quella di duplicarsi ma è anche quella di dirigere la vita della c. mediante la sintesi delle proteine.

Quindi, il DNA ha due funzioni:

- duplicarsi per trasmettere l'informazione, il programma delle c.;
- far eseguire il programma. Ciò avviene tramite la sintesi delle proteine che il DNA guida indirettamente. Abbiamo già detto a proposito delle proteine che la sequenza degli aminoacidi dipende direttamente dalla sequenza dei nucleotidi sul DNA.

Tuttavia, il DNA è nel nucleo e le proteine si formano nel citoplasma per cui ci deve essere un modo per comunicare, questo è garantito dall'RNA messaggero che è la copia di un tratto di DNA (gene). Questa copia deve poter uscire dal nucleo e lo fa passando attraverso i porì.

Tornando alla membrana nucleare cerchiamo di spiegare perché una doppia membrana: sicuramente anch'essa è una barriera di permeabilità come lo è la m. p., formatasi durante l'evoluzione delle c.

eucarioti. È molto probabile che ci sia stata un'invaginazione della m. p. e che le vescicole formatesi si siano staccate e siano andate a formare le vescicole della m. nucleare.

È quindi il risultato di un passaggio evolutivo che aveva lo scopo di compartimentare meglio una c. che era diventata più complessa, di creare dei settori di lavoro, di avere una funzione protettiva della molecola fulcro della funzione cellulare. Non è un caso che il DNA si sia molto probabilmente evoluto da una molecola a singolo filamento; la parte importante del doppio filamento sono le basi azotate che portano la diversità. Aver messo le basi azotate all'interno di una molecola, per altro molto stabile, può essere stato un meccanismo protettivo. ~~Quindi, la m. nucleare potrebbe essere sorta proprio come ulteriore protezione per un materiale davvero prezioso per la cellula.~~

Va poi considerato che molte cose a livello evolutivo si sono formate per caso; oggi noi non vediamo moltissime altre cose che, formatesi per caso, si sono perse perché non risultate utili. Quindi, le cose che riscontriamo, sono il risultato di una selezione di caratteristiche che, verificatesi casualmente, si sono fissate perché sono risultate utili per la c. e poi per l'organismo (la caratteristica inutile può perdersi o meno, senza esercitare una pressione perché rimanga).

In questo caso la doppia membrana è rimasta perché probabilmente ha consentito una migliore specializzazione; a proposito della m. plasmatica diciamo che è asimmetrica in quanto ci sono strutture diverse sui due lati per prendere migliore contatto con l'ambiente extra o intra cellulare.

La doppia m. n. esalta ancora di più questa asimmetria, avendo due strati che consentono il raddoppio della specializzazione. E la specializzazione è necessaria perché ~~gli ambienti con i quali la m. n. viene a contatto sono molto diversi: da una parte il "nucleoplasma" e dall'altra il citoplasma sul versante citoplasmatico della m. n. troviamo dei ribosomi che assolutamente non sono presenti sul versante interno.~~

A questo proposito ricordiamo che ~~la sintesi proteica deve avvenire esclusivamente nel citoplasma~~, tanto che i ribosomi si assemblano solo nel citoplasma; infatti, le due subunità del ribosoma si uniscono solo in questa sede e solo al momento della traduzione (già assemblati non passerebbero attraverso i pori nucleari). ~~La sintesi proteica non deve avvenire nel nucleo sempre per proteggere il DNA.~~ Per comprendere questo, facciamo un es.: nei procarioti non c'è il nucleo ma c'è l'RNA messaggero che probabilmente serve per una protezione del DNA. Infatti, se il DNA si aprisse ogni volta che deve avvenire la sintesi di una proteina, la molecola sarebbe sempre aperta e chiusa con un rischio elevato di cambiamenti. Se aggiungiamo che il DNA è complessato in una molecola detta cromatina, immaginare che ogni volta possa aprirsi e chiudersi diventerebbe veramente difficile. Quindi, c'è la necessità dell'RNA messaggero.

Tuttavia, ~~nei procarioti, la formazione dell'RNA messaggero (trascrizione del DNA) e la sintesi proteica (traduzione) avvengono contemporaneamente, ciò è possibile perché il DNA dei procarioti è molto più semplice e perché non c'è la m. nucleare.~~ Negli eucarioti, invece, non deve esserci contemporaneità tra trascrizione e traduzione perché si rischierebbe un ingorgo nel nucleo. Ecco quindi perché sono presenti meccanismi di protezione per evitarlo.

Ritornando alla m. nucleare, sul suo esterno troviamo proteine integrali che servono per prendere contatto con il citoplasma e per trasportare all'interno molecole molto semplici. Nella m. n. interna;

invece, troviamo strutture proteiche molto più complesse tra le quali le proteine che costituiscono la cosiddetta lamina nucleare. Inoltre, sono identificabili proteine integrali di membrana che prendono contatto con le proteine della lamina nucleare. Le proteine della lamina nucleare sono importanti perché con esse prende contatto il DNA ovvero la cromatina. In questo modo, il versante interno della m. n. diventa essenziale proprio per i rapporti che le proteine della lamina, legate alle proteine di membrana, assumono nei confronti del DNA. Ci sono vari momenti nella vita di una cellula in cui il DNA si ancora alle proteine della lamina e vi trova un sostegno; viceversa, ci sono momenti in cui se ne distacca, dando inizio al dissolvimento della m. nucleare come quando la cellula si deve dividere. Nel nucleo, oltre alla molecola del DNA complessata a proteine che dà origine alla sostanza detta cromatina, esiste una struttura ben evidenziabile: il nucleolo. Come già detto, non è un organello cellulare ma una struttura (o meglio zona) costituita da DNA che porta l'informazione per l'RNA ribosomiale (rRNA). Nell'uomo abbiamo 5 coppie di cromosomi che portano i geni per l'rRNA; il DNA di questa struttura si dispone a raggiera con zone vicine nelle quali avviene un'attiva costruzione di ribosomi. Le regioni dei cromosomi vicino alle quali si forma il nucleolo sono dette NOR (Nucleolar Organization Region = regione organizzatrice del nucleolo). In pratica è DNA che si unisce per produrre rRNA e dare origine ai ribosomi. Ovviamente, maggiore è il periodo di sintesi proteica, quindi maggiore è la quantità di ribosomi che servono, più il nucleolo è attivo e può addirittura capitare che questo DNA si duplichi e si stacchi dalla cellula, diventando un corpicciolo autonomo (ciò fa parte di un processo del quale non parleremo e che prende il nome di "amplificazione genica"). Perciò, dobbiamo aspettarci che la grandezza del nucleolo sia in stretta correlazione con la necessità di ribosomi; in pratica, se è un periodo di attiva sintesi proteica avremo nucleoli multiattivi e viceversa, con riduzione della visibilità del nucleolo a tal punto che durante la divisione cellulare, quando la cellula si sta dedicando a ripartire equamente tutto il suo materiale, il nucleolo scompare (più o meno in concomitanza con la scomparsa della m. nucleare). Ricordiamo infine che l'rRNA nasce come un'unica molecola precursore di 45S che poi viene tagliata con delle zone che vengono rimosse in un processo di maturazione che rivedremo per gli eucarioti, dando origine alle tre molecole di rRNA che sono il 18S, il 5,8S ed il 28S. Per quanto riguarda gli eucarioti, manca nell'elenco l'unità ribosomiale 5S perché si forma autonomamente in una zona diversa.

PORI NUCLEARI ← i ribosomi vi servono del nucleo
e l'mRNA vi passa a andare
nel citoplasma

Lezione 11 (01/03/01)

Il nucleo

Il DNA presente nel nucleo degli eucarioti è complessato a proteine.

Ci sono vari motivi per cui è necessaria questa unione: uno importante è che il DNA è una molecola estremamente lunga e nelle c. più complesse ci sono diverse molecole di DNA, con la necessità di condensarle il più possibile per poterle far contenere dal nucleo che è una struttura relativamente piccola (basta pensare che una molecola di DNA è lunga nell'ordine dei cm (3-4) e che tutta la c. animale è di circa 40 micron). Da qui la necessità di "accorciare" questa molecola.

Per realizzare ciò, intervengono proteine che, insieme al DNA vanno a costituire la cromatina.

In pratica, insieme al DNA abbiamo:

- **istoni**: proteine basiche che nominammo quando, parlando di proteine, nominammo gli aminoacidi basici (lisina ed arginina);
- **proteine NON istoniche, acide**, sono una classe molto ampia e variabile. *→ Vedi struttura*

Sul ruolo di queste molecole si è molto discusso e con esperimenti che vedremo più avanti, si è stabilito che gli istoni hanno il ruolo di regolare la condensazione del DNA da un punto di vista strutturale e le proteine NON istoniche intervengono nella regolazione genica, quel processo che descriveremo più avanti che fa sì che alcuni geni funzionino ed altri no, perché il tessuto è specializzato o perché in un dato momento un prodotto non serve e quindi non deve essere prodotto. Ma la cromatina è necessaria sia per l'abbondanza del materiale genetico presente nelle c. eucarioti, sia come ulteriore protezione del programma genetico.

Oltre alle molecole appena citate, nella cromatina troviamo anche delle piccole molecole di RNA, il cui ruolo non è stato completamente chiarito: probabilmente sono il risultato di eventi di trascrizione del DNA che rimangono complessati con la cromatina.

Gli istoni intervengono nel condensare la cromatina in modo modulato, cioè a diversi livelli.

Il livello di condensazione della cromatina è strettamente correlato al momento funzionale nel quale si trova il DNA (duplicazione, sintesi delle proteine) che richiede che il DNA sia disponibile come stampo, cioè che le basi azotate debbano essere pronte per essere ricopiate per dare origine ad una nuova molecola di DNA (duplicazione) oppure ad una molecola di RNA messaggero che poi verrà tradotta (sintesi proteica). In pratica, tutte le volte che il DNA dovrà essere duplicato (solo per determinate cellule e solo in un momento specifico della loro vita), la cromatina deve essere despiralizzata (o decondensata); quando invece, il DNA non serve come stampo, può essere più o meno condensato. Per il processo della trascrizione vale la stessa regola, relativamente al tratto di DNA che contiene i geni che devono essere trascritti.

Il massimo della spiralizzazione della cromatina si trova nelle cellule proliferanti (o ciclianti) in un momento particolare della divisione cellulare, che ne consente la visualizzazione al m. ottico (al M. E. è visibile addirittura il DNA "nudo").

La formazione della cromatina non modifica in alcun modo la struttura del DNA che viene soltanto complessato alle proteine già citate. Il termine cromatina significa "sostanza colorabile".

Prima di proseguire ricordiamo che il DNA dei procarioti viene definito "nudo", anche se anch'esso è complessato con delle proteine pur non arrivando al grado di complessità che raggiungono gli eucarioti e senza che il DNA sia accorciato (ciò confermerebbe l'aspetto protettivo della condensazione in cromatina del DNA eucariotico). Le proteine che complessano il DNA procariotico vengono chiamate "Iston Like" e la similitudine riguarda solo la funzione ma non la struttura o la modalità di unione.

Tornando alla cromatina degli eucarioti, puntiamo la nostra attenzione sugli istoni. Sono 5 classi: H1, H2A, H2B, H3, H4, sono differenti in termini di aminoacidi, sono molecole altamente conservate in termini evolutivisti (cioè si ritrovano simili nei vari organismi), hanno ruoli diversi nella formazione della cromatina.

Formazione della cromatina 4

Si identificano vari passaggi:

- i primi ad intervenire sono gli istoni H2A, H2B, H3 e H4 che formano un ottamero (vedi appunti per disegno), una struttura di otto molecole, due per ogni tipo di istone, distribuite in due strati, come due piani di una torta;

- il DNA e l'ottamero si uniscono a formare una struttura chiamata nucleosoma. Esso rappresenta la struttura di base della cromatina. In pratica, la molecola di DNA si avvolge intorno all'ottamero di istoni (lo usa come un rocchetto), compiendo circa due giri. Dopo un certo numero di basi (circa 140), il DNA si avvolge attorno ad un altro ottamero (circa due giri) ed ancora dopo un intervallo fisso di basi si avvolge ad un altro ottamero, e così via. Ne risulta una struttura definita a "collana di perle", visibile chiaramente al M. E. e molto ben descritta, che comporta l'accorciamento della molecola di DNA. I tratti di DNA che vanno da un nucleosoma all'altro prendono il nome di "DNA linker".



- l'istone H1, che possiede una terminazione NH₂ ed una COOH, è una proteina con una struttura terziaria "mista", cioè presenta una porzione globulare, detta cuore o corpo globulare ed una parte più filamentosa detta braccio dell'istone H1. La parte globulare di ogni singolo istone H1 si lega al DNA avvolto attorno all'ottamero di ogni singolo nucleosoma; il braccio si lega alla parte globulare dell'istone H1 presente sul nucleosoma successivo. Quindi, l'istone H1 di ogni nucleosoma costituisce un "gancio" che attacca il nucleosoma successivo a livello dell'istone H1, e lo tira a sé. In pratica, il DNA linker presente tra un nucleosoma e l'altro viene ripiegato all'interno e la molecola di cromatina si accorcia ulteriormente. A questo punto, la parte strutturale della cromatina si è realizzata.

Da questo momento in poi, intervengono ulteriori ripiegamenti a formare anse e ripiegamenti vari che tendono ad accorciare sempre di più la struttura. Contemporaneamente all'accorciamento, la molecola si ispessisce (lo spago avvolto intorno al rocchetto), aumentando la propria visibilità al microscopio ottico. Per cromatina dispersa si intende lo stato di condensazione minimo della cromatina.

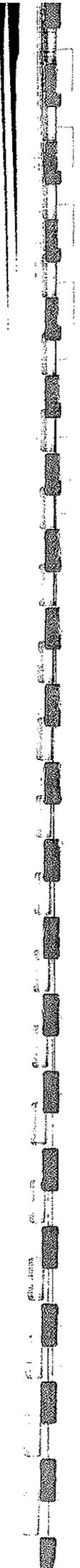
Dei vari stati di condensazione della cromatina citiamo i seguenti:

- molecola di DNA: 2 nm (20 Å) di diametro, 5 cm di lunghezza;

vedi struttura

• primo avvolgimento intorno al nucleosoma: 11 nm (si è già moltiplicato per un fattore 5), 2 cm di lunghezza

• dopo l'intervento dell'istone H1, due filamenti di cromatina si ripiegano a formare un lungo filamento di cromatina (circa 6 nucleosomi per ansa), della solenoide, che ha raddoppiato lo spessore (30 nm) e dimezzato la lunghezza (1,2 mm)



Lezione 12 (06/03/01)

Formazione della cromatina

Riassunto: il DNA è una molecola estremamente lunga e via via che gli organismi si complicano, nel nucleo sono presenti più molecole di DNA. Negli eucarioti, la molecola più piccola è di 4-5 cm (uomo) e questo ci fa immaginare quanto DNA ci sia in una c. eucariote. Quindi, ci sono molecole estremamente lunghe che devono essere contenute in uno spazio piuttosto ristretto (il nucleo di una c. eucariotica animale). Da qui la necessità di accorciare queste molecole. Ciò viene ottenuto con l'intervento di proteine istoniche (basiche) e NON istoniche (acide) che complessano il DNA accorciandolo (la struttura del DNA non viene modificata). Ci sono 5 classi di istoni, 4 delle quali si organizzano a formare un ottamero di istoni (2 molecole di H2A, H2B, H3, H4 a formare due dischi), intorno al quale si avvolge il DNA a formare il nucleosoma (unità di struttura organizzativa della cromatina). Si forma prima una "collana di perle" poi interviene l'istone H1 che tende a riavvicinare le perle tra loro, eliminando il DNA linker (DNA interposto tra un nucleosoma e l'altro) che viene ripiegato tra un nucleosoma e l'altro. Ne risulta un'ulteriore condensazione della cromatina. Dopo questa organizzazione di base la struttura si ripiega a formare delle anse in modo tale da ottenere un'ulteriore accorciamento e di conseguenza, un ispessimento (solenoido). Questo consentirà in un momento particolare della vita della c. di vedere i cromosomi (che non sono altro che le molecole di DNA organizzate) al microscopio ottico.

- Dopo la formazione del solenoide, si verificano dei ripiegamenti ad anse a costituire il supersolenoide (100 micron di lunghezza e 300 nm di spessore);
- quindi, la molecola di cromatina inizia una superspiralizzazione che porta alla formazione di una struttura fortemente condensata detta cromatidio. Si arriva così a pochi micron di lunghezza ed a 700 nm di spessore, ben visibile al microscopio ottico.

Abbiamo detto che la condensazione della cromatina dipende dallo stato funzionale in cui si trova il DNA; ciò vuol dire che se il DNA serve come stampo sia per duplicare se stesso sia per dare origine alla formazione delle proteine, deve essere despiralizzato il più possibile cioè deve essere abbastanza libero per consentire alla doppia elica di aprirsi per fungere da stampo. Questo ci fa immaginare che quando il DNA non è impegnato, dovremmo trovarlo particolarmente condensato e, viceversa, quando è impegnato, lo dovremmo trovare despiralizzato.

Se ritorniamo alle due funzioni del DNA, in particolare a quella di duplicare se stesso, dobbiamo dire che essa avviene in momenti ben precisi della vita della c. e non in tutte (cellule NON proliferanti o NON ciclianti). Invece, la sintesi delle proteine avviene tutte le volte che una determinata c. ha bisogno di una determinata proteina; quindi è un processo controllato ma meno prevedibile del precedente. Quando parliamo di c. che non duplicano il proprio DNA, cioè che non proliferano, dovremmo attenderci che il DNA sia molto condensato tranne che nelle poche zone impegnate nella sintesi proteica.

In realtà la massima condensazione del DNA si ha in un momento della vita cellulare, cioè quando la c. si sta dividendo (mitosi). In tutti gli altri casi, la cromatina non è altamente condensata, cioè non ha raggiunto il massimo della spiralizzazione ma si trova in uno stato di condensazione che potremmo definire tra il solenoide ed il supersolenoide. La mitosi, cioè la divisione cellulare, è un processo che deve necessariamente essere preceduta dalla divisione del DNA perché se devo ottenere due c. uguali da una, devo prima moltiplicare il DNA:

Ciò significa che quando vedo i cromosomi nella massima spiralizzazione, cioè durante la divisione, avrò non una ma due molecole di DNA.

Quindi se dico che una singola molecola di DNA, organizzata con gli istoni così come abbiamo detto finora, si chiama cromosoma (corpo colorabile), quando lo vedo al massimo della condensazione è doppio, cioè è duplicato.

Le due molecole di DNA che sono il risultato di una duplicazione rimangono unite in una zona del cromosoma detta centromero. Perciò, tutte le volte che posso vedere un cromosoma al microscopio ottico, non vedo un singolo bastoncino ma lo vedo doppio. Ovviamente questa struttura, cioè un cromosoma formato da due molecole di DNA, si ritrova solo nelle cellule proliferanti, cioè che vanno incontro a divisione e quindi hanno già subito la duplicazione del DNA. Le due molecole di DNA si chiamano cromatidi fratelli in quanto derivano dalla copia di una stessa molecola e quindi per definizione dovrebbero essere uguali. Usiamo il condizionale perché durante la duplicazione del DNA possono avvenire degli errori, anche se con una frequenza bassissima. Quindi, tutte le volte che disegneremo dei cromosomi per rappresentarli, dovremo disegnare una singola molecola, se la duplicazione del DNA non è ancora avvenuta, mentre ne disegneremo due tenute insieme dal centromero, se la divisione è avvenuta.

Il centromero è molto importante per chi lavora con i cromosomi perché rappresenta il primo mezzo per riconoscerli ed ordinarli. Infatti, il centromero, che è una cromatina sempre più condensata dell'altra, può avere posizioni diverse ed è detto metacentrico (se si trova circa a metà dei cromosomi, formando braccia uguali), submetacentrico (spostato, si forma un braccio corto ed uno lungo), acrocentrico (quasi in posizione terminale). Fino a 20 anni fa si pensava che ci fossero cromosomi telocentrici, ma in realtà si è visto che deve esserci un po' di DNA oltre il centromero per una esigenza legata alla duplicazione del DNA per cui alla fine di ogni cromosoma ci sono i cosiddetti telomeri che sono coinvolti nella duplicazione del DNA. → *shala*

Prima di proseguire, dobbiamo aggiungere che quando parliamo di cromatina ne distinguiamo due tipi: l'eterocromatina e l'eucromatina. La differenza tra le due è sicuramente strutturale in quanto il DNA presenta delle sequenze ripetute, ma soprattutto:

- l'eterocromatina appare sempre più condensata dell'eucromatina,
- l'eterocromatina non è mai codificante cioè, il DNA che ci appare sempre un po' più condensato dell'altro non contiene tratti che daranno origine a proteine (e questo è uno dei motivi per i quali può essere più condensato, visto che non serve mai per la sintesi proteica).
- L'eucromatina, appare sempre meno condensata e contiene parti di DNA codificanti, cioè che daranno origine a proteine.

L'eterocromatina costitutiva si ritrova sempre nella zona pericentromerica (intorno al centromero) e distribuita a zolle fisse lungo il cromosoma. Poiché l'eterocromatina si colora in maniera diversa rispetto all'eucromatina e poiché le zolle lungo il cromosoma sono fisse (costitutive appunto), la colorazione ci permette di riconoscere un cromosoma dall'altro; questa evidenziazione è detta bandeggiatura dei cromosomi. Le bande sono specifiche per ciascun cromosoma e sono date dall'alternarsi di zone eucromatiche e di zone eterocromatiche. Perciò, si chiama eterocromatina costitutiva perché la si trova sempre nelle stesse zone in ciascun cromosoma.

Vedi risultato

Esiste poi un altro tipo di eterocromatina legata esclusivamente allo stato funzionale del DNA; per questo motivo si chiama **facoltativa** perché in determinati momenti, nei quali il DNA non deve dare origine a proteine, non deve codificare, viene eterocromatinizzato in quanto così condensato non è disponibile per dare il via alla sintesi delle proteine. È un argomento che riprenderemo ma, per comprendere l'importanza del fenomeno, ricordiamo che in alcuni insetti l'intero patrimonio genetico che deriva dal padre viene eterocromatinizzato perché non deve esprimersi. Inoltre, nelle femmine di tutti i mammiferi compresa la donna, un cromosoma X (detto corpo di Barr) viene eterocromatinizzato perché non deve esprimersi; ciò è dovuto alla necessità di compensare la presenza dell'altro cromosoma X in quanto avere due X costituirebbe un vantaggio rispetto al maschio perché ci sarebbe una dose doppia di prodotto proteico. Quindi, una X a caso viene eterocromatinizzata per ottenere quello che viene chiamato un **compenso di dose**.

rup.

Infine, se si esegue un cariotipo, cioè si mettono in ordine i cromosomi umani ci si accorge che oltre a vederli bandati, doppi (con due molecole di DNA), si vedono doppi come numero cioè a coppie. Questa è una caratteristica tipica di tutti gli organismi definiti **diploidi**.

I due cromosomi uguali per forma, cioè quelli che costituiscono la coppia, si chiamano **omologhi**.

Capiremo meglio perché si è detto che l'uguaglianza è morfologica ma intanto possiamo dire che due cromosomi omologhi sono uguali per forma, per funzione (un gene presente su un cromosoma lo ritrovo anche sull'altro), ma possono essere diversi per sequenza di DNA. Ciò da origine al fatto che si può essere omozigoti o eterozigoti (se ne riparerà nell'argomento genetica).

I cromosomi omologhi sono simili ma non identici, mentre i cromatidi fratelli sono identici.

Gli organismi che non hanno cromosomi omologhi sono detti **aploidi** cioè hanno una sola serie di informazioni. Si intuisce che avere doppia serie costituisce un vantaggio evolutivo: se avviene un errore importante in un cromosoma, c'è la possibilità che l'altro funzioni bene e riesca a sopperire lo sbaglio. Da qui una domanda la cui risposta viene spesso sbagliata: quando una cellula e quindi un organismo è diploide? Definire un organismo diploide significa dire che nelle sue cellule ci sono due serie di cromosomi cioè cromosomi uguali due a due cioè cromosomi omologhi. Inoltre, si deve ricordare che i cromosomi omologhi sono simili ma non identici cioè possono portare una espressione diversa di uno stesso gene, cioè una sequenza di basi diversa. Quando si effettua il cariotipo, si studiano i cromosomi in un momento in cui è già avvenuta la duplicazione del DNA; quindi si vedono coppie di cromosomi e ciascun cromosoma è costituito da cromatidi fratelli (cioè da due molecole di DNA). Si sottolinea che mentre la diploidia, cioè avere cromosomi omologhi, è uno stato costitutivo dell'organismo che prescinde dal momento funzionale della cellula, avere cromatidi fratelli è strettamente legato ad uno stato funzionale in quanto la loro presenza è legata alla divisione cellulare. Per visualizzare il significato della diploidia, si può considerare ciò che avviene al momento della fecondazione negli organismi che si riproducono sessualmente; si verifica l'unione di due patrimoni genetici (metà cromosomi del padre e metà della madre) a formare lo zigote che contiene due serie di cromosomi che sono quelli che ci portiamo avanti in tutte le cellule somatiche (ci sono organismi aploidi che si riproducono sessualmente che mettono ugualmente

BANDEGGIATURA: colorazione dello cromatoma che ci permette di distinguere i cromosomi dell'altro.

insieme patrimonio paterno e materno ma successivamente ridividono i cromosomi in modo da ritornare allo stato aploide che è il loro costitutivo).

Duplicazione del DNA

Vuol dire da una molecola di DNA ottenerne due. Le modalità con cui ciò avviene erano state già parzialmente descritte da Watson e Cric nel momento in cui avevano descritto la molecola del DNA. Infatti, accingendosi a studiare la struttura del DNA, avendo già capito quale era la sua funzione, si andava alla ricerca di una struttura che potesse essere auto-replicante perché ciò rappresentava uno dei primi scopi che si presupponeva avesse una molecola che portava l'informazione genetica. Perciò, quando si descriveva la struttura del DNA bisognava che questa possibilità tornasse con la struttura. In effetti, la struttura proposta da Watson e Cric, che oggi sappiamo essere quella reale, permetteva già di immaginare come il DNA potesse duplicarsi.

Si trattava di un doppio filamento con delle basi complementari quindi con dei legami molto specifici per cui ad una base poteva corrispondere soltanto un'altra base e quindi era ovvio immaginare che questa molecola potesse aprirsi e sullo stampo di ciascun filamento potesse formarsi una molecola nuova.

Quando si è cominciato a studiare il DNA in maniera più approfondita, quando è cominciata quella che viene chiamata la biologia molecolare, che si occupa più delle molecole che non dell'organismo nella sua interezza, sono cominciati dubbi ed interrogativi.

Sicuramente i due filamenti di DNA facevano da stampo, ma ci si interrogava sul fatto che la duplicazione del DNA potesse essere conservativa, dispersiva o semiconservativa.

- **Conservativa:** i due filamenti vecchi si riuniscono ed i nuovi vanno insieme;
- **Semiconservativa:** la molecola di DNA si apre, ciascun filamento funge da stampo per quello nuovo e poi rimangono insieme un vecchio ed un nuovo;
- **Dispersiva:** nella molecola che si forma, ciascun filamento è un miscuglio di tratti vecchi e nuovi.

Le tre ipotesi vennero verificate con un esperimento condotto da Meselson e Stahl.

Esso prevedeva l'uso di una colonia di *Escherichia Coli* e sfruttava la possibilità di avere DNA pesante e DNA leggero. Questi ultimi furono ottenuti con l'inserimento dell' N^{15} (isotopo di peso in quanto ha un neutrone in più). L'azoto è presente nelle basi azotate e quindi, se si fanno crescere alcune cellule in presenza di azoto pesante, dopo alcuni cicli di replicazione esso sarà incorporato nel DNA e quindi si otterrà un DNA più pesante.

Il secondo presupposto tecnico era la centrifugazione in cloruro di cesio che permette di intrappolare le molecole durante la centrifugazione in posizioni diverse a seconda del loro peso molecolare (andando più a fondo le molecole più pesanti).

L'esperimento, inoltre, partì da tre dimostrazioni molto importanti che descriviamo (vedi appunti):

- 1) se si centrifuga DNA leggero (che contenga solo N^{14}), durante la centrifugazione si ottengono molecole di DNA che formano un'unica banda ad una determinata altezza della provetta;
- 2) se si centrifuga DNA pesante, durante la centrifugazione il DNA si fermerà ad una altezza che è più in basso di quella precedente, ad indicare che sono, appunto, molecole più pesanti.

3) La dimostrazione importante di Meselson e Stahl fu che se si prendono molecole tutte di DNA leggero e molecole tutte di DNA pesante e si centrifugano insieme, non si formeranno miscugli ma si otterrà una banda pesante ed una leggera distinte.

Questo presupposto è molto importante per l'esperimento vero e proprio:

- si fanno crescere cellule di E. coli in un terreno di coltura contenente azoto pesante e le si fa riprodurre per una sola generazione in un terreno contenente azoto leggero;
- si raccolgono e si centrifugano le cellule e ci si accorge che tutto il DNA si localizza in una posizione intermedia, cioè non è né dell'azoto leggero né del pesante.

Questo primo esperimento esclude la conservativa perché se il DNA si duplicasse così, dopo una generazione si dovrebbe avere una molecola tutta di DNA pesante ed una tutta di leggero e siccome prima abbiamo dimostrato che se così fosse non si sarebbero mescolate, il fatto che si ottenga una banda cosiddetta "ibrida" significa che ciascuna molecola di DNA contiene sia un po' del vecchio sia un po' del nuovo.

Tuttavia non si possono escludere la dispersiva e la semiconservativa, nelle quali ogni molecola è un misto di DNA vecchi e nuovo.

- Per determinare quale delle due fosse, furono fatte crescere le c. di E. Coli ancora in presenza di azoto leggero e con il passare delle generazioni, ci si accorgeva che la banda ibrida aveva sempre la stessa grandezza, rimaneva fissa come quantità, al contrario, la banda leggera aumentava sempre di più. Ciò significa chiaramente che soltanto le prime molecole erano e rimanevano ibride, mentre tutte le altre contenevano solo azoto leggero.

Se si verificasse una duplicazione semiconservativa, da una molecola di DNA che contenga diciamo due filamenti rossi, si ottengono due molecole rosso/verdi. Se queste si fanno riprodurre in presenza del rosso, la generazione successiva si otterranno due molecole rosse e due rosso/verde.

Se si continua, da tutte le molecole rosse si otterrà solo rosso e da quelle rosso/verde se ne otterrà una mista ed una pura. Perciò, avanzando le generazioni fatte crescere in azoto leggero, le rosse aumentano e le miste restano le due di partenza.

Se si verificasse la dispersiva, ad ogni generazione si avrebbe un'unica banda ibrida perché ogni molecola sarebbe sempre un miscuglio di rosso e di verde.

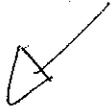
La dimostrazione che la banda ibrida rimaneva quantitativamente fissa mentre quella dell'azoto leggero aumentava sempre in quantità, è la dimostrazione che il DNA si duplica secondo una via semiconservativa. Quindi, il DNA si duplica secondo l'idea di Watson e Crick cioè l'elica si apre, ciascun filamento funge da stampo per un nuovo filamento e poi, come dimostrato da Meselson Stahl, il filamento nuovo rimane con quello vecchio.

Chiarito ciò, gli studi sono proseguiti per dimostrare come avvenisse la duplicazione a livello molecolare, cioè tappa per tappa. Era ovvio immaginare che fosse un processo abbastanza complesso e quindi dagli anni 70 in poi c'è stata la volontà di capirne ogni dettaglio.

Analizziamo perciò i singoli problemi per vedere come sono risolti.

N.B. la banda di azoto leggero, se sempre fissa e da un filamento nuovo ed un vecchio, sono due sono tutti e due uguali.

controlla 2004



Apertura della doppia elica

Sono necessari degli enzimi che rompano i legami H formati tra le basi (a livello molecolare, la duplicazione del DNA è identica nei procarioti e negli eucarioti; alla fine della descrizione diremo qualche differenza fondamentale, dovuta essenzialmente al fatto che la molecola del DNA nei procarioti è circolare, è più piccola, la velocità di replica è maggiore, mentre negli eucarioti è lineare, è più grande, la velocità di replica è minore).

L'elica del DNA viene aperta ad opera degli enzimi elicasi, essi cominciano a rompere i legami H in un punto preciso e formano quella che viene chiamata "bolla di duplicazione", cioè il punto in cui si scollano i due filamenti.

Le elicasi procedono in direzioni opposte, aprendo parti diverse dell'elica, ciascuna metà si chiama "forcella di duplicazione".

Mantenimento dell'apertura

Alcuni studi avevano dimostrato che, se il DNA si apre con relativa facilità e con scarso consumo di energia perché sono presenti legami H (abbastanza deboli), rinatura anche con molta facilità (cioè riforma i legami). Ciò non deve verificarsi perché occorre ovviamente il tempo necessario per duplicarlo. Si è pensato che fossero coinvolte delle proteine che in effetti sono state trovate e dette "proteine di "srotolamento" che si legano al singolo filamento di DNA, impedendone la rinaturazione.

Torsione del DNA

Le elicasi, continuando a procedere nel rompere i legami H davanti a loro e quindi ad aprire l'elica, di conseguenza provocano l'avvolgimento, la torsione del DNA a valle, sono stati identificati degli enzimi, le topoisomerasi (1 e 2) che tagliano il filamento di DNA quando la torsione è diventata eccessiva tanto da impedire l'avanzamento dell'elicasi. In questo modo la torsione si allenta.

Le topoisomerasi incorporano l'energia del legame che si rompe e quando il DNA è stato duplicato, con la stessa energia ricuciono il DNA.

Energia per la polimerizzazione

A questo punto, i nucleotidi che sono nel nucleo riconoscono per complementarietà la base e si localizzano opportunamente. I nucleotidi che si sono posizionati sono legati insieme dall'enzima DNA polimerasi (polimerizza il DNA). Per formare una reazione di condensazione, però, c'è bisogno di energia, che viene fornita direttamente da ciascun nucleotide che si porta la propria energia perché i nucleotidi presenti non sono formati semplicemente da base, zucchero, e fosfato, ma sono dei nucleosidi trifosfato (base, zucchero e tre gruppi fosfato: ATP, GTP, CTP, TPT).

Così, quindi, si risolve il problema dell'energia necessaria per la polimerizzazione: ogni base si porta dietro i tre fosfati, entra nella reazione, cede il gruppo fosfato, fornisce l'energia, i due fosfori vengono vanno lasciando incorporato nel DNA il nucleotide vero e proprio (nucleoside mono fosfato).

Lezione 13 (08/03/01)

Duplicazione del DNA

Superato il problema energetico della polimerizzazione sorgono ancora due problemi, uno ancora correlato al problema energetico e l'altro correlato all'enzima DNA polimerasi.

DNA polimerasi

Questo enzima non riesce a polimerizzare (formare legami estere tra l'ossigeno del C_3 ed il fosforo del C_4) quando i nucleotidi sono pochi, cioè nella fase iniziale della duplicazione del DNA.

Infatti, la DNA polimerasi non è in grado di cominciare la polimerizzazione se non è presente un piccolo tratto già polimerizzato. In pratica riesce ad aggiungere nucleotidi soltanto a piccolissimi tratti preesistenti. Questo problema viene risolto con l'intervento di un altro enzima, l'RNA polimerasi, che ha la stessa funzione della DNA polimerasi ma per i ribonucleotidi.

Il risultato è che ogni duplicazione comincia con un piccolissimo tratto, circa una decina di nucleotidi, che non sono di DNA ma di RNA.

Questo tratto viene detto "innesco" o "primer" e viene poi ovviamente eliminato ad opera dell'enzima che viene dalla parte opposta, che toglie l'innesco e polimerizza DNA:

Quindi, nella molecola di DNA finale non vedremo più questi inneschi perché vengono "digeriti", cioè eliminati. L'RNA polimerasi su alcuni testi viene denominata "primasi".

Energia e direzione di crescita del DNA

Fin dall'inizio abbiamo sempre detto che la crescita del DNA avviene in direzione $5' \rightarrow 3'$ (i nucleotidi si aggiungono con un legame estere tra l'ossigeno del C_3 ed il fosforo del nucleotide successivo in posizione 5). Questa direzione, definita crescita di "coda", avviene con la reazione del gruppo OH del C_3 che reagisce con il gruppo OH del gruppo fosfato (si elimina una molecola di H_2O) e la formazione di un legame estere tra il fosforo del C_3 del nucleotide successivo con l'ossigeno del C_3 del precedente nucleotide e così via, con l'allungamento della catena.

La direzione di crescita è quindi $5' \rightarrow 3'$ (tra il C in testa alla catena e l'ultimo gruppo che è libero per reagire), mentre il legame è $3' \rightarrow 5'$. Per molto tempo si è detto che questo era un problema della DNA polimerasi in quanto non riusciva ad effettuare l'inverso, ossia una crescita di "testa".

In realtà la crescita di testa è impossibile per motivi energetici (questa crescita comporterebbe la reazione tra il gruppo fosfato di un nucleotide e l'ossigeno del C_3 del nucleotide successivo).

Infatti, abbiamo detto che ciascun nucleotide porta con sé l'energia, ciò significa che al momento della formazione del legame, il gruppo pirofosfato si stacca fornendo l'energia per il legame.

Se l'energia è portata dal nucleotide che entra, ma quella che viene usata è l'energia del nucleotide già legato (nel caso che risulti sbagliato) (può succedere perché il riconoscimento avviene per complementarietà, senza l'intervento di enzimi), il più delle volte ci si accorge che l'appaiamento non è perfettamente corretto ed il nucleotide che è entrato per sbaglio può essere eliminato.

In questo caso interviene un enzima che rompe il legame, il nucleotide sbagliato se ne va, entra un nuovo nucleotide che porta energia, si riforma il legame e tutto può proseguire.

*¹ indica una crescita normale

*₂ non è il gruppo pirofosfato (?) a staccarsi ma 2 dei 3 fosfati del nucleotide (o meglio nucleoside tra i fosfati)

Al contrario, la crescita di "testa" vede l'energia offerta per il legame non più dal nucleotide che entra ma da quello che è già nella catena. In questo caso, se il nucleotide fosse sbagliato non ci sarebbe l'energia per legare il nuovo nucleotide perché l'energia sarebbe già stata consumata nella formazione del legame precedente che poi è stato rotto ma comunque non è più disponibile.

In pratica, in questo tipo di crescita l'energia per il legame non sarebbe più portata dal nucleotide che entra ma da quello che è già entrato ed una volta consumata, non si avrebbe più la possibilità di fare correzioni. Ricordiamo che abbiamo detto che gli errori sono molto rari perché sono corretti; in pratica noi vediamo il risultato di un meccanismo di riparazione già intervenuto.

Infatti, anche quando si parla di sostanze mutagene, non viene tanto saggiato quanto una sostanza induca danni al DNA, ma quanto il sistema di riparazione funzioni. In pratica si evidenziano pochi errori perché di fatto molti sono stati già corretti, specialmente nei procarioti, nei quali la duplicazione è velocissima (un batterio si riproduce nell'arco di un quarto d'ora) e gli errori sono abbastanza frequenti e quindi la correzione deve essere molto allertata. È indubbio che ci poteva essere un'altra fonte di energia ma ciò avrebbe comportato la necessità di due meccanismi energetici, uno "regolare" e l'altro di emergenza. Questo avrebbe complicato le cose mentre è molto più semplice scegliere una direzione di sintesi ed attenersi a quella.

Quindi, la DNA polimerasi non è in grado di fare attività endonucleasica (cioè di sintesi) al contrario per un problema energetico.

Tuttavia, ciò può comportare un problema.

Direzione di apertura dell'elica

La bolla di duplicazione è costituita da due forcelle di duplicazione. Analizzando una singola forcella per semplicità, si vede che, se la crescita ha direzione $5' \rightarrow 3'$, lo stampo ha direzione opposta ($3' \rightarrow 5'$) perché la catena del DNA è antiparallela. Tuttavia, la direzione di apertura dell'elica è una sola e quindi su un filamento posso mandare avanti la sintesi di continuo perché la direzione di sintesi è la stessa della direzione di apertura; dall'altra parte però, la duplicazione del DNA va in senso contrario all'apertura dell'elica il che vuol dire che non si può avere una sintesi continua ma si avrà una sintesi a tratti. Quindi, per ciascuna forcella di duplicazione, avrò un filamento guida che vedrà una duplicazione continua perché il verso della duplicazione è uguale alla direzione di apertura dell'elica; dall'altra parte, si avrà un filamento in ritardo perché la duplicazione deve avvenire a tratti. Perciò per un filamento c'è un solo innesco ed una sola polimerasi, mentre per l'altro filamento ci sono tanti inneschi e tante polimerasi quanti sono i frammenti che si devono formare. La conseguenza è che uno dei due filamenti viene copiato con molto ritardo rispetto all'altro. L'innesco viene eliminato attraverso un enzima che interviene e lo stacca (ha attività esonucleasica) e la DNA polimerasi che sta procedendo da dietro polimerizza, anche quel pezzetto.

(Gli sbagli sono possibili perché, per esempio, c'è una certa instabilità delle basi, cioè il fenomeno della tautomeria: la base può cambiare momentaneamente disposizione perché un H salta da un ossigeno ad un altro. Perciò, una base che normalmente fa due legami, si trova a farne tre il che comporta che possa riconoscere un'altra base.

Quando l'instabilità delle basi è più duratura o non si fa in tempo a correggere, la base anomala viene incorporata e da qui partono i cambiamenti del DNA, le mutazioni, la variabilità e così via. D'altra parte, la complementarietà è dovuta soltanto a motivi fisici e chimici cioè sempre alla formazione di legami H).

L'origine della duplicazione normalmente avviene in zone in cui c'è una maggiore abbondanza di basi A-T perché ci sono solo due legami H e quindi più facilmente vengono rotti.

Riassumendo, l'elica si apre con la formazione di una bolla di duplicazione, intervengono le elicasi, che aprono il DNA sia da una parte che dall'altra, intervengono le proteine di srotolamento (o destabilizzatrici) che mantengono aperta la molecola di DNA da entrambi le parti, la torsione dell'elica sottoposta ad apertura viene risolta dall'intervento degli appositi enzimi, quindi comincia la duplicazione vera e propria. Abbiamo parlato della necessità di un "primer", cioè di un innesco che dia la possibilità alla DNA polimerasi di aggiungere nucleotidi ad un tratto già preesistente (che sarà poi eliminato). Su una metà dell'elica la duplicazione comincia e, da una parte va nello stesso verso dell'apertura e quindi è una duplicazione continua con un filamento guida.

Nell'altro filamento la duplicazione avviene a tratti formando frammenti detti Okazaki (scopritore) e, dovendo avvenire a tratti, cioè dovendo aspettare che l'elica si apra per poter duplicare, si ha un filamento in ritardo. Dall'altra parte le cose sono esattamente ribaltate perché la direzione di apertura è opposta. Quindi, quello che nella prima forcella era il filamento in ritardo, diventa il filamento guida. Questo indica che non è una proprietà del DNA essere filamento guida o in ritardo ma è esclusivamente legato alla direzione di apertura; se cambia la direzione di apertura perché l'altra forcella va in direzione opposta, i filamenti si scambiano il ruolo. Perché tutto poi coincide, la DNA polimerasi che viene dalla forcella di destra si ricongiungerà con la forcella di sinistra e viceversa perché le DNA polimerasi convergono verso la stessa parte. Quindi, per ogni bolla di duplicazione avremo inizialmente due DNA polimerasi per filamento (cioè 4) ma diventano molte di più perché ogni volta che ricomincia a sintetizzarsi un frammento si ricomincia da capo. Sicuramente ci sono due elicasi, una che va in un verso ed una in un altro; i vari frammenti di Okazaki, alla fine si legheranno fra loro in modo da dare un filamento unico di DNA, con l'intervento degli enzimi DNA ligasi che sono in grado di fare un legame di polimerizzazione legando fra loro i vari frammenti.

Nei procarioti esiste una sola bolla di duplicazione con due forcelle e la velocità di duplicazione è di 45.000 paia di basi al minuto, mentre negli eucarioti la velocità è molto minore (1.500 paia di basi al minuto, 30 volte meno) e quindi c'è la necessità che su ciascuna molecola di DNA si abbiano bolle di duplicazione. Ciò comporta che la duplicazione del DNA negli eucarioti sia asimmetrica, cioè può succedere che tratti di DNA molto lontani vengano duplicati contemporaneamente mentre tratti anche molto vicini vengono duplicati in tempi molto diversi.

Lezione 14 (13/03/01)

Abbiamo detto che la crescita di "testa", cioè in direzione $3' \rightarrow 5'$, è impossibile per motivi energetici perché è necessario che l'energia sia portata dal nucleotide che entra perché ciò permette di effettuare eventuali ripari del DNA cioè togliere il nucleotide erroneamente entrato e sostituirlo con un altro. Se l'energia viene portata dal nucleotide che entra, ci sarà sempre energia a disposizione per formare il nuovo legame; se invece l'energia fosse fornita dal nucleotide già entrato, come prevede una crescita di "testa", cioè dalla parte del fosforo in direzione $3' \rightarrow 5'$, non si potrebbe effettuare riparo perché, fatto il primo legame estere con il nucleotide magari erroneamente inglobato, una volta eliminato questo, non avremmo più energia per farne entrare un altro. Questa è una delle spiegazioni che viene data al fatto che realmente la DNA polimerasi non riesce a polimerizzare in direzione $3' \rightarrow 5'$ cioè non riesce a legare il fosforo in posizione 5 con l'OH in posizione 3 del nucleotide successivo. La necessità di sintesi in direzione $5' \rightarrow 3'$ fa sì che sui due filamenti che sono antiparalleli, si abbiano situazioni diverse dovute esclusivamente al problema dell'apertura dell'elica. Inevitabilmente un filamento si forma nella stessa direzione dell'apertura dell'elica ed un altro filamento si forma in direzione opposta, ciò porta ad avere un filamento continuo (quello che va nella stessa direzione di apertura), nel quale basterà un solo innesco ed una sola polimerasi perché termini la sua formazione dalla parte opposta; avremo un filamento che cresce a tratti a frammenti e quindi sarà leggermente in ritardo, avremo più inneschi (tanti quanti saranno i frammenti) ed avremo ovviamente più polimerasi. Da notare che, quello che accade in una forcella di duplicazione è esattamente l'opposto di quello che avviene nell'altra forcella, ad indicare proprio che tutto il gioco dei frammenti di Okazaki dipende solo ed esclusivamente dalla direzione di apertura dell'elica. Poiché negli eucarioti si hanno più bolle di duplicazione bidirezionale, tratti di DNA lontani fra loro possono essere duplicati contemporaneamente mentre tratti molto vicini, se si trovano alle estremità delle forcelle di duplicazione vengono duplicati in tempi molto diversi pur essendo adiacenti (duplicazione asimmetrica). Nei procarioti si ha una sola bolla di duplicazione bidirezionale. Infine, la velocità di duplicazione è di 45.000 paia di basi al minuto per i batteri e 1.500 paia di basi per gli eucarioti (la duplicazione più lenta da origine a meno errori). Nei procarioti la duplicazione del DNA a livello molecolare è abbastanza simile a quella degli eucarioti, cambiano le polimerasi (incluse alcune polimerasi di correzione che negli eucarioti non ci sono); in particolare, ricordiamo che il DNA dei procarioti è circolare e quindi la duplicazione deve essere un po' diversa, dando origine a quella che viene definita forma a teta perché la micrografia elettronica mostra una figura che somiglia all'omonima lettera greca. In pratica si ha l'inizio di una bolla di duplicazione, il DNA si scolla, come se si aprisse un panino, e man mano che le basi sono disponibili vengono copiate.

Rientriamo adesso nel citoplasma per vedere quali funzioni cellulari vi avvengono o comunque negli organelli in esso presenti descritti quando abbiamo parlato della cellula.

Prima di parlare dei processi che avvengono all'interno della cellula, ricordiamo che buona parte di essi sono fondati su reazioni biochimiche che, come abbiamo accennato all'inizio del Corso prevedono il consumo o la formazione di energia. Si è anche detto che tutte le volte che un a.c. fa reazioni di condensazione, cioè unisce molecole fra loro, ha bisogno di energia per formare i legami, mentre tutte le volte che le macromolecole vengono degradate, cioè i legami che le compongono vengono rottami, si ha una produzione di energia. Nel momento in cui la c.c. costruisce molecole, cioè effettua processi di condensazione, tende a mettere ordine in un caos.

Per spiegare questo concetto, supponiamo che nella c. si abbiano delle molecole sparse che possono costituire un certo grado di disordine; il fatto di legarle fra loro per formare molecole più complesse e più grandi, è un tentativo per mettere ordine.

Tuttavia, ci sono due leggi della termodinamica che dicono:

- **la legge della termodinamica:** l'energia non può essere né creata né distrutta, ma solo convertita da una forma all'altra. Per esempio un'energia chimica può essere trasformata in calore, l'energia elettrica può essere trasformata in energia luminosa o in potenza per far funzionare un elettrodomestico, ecc.
- **2a legge della termodinamica:** tutti i processi naturali tendono a far aumentare il disordine dell'universo.

Sembra non tornare per la cellula perché, tutte le volte che la c. costruisce macromolecole va contro la 2a legge della termodinamica, ma ciò non può essere perché una legge è provata, dimostrata ed è regola generale. Inoltre, sappiamo che nel mettere ordine la c. consuma energia e ciò andrebbe contro la prima legge (l'energia non può essere né creata né distrutta).

Quindi, o i processi biochimici della c. non sono veri (impossibile), o la c. è un sistema isolato nel quale avviene qualcosa che non avviene nel resto dell'universo (impossibile), o ammettiamo che la c. non è un sistema isolato, che fa parte di un universo più grande con il quale scambia materia ed energia. Questa definizione è quella del **metabolismo**. Però, pur tendendo la c. a mettere ordine nelle sue molecole ed a consumare energia, in realtà si verifica uno scambio con l'esterno in modo che c'è solo una conversione dell'energia ed un ciclo della materia così che, se da una parte si crea l'ordine, dall'altra si crea il disordine.

Quando parliamo di **metabolismo** parliamo di due momenti essenziali, contrari fra loro: l'anabolismo ed il catabolismo. L'anabolismo tende a mettere ordine (costruisce molecole) e consuma energia, il catabolismo (reazioni di degradazione) tende a mettere disordine ed a creare energia rompendo legami. Prima di studiarli, dobbiamo dire che alla base di tutti i processi metabolici o biochimici che avvengono nella cellula ci sono gli enzimi.

Enzimi (vedi anche appunti)

Sono molecole proteiche, catalizzatori (hanno la capacità di accelerare le reazioni biologiche (molecole proteiche, non chimiche)).

Proprietà generali

- l'enzima non è mai consumato cioè interviene nella reazione senza essere consumato e si libera alla fine della reazione;
- catalizzano solo reazioni termodinamicamente possibili, cioè reazioni spontanee che però impiegherebbero molto tempo per avvenire. Sono reazioni reversibili (avvengono in ambedue i sensi);
- sono specifici per ogni reazione, a differenza dei catalizzatori inorganici (per es. sali di nichel).

Riflettiamo su alcuni punti. L'enzima è un catalizzatore specifico, cioè per ogni reazione interviene uno specifico enzima; è una proteina e le proteine si formano seguendo le indicazioni del DNA e quindi un cambiamento del DNA può comportare un cambiamento nella proteina, probabilmente un

l'impedimento nella sua funzione, probabilmente un'impossibilità da parte dell'enzima ad effettuare un certo tipo di reazione. Questo è uno dei motivi per cui diciamo che il DNA guida la vita della c., pur quando che esso costruisce soltanto proteine (nelle altre reazioni apparentemente non è coinvolto), poiché tutte le reazioni sono mediate da enzimi, che sono proteine, ecco come il DNA riesce a guidare tutta la vita della c. utilizzando le proteine. L'importanza di quanto appena detto sarà evidente quando parleremo di catene metaboliche e vedremo che qualunque espressione del nostro organismo è spesso il risultato di una serie di trasformazioni di una sostanza che effettua vari passaggi intermedi prima di arrivare al prodotto di cui vediamo l'effetto. Se pensiamo che ogni passaggio di questa catena metabolica è mediato da enzimi, ci accorgiamo di quanto è variegato il nostro apparire (ci può essere un blocco a qualsiasi livello e questo fa sì che ci possano essere tanti aspetti diversi che impareremo a chiamare fenotipi).

~~Tornando agli enzimi, abbiamo detto che accelerano reazioni che comunque avverrebbero.~~

~~Le reazioni biochimiche e chimiche vengono classificate come endoergoniche o esoergoniche.~~

~~Le esoergoniche sono reazioni che liberano energia cioè se A deve trasformarsi in B, tra il reagente ed il prodotto c'è una differenza di energia che è quella che viene liberata. In pratica, si parte con una energia piuttosto alta ma all'effettuarsi della reazione che deve avvenire, l'energia del prodotto è minore con rilascio di energia nell'ambiente. Al contrario, la reazione endoergonica prevede un consumo di energia: ciò sta a significare che il prodotto ha un'energia superiore a quella del reagente e quindi, perché la reazione avvenga, deve essere fornita dall'esterno.~~

~~È evidente che le reazioni endoergoniche non avvengono senza fornire energia dall'esterno, mentre quelle esoergoniche, non avendo bisogno di energia, avvengono spontaneamente.~~

→ ~~Perciò, quando si parla di reazioni spontanee ci si riferisce a reazioni esoergoniche, che sono anche le uniche nelle quali intervengono gli enzimi.~~

~~Nello specifico, gli enzimi agiscono abbassando l'energia di attivazione (vedi appunti con figure).~~

~~In pratica, sia nelle reazioni eso- che endoergoniche, l'andamento dell'energia all'inizio della reazione è più o meno lo stesso cioè, entrambe le reazioni hanno bisogno all'inizio di una quantità di energia che viene definita energia di attivazione. Questa è in pratica la quantità di energia necessaria per innescare la reazione che successivamente procede spontaneamente.~~

~~È questa la fase in cui intervengono gli enzimi, abbassando l'energia di attivazione e quindi favorendo la reazione.~~

~~L'enzima, essendo una proteina, presenta dei siti adibiti a svolgere quella certa funzione (spesso struttura terziaria, globulari) e svolge la sua funzione solo se il sito attivo è disponibile ad accogliere il substrato. Per esempio, una molecola di saccarosio (disaccaride) deve essere scissa in glucosio + fruttosio: interviene l'enzima che possiede un sito di riconoscimento per il saccarosio, si forma un composto intermedio che è altamente energetico che vede uniti insieme il substrato e l'enzima e poi si ha la rottura del substrato e quindi la liberazione dell'enzima e del prodotto.~~

~~Dopo la reazione, l'enzima ha mantenuto la sua conformazione, non si consuma né modificato ed è pronto per un'ulteriore reazione.~~

Componente

Vista la sua proteica (anche se ci possono essere altre componenti molecolari), l'enzima è sensibile ad alcune caratteristiche dell'ambiente in cui lavora:

- **temperatura:** ciascun enzima lavora ad una t° ottimale che in genere è tra i 37 ed i 40 gradi (circa la t° basale dell'organismo). Essa viene misurata in quanto a quella t° si raggiunge il massimo nella velocità di reazione;
- **pH:** abbiamo già citato gli enzimi idrolitici dei lisosomi che lavorano solo in ambiente acido. Altri enzimi che lavorano a pH acido sono quelli coinvolti nella digestione a livello dello stomaco. In generale, la maggior parte degli enzimi lavora bene al pH della c. (7.4-7.6), tuttavia ci sono degli enzimi il cui pH ottimale è acido. Ancora una volta, ci accorgiamo del pH ottimale perché a quel pH la reazione raggiunge la massima velocità di catalizzazione. Ciò significa che la variazione del pH può influenzare il lavoro di un enzima in funzione di quanto è ampia rispetto al pH di lavoro (es.: un enzima che di solito lavora a pH 3, posto a pH 7-8 non funzionerà affatto, se lo portiamo a 3.5 o a 2, funzionerà ma non in maniera ottimale);
- **concentrazione del substrato:** al suo aumento aumenta anche per un po' la velocità di reazione perché c'è maggiore quantità di sostanza di partenza perciò si velocizzerà la reazione. Si arriva però ad un punto in cui si verifica un "plateau" (linea non più in crescita ma che si appiattisce) e questo è dovuto al fatto che ad un certo punto la quantità di enzima disponibile si esaurisce e quindi anche aumentando il substrato, la velocità di reazione non aumenta più perché vengono a mancare proprio le molecole di enzima. Al contrario, se aumento la concentrazione dell'enzima, ottengo una retta in crescita che non conosce plateau (fino a che non finisce il substrato), perché aumentando l'enzima, aumenta la velocità di reazione;
- **l'attività enzimatica può essere regolata:** abbiamo detto che si sono dei siti dove l'enzima si lega per riconoscere il substrato, ci sono delle molecole che riescono a legarsi all'enzima prima del substrato, se per esempio sono in quantità maggiore. Si ha quindi una competizione. Ci sono poi casi in cui l'enzima per essere attivato ha bisogno di un'altra molecola (in quel caso ha due siti di riconoscimento) che legandosi all'enzima lo attiva e lo mette in condizioni di riconoscere il vero substrato su cui deve agire (la molecola attivatrice è detta effettore). In pratica, i siti di riconoscimento del substrato cambiano conformazione dopo il legame con l'effettore, mettendo l'enzima in grado di riconoscere il substrato. I casi in cui l'enzima cambia conformazione o per la presenza di un effettore o per la concentrazione di substrati diversi, sono casi di **allosteria**. Si parla di interazioni allosteriche quando l'enzima può cambiare conformazione e quindi riconoscere un substrato o un altro o niente; esse sono estremamente importanti per il funzionamento della c. proprio perché a volte la presenza di un substrato piuttosto che un altro fa cambiare conformazione all'enzima e dirige la reazione verso un altro prodotto rispetto a quello atteso.

Gli enzimi presentano una grande varietà proprio perché sono specifici per ogni reazione biologica. In genere vengono suddivisi per classi a seconda dell'azione che svolgono.

- **Ossidoriduttasi:** intervengono nelle reazioni di ossido-riduzione (NAD, FAD, citocromi).

Le molecole ossidate sono quelle che hanno perso o non hanno H cioè elettroni, le molecole ridotte sono quelle che hanno accettato o hanno H cioè elettroni. Ci sono molecole che sono in grado di trasportare elettroni, che sono proprio questi enzimi di ossidoriduzione, ed essendo in grado di fare ciò, possono passare da uno stato ossidato (quando hanno ceduto gli elettroni) ad uno ridotto (quando accettano gli elettroni). Il substrato è la sostanza alla quale tolgono o cedono elettroni: se il glucosio viene ossidato, esso è il substrato al quale vengono tolti degli elettroni.

La capacità di accettare e di cedere elettroni è legata ad un'altra caratteristica delle molecole chimiche: l'elettronegatività. Essa è la capacità di accettare elettroni proprio perché la molecola ha una tendenza ad attrarli verso di sé. Possiamo dire che, tutte le volte che una molecola accetta elettroni (senza consumo di energia), si trova in uno stato di maggiore elettronegatività rispetto alla molecola da cui li ha presi. Quando li cede, rispetto alla sostanza a cui li cede, si trova in uno stato di minore elettronegatività. Quindi, tutte le volte che vediamo dei passaggi di elettroni da una sostanza all'altra, si parte da un'elettronegatività minore ad una via via sempre maggiore.

In pratica i passaggi di elettroni avvengono grazie al fatto che la sostanza che accetta è più elettronegativa di quella che precede e la reazione che avviene è di fatto un'ossido-riduzione in quanto la molecola che accetta elettroni si riduce e quella che li ha persi si è ossidata.

Quando un elettrone viene ceduto spontaneamente (senza consumo di energia) è evidente che passa da un livello energetico più alto ad uno più basso (altrimenti si dovrebbe fornire energia).

Quindi, all'aumentare dell'elettronegatività si osserva una diminuzione nell'energia della sostanza. Perciò le reazioni di ossido-riduzione sono reazioni accoppiate che vedono il passaggio di un elettrone spontaneamente da una molecola che lo cede e si ossida ad una che lo accetta e si riduce, essendo più elettronegativa della sostanza che lo cede ma ad un livello energetico minore di quella che la precede. Le ossidoriduttasi sono enzimi che intervengono proprio con il ruolo di trasportare gli elettroni (prenderli e cederli).

- **Ligasi:** Catalizzano il legame tra due composti utilizzando ATP o GTP o altro, sono delle sintetasi che abbiamo nominato in quanto intervengono nel legare tra loro i frammenti di Okazaki.
- **Idrolasi:** Sono enzimi idrolitici, come quelli che troviamo nei lisosomi. Scindono il substrato (glucosio, DNA, RNA, ecc.) introducendo nel legame da scindere una molecola di H_2O .
- **Liase:** Sono delle decarbossilasi cioè enzimi che sono capaci di togliere molecole di CO_2 dalle sostanze. Se si pensa che si deve degradare il glucosio e che questo è fatto anche di C ed O, e se si pensa che si deve restituire all'atmosfera anidride carbonica (vedremo perché), indubbiamente le decarbossilasi hanno una grande importanza.
- **Isomerasi:** Modificano un substrato trasformandolo nel suo isomero.
- **Transferasi:** Trasportano un frammento chimico ad un accettore (es. un gruppo fosfato da una molecola ad un'altra).

Fatta questa carrellata sugli enzimi, il nostro scopo è quello di parlare del metabolismo cioè di questo flusso di materia e di energia che avviene tra la cellula e l'ambiente (altre cellule e organismi). Abbiamo visto che uno dei problemi degli organismi è quello di costruire molecole e quindi di avere bisogno di energia per effettuare reazioni di condensazione. L'energia non si crea e

Lezione 15 (20/03/01)

gi tratteremo della trasformazione dell'anidride carbonica in glucosio cioè in una molecola la quale si può ricavare energia utile per la cellula. Ricordiamo che parleremo esclusivamente la organizzazione del carbonio sotto forma di glucosio e quindi del ricavo di energia da questa molecola ma in realtà non dobbiamo dimenticare che la c. ricava energia anche dalle proteine e dai lipidi. Ovviamente, quando parliamo di proteine, grassi così come per il glucosio, ci riferiamo per i procari (non autonomi nel costruire queste molecole) a molecole ingerite per mezzo dell'alimentazione. La differenza tra eterotrofi ed autotrofi è che questi ultimi sono organismi completamente autonomi nel costruire molecole organiche rispetto ad organismi che dipendono da altri per costruirle o comunque per utilizzarle. L'uomo così come tutti gli eterotrofi deve costruire le proteine (la sintesi delle quali dipende dal DNA), ma non è autonomo perché ha bisogno di aminoacidi che non è in grado di costruire e deve comunque prendere dall'alimentazione.

Un organismo autotrofo è in grado di organizzare il carbonio cioè passare da molecole inorganiche a molecole organiche, come per esempio costruire glucosio, partendo da anidride carbonica:

Ricordiamo che la storia dell'autotrofia non è cominciata con la fotosintesi (sintesi di glucosio che utilizza la luce solare come fonte energetica) ma con la chemiosintesi.

Esistono ancora tantissimi batteri che elenchiamo di seguito che sono in grado di costruire glucosio partendo da CO_2 ma usando come fonte energetica le reazioni di ossido-riduzione di composti inorganici:

metanogeni (è coinvolto il metano);

nitrobatteri (è coinvolto l'acido nitroso);

ferrobatteri (acido ferrico e ferroso);

zolfobatteri (lo zolfo);

idrogenobatteri (l'idrogeno).

La chemiosintesi è la forma più antica di autotrofia perché è la più semplice. Quando parleremo di evoluzione del metabolismo vedremo che è difficile stabilire se sono sorti prima gli autotrofi o gli eterotrofi ma è certo che tra gli autotrofi i primi sono stati sicuramente i chemiosintetici.

Subito dopo la chemiosintesi si è evoluta un'altra forma di autotrofia: la fotosintesi.

In questa forma la fonte energetica è data dalla luce che viene catturata da una molecola, la clorofilla che è in grado di eccitarsi e, dopo essere stata colpita dai quanti di luce, perde degli elettroni. Quindi sicuramente, oltre a una fonte energetica, occorrono molecole che siano in grado di donare protoni ed elettroni. D'altra parte, ricordiamo che la CO_2 è una molecola ossidata mentre il glucosio è ridotto perciò, per ridurre una molecola massivamente ossidata come la CO_2 saranno necessari protoni ed elettroni e quindi molecole in grado di donarli.

Si insiste su questo perché si conoscono due tipi di fotosintesi definiti impropriamente anaerobia ed aerobia, riferendoci ad un sottoprodotto che viene emesso (ossigeno nell'aerobia, che non viene emesso nell'anaerobia).

Tutti i batteri fotosintetici effettuano una fotosintesi che utilizza come donatori di elettroni e di protoni acido solfidrico o idrogeno o alcoli; questi sono i batteri verdi e purpurei e si distinguono da un punto di vista evolutivo dai cianobatteri, categoria di batteri che invece utilizza H_2O , perché non emettono ossigeno durante la fotosintesi cioè non lo hanno come sottoprodotto.

Al contrario, i cianobatteri (alghie verdi-azzurre messe tra i batteri perché hanno una cellula procariote) i primi ed unici batteri in grado di utilizzare H_2O per la fotosintesi, emettono come sottoprodotto l'ossigeno. È intuitiva l'importanza evolutiva dei cianobatteri: vedremo che all'inizio della formazione del mondo c'era H_2O in abbondanza ma bisognava saperla utilizzare.

I cianobatteri hanno evoluto un sistema per utilizzare l' H_2O ; vedremo che si è trattato di un secondo fotosistema cioè di un sistema in grado di catturare la luce, che fosse ad un livello energetico più basso e quindi in grado di utilizzare l' H_2O .

Questo cambiamento che poteva sembrare utile solo perché utilizzava H_2O che era presente in abbondanza, ha invece sviluppato uno scenario del mondo totalmente diverso perché utilizzando questo elemento come donatore di protoni ed elettroni si è liberato ossigeno nell'atmosfera, l'aver liberato O_2 nell'atmosfera ha dato inizio al catabolismo aerobio cioè alla degradazione di molecole organiche in presenza di O_2 , processo molto più vantaggioso di quello anaerobio ed inoltre l' O_2 molecolare che prima non c'era disciolto nell'aria, ha formato l'ozono che ha schermato i raggi ultravioletti e questo ha permesso il passaggio della vita dall' H_2O alla terra ferma.

Uno scenario stravolto, quindi, solo perché un gruppetto di batteri ha casualmente imparato (le cose evolutive avvengono sempre casualmente e poi si fissano) ad utilizzare l' H_2O durante la fotosintesi. Poiché la fotosintesi diventava utile, è stata il processo che si è fissato maggiormente perciò dai cianobatteri in poi tutti gli altri organismi autotrofi la hanno utilizzata sempre come processo di autotrofia. Quindi i protisti autotrofi (tutte le alghie) che hanno cellule eucarioti e le piante effettuano fotosintesi cosiddetta aerobia.

Tornando al fatto che la fotosintesi libera ossigeno, ci riferiamo alla seguente formula generale (vedi appunti) che è la rappresentazione di tutto il processo fotosintetico in presenza di H_2O :

Energia



Dal punto di vista biologico questa è la formula corretta in quanto durante il processo di fotosintesi si formano anche 6 molecole di H_2O . Inoltre:

- l' O_2 molecolare deriva tutto dall' H_2O e non dalla CO_2 e poiché si liberano 6 molecole di O_2 , dobbiamo immaginare che siano coinvolte 12 molecole di H_2O . Sappiamo che l' O_2 deriva tutto dall'acqua attraverso due prove: la prima, indiretta, è che tutti gli organismi che non utilizzano H_2O non liberano O_2 , è banale ma se l' O_2 derivasse dall'anidride carbonica lo dovrebbero liberare anche gli organismi come i batteri purpurei e verdi. La prova diretta e scientificamente corretta è data dall'aver usato H_2O con ossigeno pesante durante la fotosintesi, e di avere verificato che l'ossigeno che si liberava era tutto ossigeno pesante.

- Dei 24 atomi di H, 12 finiscono nella molecola di glucosio e 12 formano H_2O .

- Dei 12 atomi di O_2 della CO_2 , 6 vanno nella molecola del glucosio e 6 vanno nell' H_2O .

Descriviamo molto sinteticamente il processo della fotosintesi:

la luce solare viene catturata dalla clorofilla, un alcoolifitolo, pigmento che assorbe la luce solare e si eccita. Negli eucarioti (protisti e piante) tutto ciò avviene nei cloroplasti a livello dei tilacoidi, le membrane appiattite che costituiscono la trama interna presente nel cloroplasto.

- Nei procarioti che non hanno i cloroplasti il processo si organizza sulla membrana plasmatica (la fotosintesi, con o senza H_2O è effettuata da batteri verdi, batteri purpurei e cianobatteri).

La clorofilla assorbe luce che eccita gli elettroni, gli elettroni vanno ad un livello energetico maggiore, si allontanano dalla clorofilla e vengono accettati da una molecola che è un accettore

ATENA ←
TESTO
primario di elettroni. Gli elettroni della clorofilla devono essere reintegrati e a questo scopo avviene quella che viene chiamata fotolisi dell' H_2O processo nel quale essa si scinde, si libera subito ossigeno molecolare e gli elettroni dell' H_2O vanno a reintegrare quelli persi dalla clorofilla.

Gli elettroni persi della clorofilla sono ad un livello energetico molto alto e quindi hanno un'energia potenziale che deve essere recuperata. Nel recupero di questa energia interviene quella che viene definita catena di trasporto degli elettroni, essa è costituita da una sequenza di molecole che sono ad un livello energetico sempre minore ma con un'elettronegatività sempre maggiore.

Ciò vuol dire che la prima molecola è meno energetica della precedente ma più elettronegativa, riuscendo a strappare l'elettrone al primo composto. L'elettrone in questo modo "viaggia" perché poi viene ceduto ad una molecola più elettronegativa ma meno energetica e così via.

Questo significa che se l'energia decresce, in questi passaggi si ha una continua cessione di energia che viene tutta convogliata a formare ATP che sarà ad uso esclusivo di questo processo (qui viene prodotto e qui viene consumato). Contemporaneamente si hanno due fotosistemi (due sistemi in cui c'è la clorofilla), gli elettroni che derivano dalla prima molecola di clorofilla, dopo questo viaggio e dopo aver formato ATP arrivano a reintegrare gli elettroni che il secondo fotosistema ha perduto.

I due fotosistemi funzionano in contemporanea, l'elettrone va ad un livello energetico maggiore e questa volta c'è il viaggio degli elettroni ma insieme ai protoni a formare NADPH, che insieme al FAD ed ai citocromi sono enzimi di ossidoriduzione, cioè enzimi che accettano e cedono elettroni e quindi li trasportano. Il NADPH è ridotto e quindi è pronto a cedere elettroni e protoni cioè è dotato di potere riducente (in grado di ridurre),

Riassumendo, nella prima fase è evidente la necessità della luce (fase luminosa) e si verifica l'eccitazione della clorofilla in due fotosistemi con la formazione di ATP (energia) e di NADPH (ridotto) che ha potere riducente.

I batteri che non utilizzano l' H_2O cioè i batteri purpurei e verdi mancano del fotosistema II che non a caso si chiama secondo (pur essendo il primo) perché si è evoluto successivamente e quindi non possono utilizzare l' H_2O perché il loro fotosistema è ad un livello energetico superiore a quello dell' H_2O e quindi non ce la fanno a prendere gli elettroni. Quando si è evoluto il secondo fotosistema allora si è potuto utilizzare l' H_2O .

ATP e NADPH saranno utilizzate nella fase cosiddetta oscura (la luce può esserci o non esserci), dove avviene il ciclo di Calvin che mira alla formazione di glucosio. Questa fase negli eucarioti avviene sempre nei cloroplasti, ma livello dello stroma (massa gel/sol simile al citoplasma che c'è

GLICOLISI + RESPIRAZIONE → AEROBI

GLICOLISI + FERTENTAZIONE → ANAEROBI

nel cloroplasto) e nei procarioti avviene nel citoplasma. Per formare la molecola di zucchero è necessaria energia perché si deve condensare (processo di anabolismo) cioè unire tra loro 6 molecole di anidride carbonica fino ad arrivare a C_6 , si deve inoltre ridurre la CO_2 perché da essa dobbiamo arrivare a $C_6H_{12}O_6$ quindi serve H ed l'energia (come ATP che si forma e si consuma nell'ambito dello stesso processo) sia un donatore di H sotto forma di NADPH, che sono stati formati nella fase precedente. Perciò in questa fase, con 6 cicli di Calvin usando potere riducente ed energia formati nella fase luminosa, si forma la molecola di carboidrato che è pronta per essere utilizzata per la struttura degli organismi autotrofi (cellulosa per le piante), come riserva (amido = tante molecole di glucosio unite fra loro), per ricavare energia. L'amido può essere ingerito dagli organismi eterotrofi per ricavare energia. Da questo momento in poi, autotrofi ed eterotrofi sono identici, cioè entrambi utilizzano glucosio per ricavare energia; la divisione va effettuata tra aerobi ed anaerobi.

Ricavare energia da una molecola potenzialmente energetica significa rompere i legami per costruire i quali si è consumata energia e riconvertire l'energia di legame per formare ATP (adenosintrifosfato), usato in tutti i processi che richiedono energia. Da questo momento in poi si effettua una distinzione tra aerobi e anaerobi perché degradare glucosio in presenza di ossigeno è molto più vantaggioso che farlo in assenza, in quanto si arriva ad una ossidazione completa della molecola di glucosio che vuol dire rompere tutti i legami ed estrarre tutta l'energia in essi contenuti e convertirla in ATP. In linea generale, in presenza di ossigeno abbiamo la glicolisi che viene seguita dalla respirazione cellulare. Quest'ultima consta del ciclo di Krebs e della fosforilazione ossidativa. Negli organismi anaerobi troviamo ancora la glicolisi seguita però da processi fermentativi (fermentazione). Il processo aerobio produce più ATP ma la glicolisi è il processo comune a tutti e due gli organismi. Questo ci porta a pensare che la glicolisi sia la via energetica più antica proprio perché comune a tutti gli organismi, anche a quelli che si sono sviluppati, sono cresciuti e vivono tuttora in assenza di ossigeno.

La glicolisi, processo biochimico comune a tutti gli organismi, avviene in assenza di ossigeno e avviene nel citoplasma (non ci sono differenze tra procarioti ed eucarioti). È confondente parlare di glicolisi aerobia ed anaerobia perché il processo in sé come lisi del glucosio è un processo unico, avviene in assenza di ossigeno ed è uguale per tutti. Se poi è seguita dalla respirazione, siamo negli organismi aerobi, se è seguita dalla fermentazione, siamo negli anaerobi.

Glicolisi

Come tutti i processi cellulari è una via di trasformazioni successive che parte dal glucosio per arrivare all'acido piruvico (è necessario sapere solo quello di seguito riportato, senza le reazioni). La glicolisi, pur essendo nella sua generalità un processo esoergonico, nelle prime tappe (4) è endoergonica cioè vede il consumo di energia. Infatti, una molecola di ATP si consuma nella prima tappa (glucosio → glucosio 6 fosfato) ed un secondo ATP si consuma nella terza tappa (fruttosio 6 fosfato → fruttosio 1-6 difosfato). È evidente che gli ATP vengono utilizzati per fosforilare il substrato. Di fatto, nelle prime 4 tappe della glicolisi abbiamo il consumo di 2 molecole di ATP (momento endoergonico). Questa prima fase della glicolisi è particolarmente importante perché alla

→ fine della 4. tappa il glucosio viene trasformato in due molecole a 3 atomi di C cioè fosfogliceraldeide o fosfoacetone (triosi). Già a questo punto è avvenuta quindi la lisi del glucosio. La seconda fase della glicolisi, che consta ancora di 5 tappe, va moltiplicata per due perché ciascuna molecola a 3 atomi di C va incontro ai processi che descriveremo sia in termini di consumo che di guadagno. Sottolineiamo che già alla prima tappa di questa seconda fase abbiamo la formazione di una molecola di NAD ridotto. Ciò vuol dire che si stanno già prendendo gli elettroni (H) che erano del glucosio, divenuto aldeide, e si stanno mettendo in una molecola in grado di trasportarli (NAD = enzima ossidoriduttasi che accetta e cede elettroni). Nel conteggio generale si deve ricordare che le molecole di NAD ridotto sono 2 (come i triosi). Nella tappa immediatamente successiva si forma una molecola di ATP ed un'altra si forma alla fine di tutto il processo.

Quindi, in questa seconda parte della glicolisi si è formata un po' di energia, in particolare 4 molecole di ATP e anche dell'energia potenziale racchiusa nel NAD ridotto. Alla fine del processo si forma acido piruvico, a 3 atomi di C ma in uno stato più ossidato rispetto allo zucchero.

Se facciamo un bilancio energetico, troviamo che nella seconda parte c'è stata la produzione di 4 molecole di ATP e nella prima parte c'è stato un consumo di 2 ATP; quindi, in tutta la glicolisi il guadagno netto di ATP è stato di sole 2 molecole. Inoltre, si ha un po' di energia racchiusa nel NADH che in determinati casi si potrà recuperare e due molecole di acido piruvico che non sono ancora completamente ossidate cioè contengono ancora molta energia.

Teoricamente, quindi, si ha ancora energia da recuperare, parte racchiusa nell'acido piruvico e parte nel NADH. Tuttavia, se la glicolisi è avvenuta in organismi anaerobi, non saranno in grado di recuperare altra energia cioè il suo guadagno in energia si fermerà qui perché dopo il processo di glicolisi negli anaerobi avviene la fermentazione.

Fermentazione.

→ Non porta a nessun guadagno energetico. Facciamo qualche esempio di fermentazioni:

- alcolica: l'acido piruvico si trasforma in acetaldeide e quindi in etanolo;
- lattica: l'acido piruvico si trasforma in acido lattico;

In entrambi i casi si ha una riduzione dell'acido piruvico con il passaggio all'alcol etanolo che ha preso due H o il passaggio all'acido lattico che ha preso ancora due H. Questa riduzione avviene a carico del NADH che si è formato prima e che cede gli elettroni per formare l'etanolo o l'acido lattico. In questo modo il NAD si riossida.

Abbiamo preso come esempio due tipi di fermentazione ed in entrambi i casi si è passati dall'acido piruvico, parzialmente ossidato, a prodotti (acido lattico ed etanolo) che sono ridotti.

Per ridurre l'acido piruvico si è utilizzato il NAD ridotto come donatore di elettroni (si era ridotto durante la glicolisi). La fermentazione viene effettuata dalla cellula solo ed esclusivamente per riossidare il NAD perché la sua quantità nella cellula non è molta; mentre il NAD ridotto formatosi in un organismo aerobio va incontro ad ossidazione come vedremo in seguito, negli organismi anaerobi che si fermano alla glicolisi rimane una quantità di NAD ridotto che deve essere riossidato. Altri tipi di fermentazioni, di varia applicazione nella vita di tutti i giorni sono:

- lattica: dallo yogurt (bacillus lattici);
- propionica: da l'emmental (bacillus propionici, batterio anaerobio che fermenta; la CO₂ che si libera dà il "buco");
- alcolica: da l'alcol etilico. È data dai lieviti, funghi che si trovano sulla buccia dell'uva che fermentano utilizzando il glucosio quando il mosto viene chiuso per non fare entrare l'aria. Danno anche la lievitazione del pane;
- la fermentazione lattica la troviamo anche eccezionalmente nelle cellule aerobiche che si trovano in deficit momentaneo di ossigeno. Nell'uomo troviamo questa condizione quando le cellule muscolari sono sottoposte ad intenso sforzo e quindi c'è un consumo eccessivo di ossigeno, anche perché più serve energia più si va in glicolisi, più NAD deve essere ossidato, più si va in fermentazione (l'acido lattico è tossico per le cellule).

Organismi aerobi

Il primo processo biochimico che avviene è il ciclo di Krebs. Negli eucarioti avviene sulle creste mitocondriali (membrana interna più volte ripiegata); nei procarioti avviene sulla membrana citoplasmatica. Il ciclo è definito tale perché inizia con un prodotto che è poi anche il prodotto finale di tutto il ciclo (non si devono sapere tutti i passaggi a memoria). Sapere quanto segue:

- Ricordiamo che nel citoplasma è avvenuta la glicolisi che ha lasciato 2 molecole di ATP, 2 di NAD ridotto o due molecole di piruvato.
- Il piruvato entra nei mitocondri e subisce subito una prima ossidazione: si libera una molecola di CO₂, si forma una molecola di NAD ridotto, il piruvato si trasforma in acetile, un gruppo a due atomi di C (CH₃COOH acido acetico).
- L'acido acetico reagisce con un coenzima (coenzima A - CoA-) e si forma acetil-CoA.
- L'acetil-CoA entra nel ciclo di Krebs o ciclo dell'acido citrico. Durante il ciclo si producono 3 molecole di NAD ridotto che contiene tutta l'energia degli elettroni. Parallelamente, si liberano due molecole di CO₂ e ciò significa che non abbiamo più nessun atomo di C del glucosio. Si formano ancora una molecola di ATP ed una molecola di FAD ridotto (altro trasportatore di elettroni).

Alla fine del ciclo di Krebs abbiamo ottenuto 3 molecole di NAD ridotto, 1 di FAD, 1 di ATP, 2 di CO₂. Se si considera anche la prima trasformazione avvenuta prima del ciclo, abbiamo:

4 NAD, 3 CO₂, 1 ATP, ed un FAD ridotto. Tutto questo va moltiplicato per 2 perché per ogni molecola di glucosio si hanno 2 molecole di acido piruvico.

Il NADH della glicolisi è rimasto nel citoplasma (se parliamo di eucarioti siamo nei mitocondri).

Il NADH dovrebbe entrare nei mitocondri ma non riesce a passare la membrana. Quindi, il NADH cederà i suoi elettroni al glicerofosfato che a sua volta entra nei mitocondri e cede gli elettroni al FAD. Non li può cedere al NAD per problemi energetici, infatti abbiamo detto che gli elettroni vengono ceduti a sostanze che siano sempre meno energetiche quindi se il NAD li cede al glicerofosfato questo non può tornare indietro ma deve cercare qualcosa che sia meno energetico e questo qualcosa è il FAD. Però ricordiamoci che le 2 molecole di NAD ridotto ottenute durante la glicolisi, di fatto nei mitocondri li ritroviamo sotto forma di FAD ridotto.

Lezione 16 (22/03/01)

Ricordiamo che il bilancio del ciclo di Krebs era di 4 NAD ridotti, 1 FAD ridotto, 1 molecola di ATP e 3 di CO_2 che ritornano nell'atmosfera e quindi fanno parte di quel ciclo di materia al quale abbiamo già accennato in quanto verranno riutilizzate per esempio per la fotosintesi e per la produzione di nuove molecole energetiche; l'ATP verrà utilizzato come tale.

Resta da vedere il destino delle 4 molecole di NAD ridotto e di 1 FAD (tutto moltiplicato per due perché durante la glicolisi il glucosio si è scisso in due molecole di piruvato). Inoltre, bisogna ricordare che queste molecole sono ricche di energia perché hanno "raccolto" gli elettroni del glucosio e quindi l'energia di legame del glucosio si è trasferita in queste molecole e va recuperata e convertita in ATP, unica molecola di scambio che la cellula utilizza.

Ricordiamo anche che erano rimaste in sospeso due molecole di NAD ridotto che si erano prodotte durante la glicolisi e che non riescono ad attraversare la membrana dei mitocondri (eucarioti) e perciò cedono gli elettroni ad una molecola vettrice che riesce ad entrare nei mitocondri.

Questa molecola è un glicerofosfato che a sua volta cede gli elettroni ad un FAD.

Ciò avviene per motivi esclusivamente energetici: infatti quando c'è un trasporto di elettroni, questi vengono ceduti sempre a molecole che siano meno energetiche e più elettronegative; quindi il glicerofosfato è meno energetico del NAD e non potrà cedere gli elettroni ad un NAD ma piuttosto ad una sostanza meno energetica che è il FAD. Quindi, a quanto detto finora dobbiamo anche aggiungere due molecole di FAD.

Le molecole di enzimi particolarmente energetiche perché trasportano gli elettroni, vengono convogliati in quella che prende il nome di catena di trasporto degli elettroni e fa parte di un secondo processo biochimico (che avviene nei mitocondri per gli eucarioti e sulla membrana plasmatica per i procarioti), detto fosforilazione ossidativa. Questo processo è costituito da una catena di trasporto formata da una serie di sostanze la cui energia decresce e la cui elettronegatività aumenta. Ciò consente ad ogni molecola successiva di strappare gli elettroni alla precedente e, trovandosi ad un livello energetico minore, ad ogni tappa si ha liberazione di energia.

L'ultimo accettore di questa catena è l'ossigeno che sappiamo essere uno degli atomi più elettronegativi: la presenza di questo elemento fa sì che sia chiamata fosforilazione ossidativa.

Ricordiamo anche che se non c'è ossigeno nella cellula, non viene innescato il ciclo di Krebs, per cui tutta la respirazione cellulare, sia il ciclo di Krebs sia la fosforilazione ossidativa, devono avvenire in presenza di ossigeno. Teoricamente, ci potremmo chiedere perché gli elettroni non possano essere ceduti dal NAD e dal FAD direttamente all'ossigeno piuttosto che effettuare questo trasporto tappa per tappa. I motivi, correlati fra loro, sono due:

- Se ci fosse una cessione di elettroni direttamente all' O_2 , si libererebbe una quantità enorme di energia tutta insieme che verrebbe persa parzialmente perché si trasformerebbe in calore;
- l'eccesso di calore all'interno della cellula le causerebbe un danno.

Per questo motivo l'energia contenuta nel NAD e nel FAD viene ceduta a tappe.

Le sostanze che entrano in gioco (vedi appunti) sono dei citocromi, molecole molto elettronegative (con diverso grado) e sono delle ossidoriduttasi. La prima molecola alla quale gli elettroni vengono ceduti è un Flavin Mono Nucleotide (FMN), subito dopo c'è un coenzima Q e poi comincia la serie dei citocromi. Si vede subito che c'è una differenza tra il NAD ed il FAD in termini di ingresso nella catena: infatti, il NAD ridotto cede gli elettroni al FMN mentre il FAD li cede al coenzima Q in quanto ha una energia minore del NAD. Quindi il FAD non può cedere i suoi elettroni al FMN perché questo è ad un livello energetico maggiore. Perciò il FAD entra dopo nella catena di trasporto e cede i propri elettroni al coenzima Q.

Questo è molto importante a livello di bilancio energetico perché l'energia che si libera durante il cammino di questi elettroni viene utilizzata con un processo molto complesso che prende il nome di chemiosintesi e tiene conto di pompe ATPasiche che sono sulle membrane perché i protoni non possono attraversarle (processo che non faremo) ecc. ma quello che è importante è che l'energia che viene recuperata in questo passaggio viene utilizzata per formare ATP.

Quindi, quando l'energia diventa sufficiente, si forma una molecola di ATP. Una prima molecola si forma nel passaggio degli elettroni dal NAD al FMN e da questo al coenzima Q: l'energia che si è liberata è già sufficiente per formare una molecola di ATP.

Questo vuol dire, però, che entrando dopo il FAD, formerà una molecola in meno di ATP (se durante un passaggio si libera dell'energia che viene recuperata, qualora si salti quel passaggio la molecola di ATP che si sarebbe formata in quel passaggio non si forma; inoltre il FAD parte da un livello energetico più basso rispetto al NAD).

Dopo la formazione della prima molecola di ATP gli elettroni continuano a viaggiare, il coenzima Q li cede al citocromo b, da questo al citocromo c e qui si forma un'altra molecola di ATP.

L'ultima molecola di ATP si forma nell'ultimo passaggio tra i citocromi (dal citocromo a all'a₃), prima che gli elettroni vengano ceduti all'ossigeno. Ciò vuol dire che per ogni molecola di NAD si recupera energia sufficiente per formare 3 molecole di ATP.

Per quanto riguarda il FAD, poiché è meno energetico e quindi entra in un momento successivo nella catena di trasporto, si saltano i primi due passaggi e si recupererà energia sufficiente a formare due ATP. Perciò, fare una distinzione tra NAD e FAD è molto importante perché per ogni molecola di FAD ridotto si produce una molecola in meno di ATP.

In realtà il NADH₁ (nicotinamidedinucleotide) è un enzima che fa ossidoriduzione ed è caricato positivamente perché accetta due elettroni ed un protone quindi si dovrebbe scrivere $NADH + H^+$ perché di fatto prende due H di cui uno lo trattiene completo di elettrone e protone mentre dell'altro estrae solo l'elettrone ed il protone gli viaggia accanto. Questo perché il NAD ossidato in effetti è caricato positivamente (NAD^+) quindi in realtà accetta un elettrone e poi un atomo di H completo. Quindi, di fatto cede due elettroni e torna alla forma ossidata che NAD^+ ; invece, si ha $FADH_2$, perché questo prende i due elettroni insieme ai protoni ed la forma ossidata è FAD.

Il meccanismo complesso che abbiamo citato prima, recupera anche i protoni che viaggiano a fianco agli elettroni e quindi alla fine del processo si forma anche H_2O .

Facendo i conti complessivi del bilancio energetico otteniamo:

N.B. FORMA OSSIDATA : NAD^+ ; FAD
FORMA RIDOTTA : $NADH (+H^+)$; $FADH_2$

| CITOPLASMA | Bilancio | ATP |
|---|--|--|
| glicolisi | 2 ATP 2 NAD ridotto (cede gli elettroni al glicerofosfato che li cede al FAD) $2 \cdot FADH_2$ | 2 |
| MITOCONDRI (eucarioti) | | |
| dalla glicolisi | 2 FAD ridotto | X 2 4 |
| dalla respirazione l'acido piruvico si trasforma in acetil CoA con una decarbossilazione | 1 NAD ridotto | X 2 6 |
| dal ciclo di Krebs | 3 NAD ridotti 1 FAD ridotto 1 ATP | X 2 X 2 X 2 18 4 2 |
| | Totale | 36 38!!! |

Si deve sottolineare che nei procarioti sono 38 perché non c'è il passaggio degli elettroni del NAD nei mitocondri, quindi non si perdono le due molecole, come negli eucarioti. In alcune cellule eucariotiche per un qualche motivo perché salta alcuni passaggi, si possono recuperare 38 molecole. Di fatto negli eucarioti sono 36. Alcuni testi ignorano il problema della cessione degli elettroni e riportano semplicemente 38, in quanto considerano direttamente i due NAD della glicolisi (con la formazione di 6 ATP invece di 4). Altri testi, come il Solomon, non spiegano i problemi energetici legati al passaggio ma riportano semplicemente che due molecole di ATP vengono consumate per fare entrare il NAD nei mitocondri (il NAD non entra nei mitocondri e gli ATP si perdono perché c'è un passaggio di elettroni che avviene fuori dal mitocondrio e quindi si perde energia).

Ricordiamo infine che abbiamo parlato di glucosio ma in realtà l'energia si recupera anche da altre molecole così come la via metabolica appena spiegata non è l'unica per recuperare energia dai carboidrati, per esempio esiste la via dei pentoso-5-fosfato che, utilizzando un'altra via di trasformazione, ci permette di ottenere energia (esistono 2 o 3 vie per ottenere energia dai carboidrati, quella descritta è la più comune).

Queste vie possono essere scelte alternativamente nelle cellule, ma c'è una certa specializzazione, cioè alcuni tessuti utilizzano preferenzialmente una via ed altri un'altra (le cellule muscolari usano preferenzialmente il ciclo di Krebs).

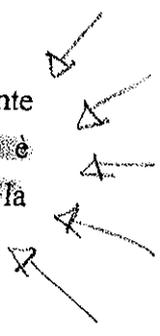
Tuttavia, dicevamo che il glucosio non è l'unica molecola energetica che noi (come tutti gli organismi autotrofi ed eterotrofi) utilizziamo per ricavare energia. Infatti possono essere usati anche i lipidi e le proteine; ognuna di queste macromolecole ha la propria via di degradazione ma convergono tutte nel ciclo di Krebs attraverso la formazione di acetil CoA.

Le proteine per esempio, con diverse tappe di degradazione che vedono prima la rottura del legame peptidico e poi la degradazione degli aminoacidi, possono formare acetil CoA che poi entra nel ciclo di Krebs.

Analogamente per i lipidi, che vengono prima scissi in acidi grassi e glicerolo e poi convertiti in acetilCoA. Ricordiamo che durante la glicolisi abbiamo una tappa nella prima fase in cui il glucosio si scinde in due molecole di gliceraldeide, questa può essere facilmente convertita in glicerolo e da questo facilmente si formano i lipidi; quindi, lungo una via di degradazione può partire in parallelo una via di condensazione, cioè di formazione di molecole complesse.

Ciò accade quando vengono ingeriti più carboidrati di quanti siano necessari.

Infatti, i carboidrati sono molecole a pronto utilizzo, non vengono conservati (idrofilo, facilmente idratabili, occuperebbero molto spazio), salvo le molecole che formano il glicogeno. ~~Lo scopo è quello di formare ATP, ma se ingeriamo più carboidrati di quanti servano per formare l'ATP, la cellula comincia a degradare il glucosio e quando si accorge dell'eccesso, lo trasforma in grassi.~~



Lezione 17 (27/03/01)

Dicevamo che l'energia si ricava oltre che dai polisaccaridi, dei quali abbiamo visto sia l'anabolismo che il catabolismo, anche dalle proteine e dai lipidi. Tutte e tre queste macromolecole biologiche hanno diverse vie di degradazione (dei polisaccaridi ne abbiamo vista una sola) una delle quali porta alla formazione di **acetilCoA** che poi viene immesso nel ciclo di Krebs. Quindi, il ciclo di Krebs, seguito dalla fosforilazione ossidativa è una via che può essere comune alle tre macromolecole. Ovviamente cambiano i prodotti di "scarto" quando parliamo di polisaccaridi e lipidi avremo essenzialmente CO_2 e H_2O mentre per le proteine avremo NH_3 . Un importante momento di conversione di una molecola in un'altra avviene durante la glicolisi quando la **gliceraldeide** può essere convertita in **glicerolo** e quindi essere trasformata in grassi. Ricordiamo infine che le cellule che effettuano fotosintesi o comunque le c. autotrofe, effettuano anche degradazione del glucosio; ciò vuol dire che una cellula autotrofa fotosintetica eucariote, come i protisti o le piante, avrà sia i cloroplasti che serviranno per la costruzione del glucosio, sia i mitocondri che serviranno per la sua degradazione. Inoltre, tutto ciò che negli eucarioti avviene nei mitocondri, nei procarioti avviene a livello della membrana plasmatica; quindi la capacità di effettuare respirazione non dipenderà dalla presenza dei mitocondri ma dal fatto che l'organismo sia aerobio.

Riproduzione cellulare

In un organismo pluricellulare è particolarmente importante ed ha come scopo due momenti essenziali:

- un primo momento è quello dell'**accrescimento** dell'organismo;
- un secondo momento (anche contemporaneo) è quello del **mantenimento**.

Accrescimento: un organismo pluricellulare che quasi sempre si riproduce per via sessuata cioè attraverso l'unione (fecondazione) di due cellule, in realtà parte come unica singola cellula (lo zigote) che poi deve formare un organismo pluricellulare. Perciò c'è un momento iniziale di grande accrescimento, cioè di rapidissima **uplicazione** cellulare in modo tale da aumentare il numero delle c. (da una si passa ad alcuni miliardi). Da un certo momento in poi, per un certo periodo **insieme** (l'organismo adulto non si accresce più) e poi da solo, va garantito il mantenimento del numero delle cellule, specialmente per alcuni tessuti (istologia). Le cellule in generale invecchiano, vanno incontro a senescenza e quindi muoiono, dovendo essere rimpiazzate:

Una c. quindi si moltiplica in modo tale da assicurare che ci sia sempre un numero costante di cellule che non diminuisca nel tempo. Questo è vero per alcuni tessuti, non per tutti perché come vedremo non tutte le c. si riproducono nel tempo; alcuni tessuti, invece, non vanno in contro a riproduzione e quindi la senescenza delle cellule e la loro morte porta ad una drastica diminuzione del numero delle cellule. Le cellule che non si riproducono sono dette c. "perenni" che non significa che non vadano incontro a morte ma si riferisce al fatto che non si riproducono.

Fino a qualche mese fa avremmo detto con molta sicurezza che le cellule nervose, i neuroni, sono di questo tipo: oggi siamo più cauti perché circa sei mesi fa è stato dimostrato che anche "in vivo" almeno alcune zone che contengono c. nervose, possono andare incontro a riproduzione.

Tuttavia, alcune cellule cerebrali possono essere ancora considerate a non pieno ritmo riproduttivo.

Ci sono poi alcune c. negli organismi pluricellulari che sono dette "stabili" cioè si riproducono solo in determinate occasioni: possono entrare nel ciclo riproduttivo se c'è n'è necessità.

L'esempio più evidente da fornire è quello dei **linfociti** che sono cellule quiescenti non proliferanti che si moltiplicano soltanto quando è in atto un'infezione cioè quando l'organismo ne ha bisogno.

Potremmo portare anche l'esempio degli **epatociti** che sono solitamente non proliferanti ma possono proliferare, anche se in quantità modesta, se vi è un trauma (anche chirurgico).

Ci sono cellule dette **staminali** che si riproducono all'inizio, quando l'organismo deve aumentare il numero delle c. (sono c. non ancora differenziate, specializzate), oppure c. dette **proliferanti** perché pur essendo specializzate, come le c. epiteliali, vanno incontro ad un'attiva riproduzione al fine di rimpiazzare le c. che muoiono. Tuttavia, anche tra le c. proliferanti non tutte si comportano allo stesso modo perché non lo fanno con lo stesso ritmo: ci sono c. che proliferano più o meno rapidamente e cellule che proliferano in maniera più lenta e questa differenza è dettata in maniera molto precisa in quanto le c. sono coinvolte in quello che viene chiamato **ciclo cellulare**.

Il ciclo cellulare ci dà l'idea di quanto **rapidamente** una c. si riproduca o meno. Quindi, anche tra c. proliferanti esiste una differenza di tempo, di velocità, cosicché nessun tipo cellulare è uguale all'altro. C'è da dire che in molti tessuti anche umani è stata vista "in vitro" la velocità di riproduzione e il ciclo cellulare ma a questo proposito c'è da dire che la determinazione non è facile perché molte c. in cultura si sdifferenziano cioè perdono la loro specializzazione e anche quando ciò non accade è abbastanza difficile immaginare che "in vivo" accada tutto esattamente come "in vitro", dove per poter mantenere le cellule in cultura, per poterle mantenere differenziate si è obbligati ad aggiungere alcuni fattori di crescita e quindi alcuni fattori stimolanti e perciò in qualche modo il ciclo naturale viene variato. Tuttavia, lo studio del ciclo cellulare ci permette di avere un'idea di quello che accade "in vivo".

Ciclo cellulare

È guidato da fattori proteici e quindi è determinato geneticamente. Uno sbaglio nel controllo del ciclo cellulare può portare a gravi problemi, non ultimo il cancro; sembrerebbe proprio che questo sia dovuto ad un'incapacità delle c. ad avere un ciclo cellulare ben controllato e che risponda a determinati dictat che devono essere rispettati. Vediamo che cosa si intende per ciclo cellulare.

In genere viene diviso in vari momenti che hanno una lunghezza (durata) ed uno scopo diversi.

Delle c. **perenni**, che solitamente hanno una marcata **specializzazione**, si usa dire che stazionano in fase **G₂**, G sta per "Gap", termine inglese che vuol dire "intervallo". Il termine **G₂** sta ad indicare un intervallo infinito cioè una **quiescenza infinita**.

Per quanto riguarda invece le cellule "**stabili**" che hanno una moderata differenziazione anche se si parla sempre di organismi pluricellulari e quindi con c. differenziate, si usa dire che stazionano in fase **G₀** dove lo 0 vuole indicare un minuto prima della fase **G₁** che è quella in cui si trovano le c. proliferanti. Ciò significa che dietro opportuni stimoli o in seguito ad alcune necessità, le c. che si trovano in **G₀** possono **rientrare** nel ciclo cellulare e ricominciare a proliferare.

La fase **G₁**, infine, è tipica delle c. **proliferanti** o staminali, che sono le c. indifferenziate che si formano per ulteriori divisioni dello zigote, ma quando parliamo di c. dell'individuo adulto, per esempio le epiteliali, parliamo di proliferanti. Le c. di questo tipo stazionano nella fase **G₁** che è un momento di preparazione per quella che poi sarà la divisione cellulare.

Nel ciclo c'è un lungo periodo detto **interfase** che è il periodo che intercorre tra una divisione cellulare (mitosi) e la successiva: in pratica, l'interfase è tutto il periodo del ciclo meno la mitosi.

Per moltissimo tempo si è pensato che durante il periodo dell'interfase la c. fosse a riposo; che l'interfase fosse un periodo di quiescenza. Quando si è cominciato a studiare bene il ciclo cellulare

ci si è accorti al contrario che l'interfase è un periodo di grandissima attività per la c. che si prepara rapidamente alla divisione che poi seguirà.

Anche la divisione, che poi rivedremo, consta di diverse fasi: profase, metafase, anafase, telofase e citodieresi (che molti testi mettono insieme alla telofase).

La fase G₁ è quella più variabile, abbiamo detto che non tutte le c. si riproducono con lo stesso ritmo, che alcune sono più lente ed altre più veloci. La velocità o la lentezza nella riproduzione è determinata proprio dalla lunghezza della fase G₁: più lunga sarà la fase, più lento sarà il ciclo riproduttivo; più breve sarà la fase, più veloce il ciclo riproduttivo. Nelle cellule umane che hanno in media un ciclo di circa 30 ore, la fase G₁ è il periodo che occupa il maggiore spazio e può variare tra le 12 e le 24 ore. In questa fase la c. comincia a duplicare tutti i suoi organelli (lo scopo finale è quello di riprodurre una cellula, cioè ottenere 2 c. uguali da una singola c. di partenza, ma queste c. perché possano funzionare, mantenere le caratteristiche della c. di partenza devono essere uguali a questa e quindi la c. di partenza deve aumentare il numero degli organelli per poi poterli suddividere fra le due c. che si formeranno dopo la divisione). Ovviamente la massa citoplasmatica aumenta fortemente così come comincia ad ingrandirsi il nucleo. L'ingrandimento della c. è un fattore estremamente importante perché se la c. non raggiunge un certo rapporto nucleo citoplasma, una certa grandezza, non scatta la fase S. Questo è un momento in cui anche in vitro si può agire, volendo rallentare una crescita cellulare, ma c'è un momento, detto di NON ritorno in cui una proteina (proteina R) ha raggiunto tali e tanti livelli da non permettere più alla c. di tornare indietro. In pratica, quando la proteina R ha raggiunto gli ottimali livelli nella c., questa entra nella fase successiva, cioè la fase S.

Nella fase S (sintesi) avviene la duplicazione del DNA. All'interno della stessa specie questo è il periodo temporalmente più costante (nell'uomo circa 7 ore), in quanto il DNA è uguale per tutte le c. e quindi, duplicare una certa massa di DNA per le c. epiteliali per esempio è la stessa cosa che duplicarlo per le c. muscolari. Abbiamo visto che la duplicazione del DNA è un momento complesso anche da un punto di vista molecolare che vede l'intervento di moltissime proteine (enzimi), che vengono sintetizzate nella fase G₁ che oltre ad un momento di accrescimento di dimensioni, è anche un momento di attiva sintesi proteica. Nella fase S vengono però sintetizzati gli istoni, contemporaneamente alla duplicazione del DNA (gli istoni vecchi restano insieme tra loro così come quelli nuovi; copiando un termine coniato per la duplicazione del DNA è come se avessimo una sintesi di tipo conservativo). Iniziata la duplicazione del DNA la c. non torna più indietro; è un processo continuo che se inizia deve terminare. Ciò rappresenta una sorta di difesa da parte della c. perché la possibilità di interrompere la duplicazione del DNA potrebbe portare ad un errore (per esempio duplicare due volte lo stesso tratto).

La fase G₂ è invece un momento in cui c'è un'attiva sintesi proteica. È un periodo poco variabile (4-6 ore) ed anche questo si spiega facilmente perché tutte le c. in questo periodo sintetizzano più o meno lo stesso tipo di proteine cioè quelle che serviranno per la divisione cellulare (per esempio tutte le proteine del citoscheletro come la tubulina). Sono quindi proteine necessarie per la mitosi e perciò simili in tutti i tipi cellulari. Nelle fasi G₁, S, G₂, ovviamente il DNA assume diverse

Nota: Nella fase G₂ si costruisce il corioteipo

configurazioni perché tutte le volte che il DNA è impegnato deve essere poco condensato; in fase G1 c'è sintesi proteica, in S la duplicazione, in G2 sintesi proteica piuttosto ridotta e mirata.

Quindi in realtà la condensazione del DNA assume aspetti diversi a seconda che le c. siano in fase G1 (DNA despiralizzato), in fase S (ancora despiralizzato), in fase G2 (il DNA comincia a condensarsi, a spiralizzarsi, rimangono attive solo poche zone che devono essere trascritte per dare le proteine che servono per dare la mitosi). Come già accennato, nella metafase mitotica la cromatina e quindi il cromosoma raggiunge il massimo della spiralizzazione: è il momento in cui sono evidenti i due cromatidi fratelli ed il centromero.

Controllo della divisione cellulare

N.B. I punti di controllo sono ENZIMI & PROTEINE che interagiscono tra loro.

È importantissimo per consentire una duplicazione che sia ottimale. Il numero delle c. in un tessuto deve essere quello giusto, né in eccesso né in difetto:

- un primo controllo avviene per **feed-back**. Le c. si dividono se necessario e ci sono meccanismi di controllo che sono ancora in parte sconosciuti che avvisano la c. che è il momento di dividersi e quando questo tipo di informazione viene a mancare la c. è quiescente e stazionerà o in una fase G1 iniziale (molto lunga) oppure sarà in G0;
- **inibizione da contatto**. Le c. devono avere un giusto grado di dispersione: quando sono troppo fitte, si toccano tra loro e ciò favorisce la formazione di fattori inibenti la duplicazione e quindi la c. non si duplica più. Ciò significa che il ciclo è tanto più lento quanto minore è la dispersione cioè quanto più sono fitte le cellule. Le c. epiteliali anche se sono molto a contatto si riproducono fino a che non raggiungono quel contatto. Inoltre, sono presenti segnali di posizione, cioè rapporti di comunicazione tra c. e c. perché l'attività mitogena delle c. epiteliali parte da un messaggio dello strato basale; quando si è raggiunta la giusta stratificazione si blocca. L'inibizione da contatto impedisce che le c. possano mettersi una sopra all'altra, cosa che si verifica quando abbiamo c. cancerose (si parla di massa tumorale perché le c. hanno perso la capacità di disporsi nel giusto modo e continuano a dividersi addossandosi una all'altra e mettendosi una sopra all'altra in modo disordinato).

Ricordiamo che oltre a questi meccanismi di controllo esiste anche un meccanismo di morte cellulare chiamata "morte cellulare programmata" che ogni c. ha fisiologicamente.

Viene definita **apoptosi** ed è un processo molto studiato a vari livelli: una c., dopo che si è riprodotta un certo numero di volte (lei ed i suoi discendenti perché la c. che si riproduce non esiste più, da una c. ne abbiamo 2, da quelle due ne abbiamo 4, da quelle 4 ne avremo 8), con la sua discendenza va incontro a morte programmata fisiologica. È un meccanismo di protezione per evitare un numero troppo grande di duplicazioni del DNA per una serie di motivi: errore nella duplicazione, terminazione dei cromosomi (di cui non abbiamo parlato: i **telomeri** che nel tempo tendono ad accorciarsi e che assicurano una corretta duplicazione del DNA), bersagliamento negli anni da parte di una serie di sostanze che possono indurre mutazioni del DNA.

Per tutti questi motivi, una c. e le sue discendenze vanno incontro ad un numero limitato di divisioni e non vivono più di un certo periodo (dipende dal tessuto), per evitare accumuli di mutazioni o di errori nel DNA.

Si deve ancora specificare che in interfase i **centrioli** (organelli cellulari che fanno parte del citoscheletro, costituiti da microtubuli, presenti a coppie, posti in posizione ortogonale l'uno rispetto all'altro), sono tanto importanti che la fase S o per meglio dire la duplicazione del DNA, non avviene se i centrioli non si sono duplicati. Questo vuol dire che verso la fine della fase G1 la coppia di centrioli si separa e ciascun centriolo formerà l'altro, sempre in posizione ortogonale.

La duplicazione del centriolo avviene o in tarda fase G1 (verso la fine) o potremmo anche dire in una fase S iniziale, comunque prima che venga duplicato il DNA perché è stato dimostrato nel lievito, ma sembrerebbe che sia valido anche nei mammiferi, che se non c'è la duplicazione dei centrioli non può avvenire la duplicazione del DNA.

Inoltre, la duplicazione del DNA avviene per unità di duplicazioni, cioè abbiamo visto che negli eucarioti ci sono varie bolle di duplicazione per ogni molecole di DNA. Tuttavia, queste unità di replicazione, dette repliconi, si accendono in modo tale che non tutto il DNA sia decondensato contemporaneamente perché se lo fosse ci sarebbero problemi di spazio ed il rischio di una duplicazione non corretta. Ricordiamo che si duplicano prima le zone più ricche in A-T (perché essendoci 2 legami H si rompono facilmente) e poi quelle in G-C. Inoltre, la zona centromerica e pericentromerica si duplica per ultima, tanto che quella parte si chiama a "late replication" cioè a replicazione tardiva. Infine, se è vero che è importante la duplicazione dei centrioli perché cominci la fase S e che la c. raggiunga una certa dimensione prima di passare alla fase S, è anche vero che ci sono dei fattori diffusibili che fanno in modo che avvenga il passaggio tra fase G1 e fase S.

Infatti, se si mescolano insieme cellule che sono in fasi diverse, G1 ed S, le cellule in fase G1 rapidamente entrano in fase S a dimostrare la presenza di questi fattori diffusibili.

Invece, verso l'inizio della fase G2 cominciano ad essere sintetizzati dei fattori di **condensazione** per i cromosomi. Sono fattori che tenderanno a far riformare la cromatina a livello più condensato e tutto questo sembra che parta con la fosforilazione dell'istone H₁. Quindi, la fosforilazione dell'istone H1 dovrebbe essere alla base della condensazione del DNA.

Nella fase G2 vengono sintetizzati dei fattori che promuovono la mitosi. Sono detti **Mitosis Promoter Factors** -MPF- ed inducono la fosforilazione di alcune proteine quasi tutte dei microtubuli, come per esempio la laminina, la vimentina e le proteine MAP. La loro fosforilazione è alla base di molti eventi importanti che sono poi correlati con il buon esito della mitosi.

Per esempio, la fosforilazione delle proteine dette **laminine** è coinvolta nel dissolvimento della **membrana nucleare** che è importante perché avvenga una corretta mitosi; la **vimentina** è coinvolta con la **condensazione** della cromatina, le proteine **MAP** sono coinvolte nell'assemblaggio dei **microtubuli** che è poi importante per la formazione del fuso mitotico e per la separazione dei cromosomi.

Tutti questi passaggi sono strettamente guidati da fattori proteici, da enzimi che ovviamente dipendono dal DNA. Quindi, qualsiasi errore ci possa essere nel DNA e in queste proteine porta ad un disturbo del ciclo cellulare che può essere estremamente grave. Pertanto, il ciclo cellulare è strettamente sotto controllo genetico e ciò ci fa capire quanto questo sia importante.

Sottolineiamo ancora che si è più volte nominata la sintesi proteica: nella fase G1 per preparare la duplicazione del DNA, nella fase G2 per prepararsi alla mitosi; **non si deve associare la sintesi proteica esclusivamente con il ciclo cellulare.** La sintesi proteica è un processo che avviene totalmente separatamente dalla duplicazione del DNA, non dipende dalla sua duplicazione se non nella misura in cui ci sono proteine che servono per la duplicazione del DNA.

Avendo adesso parlato di ciclo cellulare, ora possiamo dire meglio che la duplicazione del DNA avviene solo per alcune cellule e in una **fase ben precisa** del ciclo vitale di quella cellula; se dovesse avvenire casualmente ci sarebbero gravi disturbi nel normale accrescimento tessutale.

Al contrario, **la sintesi proteica è un processo che avviene indipendentemente dalla duplicazione del DNA ed avviene in qualunque momento** serve quella proteina.

Anche la sintesi delle proteine è regolata ma lo è sulla base di quello che serve (messaggi che arrivano al DNA per indurre la trascrizione).

Ciò vuol dire che anche **le c. non proliferanti** avranno sintesi proteica, non sintetizzeranno la DNA² polimerasi perché non serve ma avranno una loro sintesi proteica. La sintesi proteica è tanto più ristretta quanto più una c. è specializzata perché ciascuna c. sintetizza solo le proteine che servono per la sua funzione, al di là di un numero di proteine base (per esempio quelle che servono per la glicolisi). Una c. epiteliale ed una muscolare, faranno entrambi tutte le proteine necessarie per la mitosi perché sono c. proliferanti però poi la c. muscolare farà proteine specifiche per la sua funzione così come quella epiteliale. **Concludiamo con il ricordare che, se pur più o meno despiralizzato, un singolo cromosoma equivale ad una molecola di DNA per cui nelle c. umane dove ci sono 46 cromosomi avremo 46 molecole di DNA.** La drosophila che ne ha 8, avrà nelle sue c. 8 molecole di DNA, la zanzara che ne ha 6 ne avrà 6 e così via. **Quindi una molecola di DNA equivale ad un cromosoma.** Questo vale anche per gli organismi aploidi. Ad un certo punto e non in tutte le c., la molecola di DNA va incontro alla duplicazione per cui per le c. proliferanti ci sarà un momento in cui ciascun cromosoma è costituito momentaneamente (legato ad un momento funzionale), da due molecole di DNA. Ciò accade dopo la duplicazione quando le due molecole di DNA sono ancora tenute assieme dal **centromero** (parliamo allora di cromatidi fratelli).

Se abbiamo un'unica molecola di DNA per ciascun cromosoma saremo in G1, se avremo due molecole di DNA per ciascun cromosoma saremo in G2. Questo vale per tutti gli organismi, sia aploidi sia diploidi purché le c. siano in proliferazione. Per esempio i linfociti che sono in fase G0 e quindi quiescente (salvo infezione) avranno per ogni cromosoma una singola molecola di DNA.

Gli organismi che hanno coppie di cromosomi, uguali per forma e per funzione ma non per sequenza di DNA, sono detti **diploidi**, altrimenti parleremo di organismi **aploidi**. L'essere aploide o diploide è uno status dell'individuo (ci si nasce). **L'aver cromatidi fratelli invece è legato ad uno stato funzionale, cioè ci sono momenti in cui alcune c. di quell'organismo avranno cromatidi fratelli e momenti in cui non li avranno.**

Sia una c. aploide sia una c. diploide possono avere una singola molecola di DNA o due molecole e quindi cromatidi fratelli secondo il momento in cui si trovano.

Lezione 18 (28/03/01)

MITOSI

È un processo che porta alla duplicazione delle cellule (di fatto è un processo di divisione); negli organismi pluricellulari riguarda le c. della **linea somatica**, cioè quelle che costituiscono il "soma", il corpo. La mitosi riguarda anche la moltiplicazione delle c. della **linea germinale** quando sono ancora **indifferenziate** cioè prima che comincino il processo di maturazione che porterà alla formazione dei gameti. Ovviamente le due c. che derivano dalla divisione devono essere identiche fra loro e alla c. di partenza; la mitosi è un processo che garantisce l'identità cellulare, essendo un processo moltiplicativo che serve per rimpiazzare cellule morte o invecchiate. Le cellule devono essere identiche come materiale genetico e di conseguenza come prodotti che poi verranno costruiti da quella cellula.

La mitosi viene suddivisa a livello didattico in varie fasi anche se bisogna tenere conto che è un processo continuativo e che ogni fase si continua con quella successiva; quindi la terminologia (profase tardiva, metafase precoce) risente del fatto che, al di là di poche figure che si vedono al microscopio e sono tipiche di una certa fase, i vari momenti scivolano uno nell'altro.

Ecco perché nei testi si trova qualche piccola differenza, anche se ci sono alcune figure che sono tipiche di una determinata fase e che messe in evidenza ci permettono di dire **senza dubbio** che quella c. si trova in un determinato momento.

Profase

È il primo momento con il quale cominciano alcune trasformazioni che riguardano sia il nucleo sia il citoplasma:

- inizialmente il nucleo appare ancora piuttosto omogeneo; ciò significa che non si riescono ancora a distinguere in maniera perfetta i cromosomi e soprattutto i centromeri. La cromatina è ancora parzialmente dispersa: la sua condensazione è cominciata in fase G2 ma sarà completa in metafase. **Col procedere della profase i cromosomi, o per meglio dire i cromatidi fratelli, si ispessiscono e quindi comincia ad essere visibile il centromero in maniera molto netta ed i cromosomi appaiono bisettati** (costituiti da due molecole di DNA). Questo è un qualcosa di **preesistente alla profase** cioè già dalla fine della fase S i cromosomi sono costituiti da due **cromatidi fratelli**; tuttavia, **cominciano ad essere visibili al m. o. verso metà, fine profase**;
- **si osserva un movimento centrifugo dei cromosomi che cominciano a portarsi verso la membrana nucleare** nella cui parte interna è presente la lamina proteica che ancora i cromosomi al momento della divisione cellulare (la fosforilazione delle proteine della lamina porta all'innesco della mitosi);
- **scompare il nucleolo**, la zona che si organizza per sintetizzare i ribosomi. È costituito dal DNA che porta l'informazione per l'RNA ribosomiale; **il motivo per cui il nucleolo scompare è di tipo funzionale e strutturale**; i ribosomi non servono in questo periodo perché durante la divisione cellulare la sintesi proteica è azzerata e quindi non c'è bisogno che la c. costruisca ribosomi.

Inoltre, se i cromosomi si allontanano dal centro del nucleo per portarsi verso la m. nucleare, si separano tra loro e quindi questo "bouquet" di tratti di DNA non è più possibile formarlo; verso la fine della profase scompare la m. nucleare che viene assorbita dal RER. La membrana scompare perché durante la divisione cellulare c'è bisogno che materiale nucleare e citoplasma non siano separati. Infatti, in questo momento comincia l'inizio della formazione del fuso mitotico che è una struttura basilare per il buon fine della mitosi. Se per qualche motivo il fuso mitotico non si forma o non funziona bene o ci sono problemi di aggancio con i cromosomi, la divisione cellulare non sarà corretta.

Fuso mitotico

È una struttura che viene direttamente o indirettamente organizzata dai centrioli (la discussione è ancora aperta anche se non ci interessa entrare nel merito). Dopo il ciclo cellulare la cellula ha due coppie di centrioli che ad un certo punto della profase si separano ed inizia a formarsi il fuso mitotico (polo della cellula: parte nella quale è migrata una coppia di centrioli).

Questo è una struttura che rientra nel **citoscheletro** (non lo troviamo nelle c. procarioti, che non hanno un ciclo cellulare come quello descritto né una mitosi come quella che stiamo descrivendo).

Le c. procarioti si dividono per scissione che consiste nella duplicazione del DNA e nella divisione della c. (in ogni cellula che si viene a formare va una molecola di DNA).

Il fuso è costituito da **microtubuli** che sono delle fibre di tubulina α e β , una proteina con struttura quaternaria (un dimero); il microtubulo si forma dall'alternarsi di tubulina α e β che forma un cilindro cavo. Il primo momento di formazione del fuso è costituito dalla **migrazione dei centrioli ai poli della cellula**. Quindi partono le fibre del fuso costituite da microtubuli che partono da una coppia di centrioli, una parte di queste si aggancia direttamente sui cromosomi, un'altra parte va verso l'altra coppia di centrioli, senza raggiungerla mai.

Verso la fine della profase e l'inizio della metafase questa struttura si allunga fino ad occupare tutta la cellula. Il fuso è necessario per organizzare e mantenere fermi i cromosomi in un certo assetto e per poi organizzare la loro divisione. Perciò, la membrana nucleare costituirebbe una barriera che impedirebbe il contatto dei cromosomi con le fibre del fuso (denominato così per similitudine con il fuso che serviva per filare la lana). Le fibre del fuso sono di due tipi, non da un punto di vista chimico ma piuttosto funzionale; alcune di queste fibre partono dai centrioli ed hanno termine sul **centromero** di ciascun cromosoma, in particolare su una placca proteica che protegge il centromero. Questa placca è il **cinetocore** ed è proprio qui che si agganciano le fibre del fuso, dette "cromosomiche". Queste fibre saranno importantissime per la divisione dei cromatidi fratelli.

Un altro tipo di fibre, invece, parte dal polo della cellula e va verso l'altro polo; queste fibre vengono chiamate "polari" e si incontrano più o meno a metà della cellula. Su alcuni testi queste fibre sono denominate "continue", termine che può far confusione in quanto circa a metà del fuso si interrompono. Ciò che è stato descritto finora ha inizio in profase ma diviene particolarmente evidente in metafase. Quindi, il cambiamento maggiore che avviene nel citoplasma in profase è proprio quello di vedere l'inizio della formazione del fuso mitotico.

Metafase

La figura più importante è quella che vede i cromosomi portarsi al centro del fuso mitotico, in una formazione detta "piastra metafasica" o equatoriale. La caratteristica di questa figura è che si è formato perfettamente il fuso mitotico che ormai i centrioli sono decisamente ai poli opposti della c., ma soprattutto i cromosomi sono al centro del fuso mitotico, nella parte più larga del fuso indicata come equatore. I cromosomi si dispongono in piastra equatoriale (o all'equatore, o in piastra metafasica), allineati uno di seguito all'altro longitudinalmente e saranno mantenuti in questa posizione dalle fibre cromosomiche che partono dai poli e si agganciano al cinetocore.

La disposizione dei cromosomi è longitudinale perché per avere nelle due c. che si formano lo stesso patrimonio genetico, è necessario mandare un cromatidio da una parte e uno dall'altra. Perciò lo scopo è quello di separare in un certo momento i due cromatidi fratelli e l'unico modo per separarli in maniera corretta è quello di disporli longitudinalmente.

Anafase

Si verifica la separazione dei cromatidi fratelli. Il centromero che manteneva uniti i due cromatidi fratelli si è duplicato e si separa e quindi i due cromatidi fratelli sono liberi di separarsi e di migrare da una parte e dall'altra; si parla di "segregazione" dei cromatidi fratelli.

Telofase

Fase finale nella quale i cromatidi fratelli che si sono separati migrano ai poli opposti, intorno a ciascuna porzione di cromosomi si riforma la membrana nucleare (per un brevissimo periodo di tempo avremo una c. con due nuclei), subito dopo avviene la separazione del materiale citoplasmatico. Si forma una strozzatura centripeta (dall'esterno all'interno) nella formazione della quale sono coinvolte le fibre di actina (quindi ancora il citoscheletro), il citoplasma si separa e la membrana plasmatica si invagina verso l'interno fino alla congiunzione con la separazione delle due cellule. Alcuni testi mettono la suddivisione del materiale citoplasmatico e la separazione della c. in una fase che chiamano "citodieresi" (divisione della c.).

Riassumendo, evidenziamo quello che è importante ricordare delle varie fasi.

Metafase: le fibre del fuso sono di due tipi, un tipo che parte dal polo ed ha termine sul centromero (cinetocore) ed un tipo che parte dal polo e va verso l'altro polo; i cromosomi sono allineati longitudinalmente, cioè sono uno di seguito all'altro.

Anafase: i cromatidi fratelli si separano (segregazione). In questo processo entrano in gioco i due tipi di fibre del fuso che vanno incontro ad un diverso comportamento che però converge in uno stesso risultato:

- le fibre "polari", che non entrano mai in rapporto con i cromosomi, tendono ad allungarsi aggiungendo dimeri di tubulina;
- le fibre "cromosomiche" perdono dimeri di tubulina e quindi vanno incontro ad un accorciamento.

Questi due processi, che sembrano uno il contrario dell'altro, in effetti portano allo stesso risultato in quanto le fibre cromosomiche che si accorciano tirano con se la molecola di DNA che è legata a quella fibra e di conseguenza i due cromatidi fratelli si staccano. Contemporaneamente le fibre

"polari" si allungano, velocizzando questo meccanismo di separazione in quanto la cellula si allunga ed i due poli si allontanano con allontanamento più rapido dei due cromatidi fratelli.

Questo movimento costa alla cellula energia in termini di una trentina di molecole di ATP per ogni cromosoma. Il tutto avviene in maniera meccanica e perciò si comprende bene che se il fuso mitotico non è ben formato, se i cromosomi non sono ben agganciati ad esso, la mitosi può non svolgersi regolarmente perché per esempio cromosomi non ben agganciati vengono persi, verso la fine del corso vedremo che ci sono delle mutazioni molto importanti per cui ci può essere la formazione di cromosomi acentrici (privi di centromero) che vengono persi proprio perché non c'è l'attacco alle fibre del fuso e quindi ovviamente non ci può essere una corretta separazione.

Perciò, in anafase mitotica si segregano i cromatidi fratelli (lo scopo è quello di mandare in ciascuna cellula una molecola di DNA che sia identica a quella dell'altra cellula come lo sono i cromatidi fratelli, salvo errori durante la duplicazione).

Sui centrioli esiste una diatriba ancora aperta perché fanno parte di una struttura che si chiama "aster", un centrosoma che poi forma l'aster, cioè delle piccole fibre che si dipartono intorno alla coppia di centrioli e formano una specie di stella. Sembra che i centrioli servano solo per organizzare l'aster; di fatto per molto tempo si è pensato che le fibre dell'aster, che sono fatte anch'esse di tubulina, fossero proprio il punto di partenza delle fibre del fuso. Su questo però c'è ancora molta discussione, in quanto alcuni Ricercatori dicono che non c'è continuità tra le fibre dell'aster e le fibre del fuso, altri dicono che essendo della stessa qualità non c'è motivo di pensare che non siano continue e che di conseguenza bisognerebbe spiegarsi il perché dell'aster.

Quello che è certo è che nelle c. animali i centrioli sono necessari per organizzare l'aster e senza l'aster non si organizza il fuso. (Cio non avviene nelle c. vegetali dove però si forma una sorta di aster, pur non essendoci centrioli, si organizza un nucleo di fibre da cui poi sembrano partire le fibre del fuso.)

*c molecole di DNA e di proteine (crom. omologhi)
n cromosomi*

Ribadiamo alcuni concetti importanti (vedi appunti per disegni), partendo da una cellula diploide perché ci sono cromosomi omologhi. Se è diploide possiamo dire che è una cellula $2n$ con 4 cromosomi; quindi $2n=4$ sta a significare che quella c. ha 4 cromosomi uguali due a due.

Introduciamo ora il concetto che non è quello della ploidia ma è quello della quantità di DNA, cioè quante molecole di DNA si hanno. In questo caso si ha $2n=4$ e $2c=4$, cioè allo stato diploide della situazione si hanno 4 molecole di DNA. Durante la fase S del ciclo cellulare si ha la sintesi del DNA. Successivamente, se si valuta la ploidia, la cellula è sempre diploide con 4 cromosomi (se deve intendere il numero dei centromeri), quindi ancora $2n=4$, ma $2c=8$ perché le molecole di DNA sono raddoppiate quindi per ogni cromosoma si hanno due molecole.

Questa è la prova evidente che c'è stata duplicazione del DNA e che pur rimanendo costante il numero dei cromosomi, sono aumentate le molecole di DNA perché ogni cromosoma adesso ne ha due. Su alcuni testi si trova che viene raddoppiato il numero dei cromosomi, cioè si parla per quanto riguarda le c. umane di 92 cromosomi. Questo numero di cromosomi (92) c'è solo dopo l'anafase quando i cromatidi fratelli si sono separati, prima di allora, nelle c. umane si hanno 46 cromosomi, 92 molecole di DNA, ma 46 cromosomi.

Ricordiamo che in metafase i cromosomi si allineano e questo termine è importante da sapere perché rende idea del fatto che i cromosomi siano uno di seguito all'altro, disposti in modo longitudinale. In questa fase abbiamo $2n=4$ e $2c=8$.

In anafase i cromatidi fratelli si sono separati e questo è l'unico momento in cui saremmo autorizzati a dire che il numero dei cromosomi è raddoppiato perché ormai i cromatidi fratelli si sono separati e quindi ciascuna molecola di DNA è diventata un cromosoma autonomo.

Però, è raddoppiata anche la ploidia perché ora non abbiamo più una c. diploide ma teoricamente tetraploide e quindi di fatto il numero di cromosomi non aumenta mai rispetto alla ploidia cioè da $2n=4$ si passa a $4n=8$ perché di ogni cromosoma si hanno 4 copie. Quindi rispetto alla diploidia i cromosomi rimangono sempre dello stesso numero.

La segregazione dei cromatidi fratelli va avanti, si riformano le membrane nucleari e quindi in ciascun nucleo torna la situazione di partenza con $2n=4$ e $2c=4$.

Quanto detto vale anche per una c. aploide purché eucariote, quando i cromosomi saranno allineati in piastra metafasica si avranno cromosomi singoli, non omologhi (ricordiamo che ci sono organismi viventi che sono costituiti da c. aploidi, quindi se vanno incontro a mitosi il meccanismo sarà identico con l'unica differenza che non ci saranno i cromosomi omologhi).

Il prossimo processo di cui parliamo è la meiosi che è una duplicazione cellulare particolare che non dà luogo alla formazione di c. uguali fra loro ma dà luogo alla formazione di c. aploidi. In generale, la definizione di meiosi è quella di un processo che rende aploidi cellule diploidi; che questo processo venga utilizzato durante la formazione dei gameti, è qualcosa in più che avviene in alcuni organismi e non avviene in altri. Sempre in linea generale possiamo dire che la meiosi avviene negli organismi a riproduzione sessuata. Quindi, le condizioni perché si possa avere un processo meiotico sono due:

- 1) che sia un organismo a riproduzione sessuata
- 2) che si parta da una c. diploide e si arrivi ad una c. aploide.

Abbiamo già spiegato il fatto che la riproduzione sessuata prevede l'unione di due cellule, che per l'uomo sono due gameti. In realtà per molti organismi sono due c. che molto spesso possono essere chiamate anche (+) e (-). L'importante è che si fondano per formare un nuovo individuo.

Diamo per scontato che ogni specie ha il proprio numero di cromosomi, cioè la quantità di DNA di un genoma è specie specifica e deve mantenersi costante nelle generazioni (un genitore con 8 cromosomi non può dare un figlio con 16). Nella fecondazione di un organismo diploide, si raddoppierebbe il numero di cromosomi da $2n$ a $4n$ e questo non è possibile. Quindi nei diploidi prima della fecondazione deve avvenire una riduzione del numero dei cromosomi attraverso il processo della meiosi e quindi nella successiva fecondazione darà n da un genitore ed n da un altro, ricostituendo $2n$. Perciò, nei diploidi la fecondazione è preceduta da una meiosi "gametica". Negli organismi aploidi che si riproducono sessualmente, lo zigote è $2n$ e quindi si avrà una meiosi successiva alla fecondazione, detta "zigotica", in cui lo zigote $2n$ torna ad essere n con degli individui aploidi.

Lezione 19 (29/03/01)

Meiosi

Lo scopo di questo processo di divisione e moltiplicazione cellulare è quello di rendere aploide una cellula che in partenza è diploide. È un processo che ha a che vedere con la riproduzione sessuata, il che non vuol dire che sia direttamente e soltanto correlato alla produzione di gameti.

Riguarda la riproduzione sessuata perché abbiamo visto che tutte le volte che c'è una fecondazione, c'è bisogno di "aggiustare" il numero di cromosomi della specie. In pratica in una specie diploide, se prima della fecondazione non ci fosse una riduzione del numero dei cromosomi, dopo la fecondazione avremo un loro raddoppio e quindi prima della fecondazione deve avvenire la meiosi che riduce il numero dei cromosomi. D'altra parte, tutte le volte che c'è fecondazione in specie aploide, dopo la fecondazione il numero dei cromosomi viene ancora una volta a raddoppiare e quindi ci troviamo di fronte ad uno zigote che è diploide. Quindi anche in questo caso deve intervenire un meccanismo di riduzione cromosomica attraverso la meiosi.

Nel caso dei diplobionti (vivente diploide) la meiosi è gametica perché interviene nel processo di formazione dei gameti (non è la meiosi a dare i gameti perché per esempio nella gametogenesi maschile il processo continua oltre la meiosi), mentre per gli aplobionti la meiosi è zigotica (avviene a carico dello zigote).

Processo cellulare

Vediamo quali sono i meccanismi utilizzati per rendere aploide una cellula in partenza diploide. Ricordando che lo scopo è quello di ottenere l'aploidia, una cellula è aploide quando non ha cromosomi omologhi. Ciò significa che durante la meiosi si dovranno separare i cromosomi omologhi facendo in modo che in una cellula non ci sia più la coppia di cromosomi omologhi, non ci sia più una doppia informazione, ma ce ne sia una soltanto. In pratica si deve avere una sola serie di cromosomi e una sola informazione. Va detto che la riproduzione sessuata si è affermata proprio perché garantiva una grande variabilità genetica, cioè la progenie non è mai identica ai genitori ed i figli non sono mai identici fra loro. Questa grande variabilità genetica è assicurata da due momenti ben precisi e basilari del processo meiotico:

- il **crossing-over**, detto anche scambio genetico;
- l'**assortimento casuale** dei cromosomi in metafase.

Questo significa che, al contrario di quanto ci si aspetta dalla mitosi, cioè la formazione di due cellule identiche fra loro ed alla cellula di partenza, in questo caso si hanno cellule diverse dalla cellula di partenza, non solo e non tanto per il numero di cromosomi ma, come vedremo, per l'informazione che portano. Ricordiamo che quando parliamo di riduzione del numero dei cromosomi, pur essendo vero che la meiosi porta a questo, deve essere sottolineato che è importante la separazione dei cromosomi omologhi (far diventare una cellula aploide non vuol dire passare da 4 cromosomi a 2 ma soprattutto passare da 4 cromosomi a 2 che non devono essere omologhi fra loro). Quindi non è corretto dire né che la meiosi porta alla formazione dei gameti né che porta al dimezzamento dei cromosomi, in quanto la riduzione potrebbe essere effettuata a caso mentre nella meiosi si effettua la segregazione dei cromosomi omologhi.

Quindi, non fissiamo la nostra attenzione sul numero dei cromosomi ma vediamo la qualità dei cromosomi.

La meiosi è molto simile alla mitosi per esempio per quanto riguarda la suddivisione in fasi e per quanto riguarda il meccanismo di separazione dei cromosomi (l'apparato del fuso).

Ci sono però alcune differenze fondamentali che ora illustreremo.

Partiamo dalla solita cellula (vedi appunti con disegni) con corredo $2n = 4$, $2c = 4$ (dove $2n$ è il numero di cromosomi diploidi, $2c$ le molecole di DNA diploide); siamo in fase G1 perché il DNA non è duplicato. Si passa alla fase S, si ha la duplicazione ed il numero di cromosomi rimane costante perché per numero di cromosomi intendiamo il numero dei centromeri e sono sempre 4, ma la quantità di DNA è duplicata: se prima avevamo 4 molecole adesso ne abbiamo 8.

Questa cellula entra in meiosi.

La prima tappa è la profase che è molto più lunga di quella mitotica e nella quale si possono identificare le seguenti fasi:

- **leptotene** (significa filamento sottile). La cromatina è ancora abbastanza despiralizzata cioè abbastanza decondensata;
- **zigotene** (significa filamenti appaiati). È una fase importante da ricordare: in questo momento della profase meiotica i cromosomi omologhi si appaiano cioè si mettono uno accanto all'altro (in linea longitudinale). L'appaiamento è molto preciso, perfetto; parte dal centromero (i due centromeri sono in contatto) e via via continua verso le estremità. L'appaiamento dei cromosomi omologhi è mediato da un complesso sinaptonemiale, complesso proteico che fa da supporto al cromosoma e quindi consente un appaiamento corretto. L'appaiamento viene anche definito **sinapsi** proprio perché è un contatto molto stretto;
- **pachitene** (significa filamento spesso: la cromatina si sta condensando). In questa fase avviene il **crossing-over** cioè il meccanismo che consente lo scambio genetico. In pratica, cromosomi omologhi ma diversi possono scambiarsi tratti di cromosoma (vedi appunti per disegni). Lo scambio avviene in quanto si verifica una rottura su entrambi i cromosomi (a livello di ciascun cromatidio) e poi avviene una ricongiunzione che è per così dire "sbagliata" perché ciascun filamento si riunisce con quello allineato vicino (si formano i cosiddetti **chiasmi**, cioè delle croci dovute alla rottura ed al ricongiungimento). Il risultato sarà un cromatidio che non ha subito crossing-over, detto "non crossoverato", mentre l'altro cromatidio manterrà una parte propria ed una parte che apparteneva all'altro cromosoma omologo.

▶ **Cromatidi interessati sono tutti e quattro**: una delle prime cose dimostrate è che il crossing-over avviene a livello di tutti e i 4 filamenti (può avvenire tra il 1° ed il 4°, tra il 2° ed il 3° e così via) che possono più volte scambiarsi dei pezzi, cioè si può avere un crossing-over singolo, doppio, triplo, ecc. ed alla fine si possono avere dei cromosomi che non hanno più nulla a che vedere con quelli di partenza, che sono ormai un miscuglio di caratteristiche. Sembra addirittura che lo scambio possa avvenire tra cromatidi fratelli anche se nella progenie non si evidenzia in quanto sono uguali; tuttavia per molto tempo ci si è chiesti perché lo scambio, che è qualcosa di meccanico (rottura e scambio), non debba avvenire anche tra cromatidi fratelli.

Per dimostrarlo sono stati condotti degli esperimenti nei quali, attraverso la **marcatura**, si sono potuti distinguere i due **cromatidi fratelli**. Ciò è ottenibile con l'uso della **timidina triziata** (marcata con il trizio) 5-bromodeossi uridina, ma siccome queste sostanze, analoghe delle basi, che vengono incorporate dal DNA, sono anche dei **mutageni** (cioè inducono rotture), la discussione rimane aperta in quanto alcuni Ricercatori sostengono che avvenga, come dimostrato dalla marcatura, mentre altri sostengono che la rottura sia indotta dalle sostanze usate e che non si può sapere se in natura accade davvero.

In realtà la discussione è inutile perché sicuramente le sostanze inducono una maggiore quantità di **SCE** (Sister Chromatid Exchange = scambi tra cromatidi fratelli), ma non c'è motivo di pensare che in natura, anche se in quantità bassissima, possa accadere qualcosa del genere.

Comunque, tutti e 4 i filamenti possono scambiare tratti di materiale genetico anche più volte nel corso di una stessa meiosi; lo scambio è continuo e frequentissimo a tal punto che non sempre porta a dei cambi in quanto alla fine si ripropone la situazione di partenza.

È importante che i cromatidi si scambino tratti identici dello stesso gene con identica funzione perché l'individuo non porti perdite; se invece il crossing-over è **anomalo o disomogeneo**, perché magari c'è stato un appaiamento sbagliato, porta a risultati che possono addirittura essere la perdita di un pezzo di DNA. Il crossing-over è un processo che ha una durata dell'ordine di minuti (per questo la profase è molto lunga) e gli scambi di tratti lontani fra loro può essere anche contemporanea ma se i tratti scambiati sono vicini, l'ingombro dato dalla formazione dei chiasmi crea una certa inibizione e consente che ne avvenga uno per volta. Si deve inoltre ricordare che un cromosoma deriva dal padre ed uno dalla madre e quindi nel crossing-over si stanno **mescolando tutti i caratteri dei due genitori** (che a loro volta derivano dal mescolamento dei cromosomi dei nonni, quindi in ogni individuo ci sono **4 patrimoni genetici** ai quali facciamo risalire la variabilità); il che significa che sia negli organismi diploidi che formano gameti che negli aploidi in cui la meiosi è zigotica, gli individui o i gameti che risultano sono un miscuglio e sono uno diverso dall'altro. Per questo motivo i fratelli sono molto diversi tra loro e l'unico caso in cui c'è identità è nei gemelli monovulari (stesso uovo e stesso spermatozoo). Infine, il crossing-over è un fenomeno spontaneo, che avviene solo in quel periodo della profase;

• diplotene. È l'ultima fase della profase.

In conclusione ricordiamo che in questa lunga **profase** momenti particolarmente importanti sono lo **zigotene** dove c'è l'appaiamento dei cromosomi ed il **pachitene** che letteralmente significa filamenti ispessiti ma dove di fatto osserviamo questo scambio tra cromatidi che viene chiamato **crossing-over** e che è molto importante perché è un primo momento di **formazione di variabilità genetica** attraverso il rimescolamento dell'informazione materna con quella paterna.

Lezione 20 (03/04)

Abbiamo visto le differenze tra profase mitotica e meiotica che sono essenzialmente:

- una lunghezza molto maggiore della profase meiotica,
- l'appaiamento dei cromosomi omologhi che avviene in zigotene
- lo scambio di materiale genetico che avviene in pachitene. Questo scambio porta ad una grande variabilità genetica perché mescola il patrimonio paterno e materno per cui in ogni gamete o in ogni individuo (meiosi zigotica) avremo rappresentati i patrimoni genetici di almeno 4 persone.

Tutto ciò che non è stato ripetuto è identico a quanto avviene in mitosi (per esempio scomparsa della membrana nucleare del nucleolo, e inizio della formazione del fuso meiotico).

Metafase

Il fuso è ormai ben organizzato, i cromosomi si portano in piastra equatoriale ma la grande differenza con la mitosi è che migrano appaiati, ovvero sia l'appaiamento che era iniziato nello zigotene non termina ed i cromosomi così come si erano appaiati in profase rimangono appaiati in questa che, come per la mitosi, è la fase organizzativa per la divisione.

Non perdiamo di vista che devono separarsi cromosomi omologhi (per avere cellule aploidi) e quindi l'unico modo per fare ciò è quello di farli organizzare appaiati e in posizione longitudinale in piastra metafasica. Va detto che le disposizioni dei cromosomi possono essere diverse (vedi appunti per disegni); sono state messe delle lettere, M (materno) e P (paterno), anche se non ha più senso parlare di cromosomi paterni e materni perché con il crossing-over c'è stato un notevole rimescolamento, (i cromosomi che sono stati disegnati nella stessa maniera della G2 di fatto non sono più così in quanto sono un rimescolio, sono uno diversi dall'altro, non hanno più nulla del cromosoma di partenza). Tuttavia, i centromeri sono rimasti quelli di origine e se ne ^{può} sempre individuare uno paterno ed uno materno. La disposizione, quindi, non è sempre una, ma si osserva un altro fenomeno che porta alla variabilità genetica: l'assortimento casuale dei cromosomi in piastra metafasica. Ciò significa che le coppie di cromosomi sono ~~una~~ indipendenti una dall'altra per cui la disposizione in piastra possono essere diverse, tanto più numerose quante sono le coppie di cromosomi. Nel caso in esame avrò due possibili metafasi perché due sono le coppie di cromosomi (aumentano moltissimo all'aumentare dei cromosomi: per esempio ne avrò 4 se le coppie saranno 3 e così via. Si può immaginare per l'uomo, dove le coppie sono 23, quante possano essere le disposizioni possibili). Nel nostro caso la possibilità è quella riportata, cioè centromeri di stessa origine dalla stessa parte oppure una coppia di cromosomi ruota rispetto all'altra e quindi la disposizione viene a cambiare: se prima avevo "P" "P" dalla stessa parte, adesso si avrà un centromero "P" ed uno "M". Questa può sembrare una cosa di scarsa importanza ma in realtà vedremo alla fine che poiché nelle cellule si propongono entrambi i casi con la stessa frequenza, si avrà un ulteriore incremento di variabilità genetica perché se la disposizione fosse la prima, al momento della divisione ci si attenderebbe in una cellula i due centromeri "P" ed in una c. i due "M" (due tipi di cellule soltanto). Ma essendoci l'alternativa (e più aumentano le coppie di cromosomi più aumentano le alternative) avremo altri due tipi di gameti che porteranno rispettivamente un centromero "P" ed uno "M" ed uno "M" ed uno "P" cioè una combinazione

diversa di centromeri che rappresentano cromosomi molto diversi tra loro e combina in maniera diversa geni diversi. Questo dà luogo a 4 cellule una diversa dall'altra (senza considerare il crossing-over che tende ad aumentare ancora di più la differenza tra le c. che si sono formate). Perciò, della metafase meiotica si devono ricordare assolutamente queste due cose:

- la disposizione dei **cromosomi omologhi appaiati** (centromeri attaccati; i due cromosomi omologhi sono pressochè indistinguibili. Viene anche detto stadio delle tetradi cioè a quattro filamenti. Si distinguono pochissimo, è come se vedessimo un unico corpuscolo e si deve fuochettare lungamente al microscopio ottico per poter distinguere i 4 filamenti);
- l'**assortimento casuale** dei cromosomi in metafase.

Per quanto riguarda il fuso si osservano le stesse cose viste in mitosi, cioè due tipi diversi di microtubuli, le fibre "cromosomiche" e quelle "polari".

Anafase,

Ovviamente, vale quanto detto per il meccanismo di segregazione dei cromosomi in mitosi.

Si ha il comportamento diverso delle fibre cromosomiche che si accorciano e quelle polari che si allungano, ma la grande novità (che la metafase aveva già preparato) è che questa volta non segregano i cromatidi fratelli ma segregano i cromosomi omologhi.

Le cellule che si sono formate per quanto riguarda il numero dei centromeri si possono definire aploidi (in quanto non ci sono i cromosomi omologhi) ^{MA} in realtà la definizione di aploidia è anche quella di portare una sola informazione. Le cellule che si sono formate sono aploidi anche se hanno ancora due filamenti (una cellula aploide normale di solito ha un solo filamento, il doppio filamento c'è nel momento della duplicazione), ma la cosa importante è che in realtà i due cromatidi fratelli non sono più uguali tra loro a causa del crossing-over, perciò, i due cromatidi sono diversi, non sono il risultato della duplicazione di una singola molecola di DNA. La definizione di aploide intende che non ci siano cromosomi omologhi ma anche che ci sia una sola serie di informazioni, cioè per un certo carattere, per una certa funzione, negli organismi aploidi si ha una sola informazione cioè un solo tratto di DNA ovvero un solo gene. In questo caso per ogni cromosoma se ne hanno due perché le sequenze che si trovano sui due cromatidi sono diverse.

Quindi, formalmente e sostanzialmente non si può parlare di c. aploidi, sono c. aploidi se si conta il numero dei centromeri ovvero si è partiti da 4 cromosomi ed ora se ne hanno 2, ma se si considera l'informazione, questa è ancora un miscuglio. In più se andiamo a guardare la quantità di DNA, si è partiti da una cellula che è $2n=4$ e $2c=4$, dopo la duplicazione del DNA si ha $2n=4$ e $2c=8$, partendo da questa cellula ci si attende che una c. aploide che ne derivi abbia dimezzato il numero di cromosomi, sia $n=2$ e $c=2$. Se si guardano le cellule ottenute è vero che si ha $n=2$ ma il numero di molecole di DNA non è dimezzato rispetto alla cellula di partenza; si deve arrivare ad avere 2 molecole di DNA ed in realtà ne ho 4 che inoltre non sono uguali due a due. Perciò queste c. non si possono ancora considerare a tutti gli effetti cellule aploidi, nonostante che quella descritta finora si chiami divisione "riduzionale" proprio perché riduce il numero dei cromosomi.

Ciò fa capire che a questo punto serve un'ulteriore divisione che possa di fatto separare i cromatidi fratelli in modo tale da riequilibrare la quantità di DNA ma soprattutto separare quei

cromatidi che magari non hanno la stessa informazione e che quindi fanno sì che la cellula non possa essere considerata veramente aploide. /

Seconda divisione meiotica (equazionale)

Ha una profase estremamente rapida (a volte viene addirittura saltata) e si passa direttamente alla metafase.

2a Metafase

Apparentemente è simile ad una metafase mitotica perché ormai non ci sono più i cromosomi omologhi ed i cromosomi si presentano allineati. Tuttavia per il fatto che mancano i cromosomi omologhi non potremo mai confonderla con una mitosi di una cellula diploide (potrebbe essere una mitosi di una c aploide) ma se si premette che si parla di una specie diploide non può essere confusa con una mitosi perché mancano i cromosomi aploidi. Per il resto tutto accade come al solito, con le fibre cromosomiche che si accorciano e quelle polari che si allungano.

2a Anafase

Si ha la segregazione dei cromatidi, che possiamo chiamare ancora fratelli per abitudine, ma ricordiamo che in realtà c'è stato il crossing-over che li ha resi diversi.

A questo punto le cellule sono $n=2$ e $c=2$ e siamo veramente ad una c aploide perché abbiamo la metà dei cromosomi, la metà del DNA ed una sola informazione per ciascun tratto di DNA.

Quindi, parlando di meiosi ci riferiamo ad un processo che consta di un ciclo duplicativo del DNA e di due divisioni: la 1a e 2a divisione meiotica. Perciò per ogni fase si deve distinguere per esempio la metafase 1 dalla metafase 2, e così via.

Differenze tra le varie fasi nelle due divisioni meiotiche

Profase

La profase 2 è pressoché inesistente, molto corta rispetto alla prima che è molto lunga e soprattutto nella profase 1 c'è un appaiamento dei cromosomi omologhi che nella 2 non può esserci visto che i cromosomi omologhi si sono già separati.

Metafase

Nella 1 c'è l'appaiamento degli omologhi in piastra metafasica mentre nella 2 non si nota perché gli omologhi si sono già separati.

Anafase

Nella 1 si ha la segregazione degli omologhi, nella 2 la segregazione dei cromatidi (fratelli)

Non bisogna dimenticare l'assortimento casuale dei cromosomi, che è uno degli errori più frequenti al compito.

3. **Esercizio sulle cellule sugli appunti:** ricordare di non confondere la G1 con la diploidia. Prendiamo un cromosoma con una molecola di DNA: se questa si duplica (in fase S), si apre ed il disegno si fa a croce per indicare un cromosoma con due molecole di DNA (cromatidi fratelli).

In termini di ciclo cellulare, si parte dalla fase G1, in mezzo c'è la sintesi e dopo siamo in fase G2. Perciò la prima cosa da fare quando si ha davanti un disegno di una c con dentro i cromosomi è vedere se i singoli cromosomi sono duplicati. Laddove i cromosomi sono duplicati siamo in fase G2. Poi si esamina tutta la cellula e non ci si preoccupa più se i cromosomi sono duplicati o meno; si guardano tutti i cromosomi e si valuta se ogni cromosoma ha una propria

copia. Se c'è la copia la cellula è diploide se no la c. è aploide (mancano cromosomi omologhi). Quindi, a prescindere che ci sia stata o meno la duplicazione si può concludere se le cellule sono diploidi o aploidi. Non può capitare un cromosoma con un doppio filamento ed uno con un filamento singolo perché la fase S ha sempre termine in quanto non si può fermare. In pratica, il numero dei cromosomi ci dice veramente poco sul fatto che una c. sia aploide o diploide perché si deve vedere la qualità.

Differenze tra mitosi e meiosi

La similitudine è la duplicazione del DNA con il raddoppio dei cromatidi (ciascun cromosoma è costituito da due cromatidi fratelli).

Profase

- In mitosi avvengono le modificazioni a carico del nucleo e del citoplasma; non c'è il crossing-over
- in profase meiotica I si ha la sinapsi (appaiamento) e lo scambio di materiale genetico tra i cromosomi omologhi; c'è il crossing-over.

Metafase

- in mitosi i cromosomi si dispongono allineati uno si seguito all'altro;
- i cromosomi omologhi si dispongono appaiati; si ha l'assortimento indipendente dei cromosomi; cioè le coppie di cromosomi sono indipendenti l'uno dall'altro.

Anafase

- in mitosi si separano i cromatidi fratelli;
- in meiosi^I si separano i cromosomi omologhi.

Riassumendo, in mitosi si ha una duplicazione del DNA ed una divisione cellulare; manca il crossing-over, non c'è l'appaiamento dei cromosomi omologhi, non c'è l'assortimento casuale dei cromosomi. Le cellule che derivano dalla divisione sono identiche fra loro ed identiche alla c. di partenza.

Nella meiosi si ha una duplicazione del DNA e due divisioni cellulari; c'è il crossing-over, c'è l'appaiamento degli omologhi, c'è l'assortimento indipendente. Si hanno 4 cellule aploidi, diverse tra loro e diverse dalla c. di partenza.

Gametogenesi nella specie umana

Spermatogenesi (o spermoistogenesi)

Ha inizio con un processo che è esclusivamente moltiplicativo, cioè le cellule germinali indifferenziate, si moltiplicano per mitosi (quindi la mitosi, oltre che nelle c. somatiche si ha anche nelle cellule germinali ancora indifferenziate).

Le cellule che si moltiplicano si chiamano **spermatogoni** ("gonio" indica proprio la cellula indifferenziata, non ancora matura). In questa prima fase abbiamo una cellula diploide che si moltiplica per mitosi. Ad un certo momento, una di queste cellule comincia a differenziarsi, cioè comincia ad assumere delle caratteristiche particolari che la trasformano in **spermatocita primario**. Questa cellula è capace di entrare in **meiosi**. Avviene la prima divisione meiotica che dà origine a due cellule chiamate **spermatociti secondari**; per quello che sappiamo del processo meiotico, queste cellule sono già aploidi per numero di cromosomi ma c'è un altro aggiustamento di materiale

genetico da fare e quindi ognuna di queste due cellule entrerà in seconda divisione meiotica, alla fine della quale si avrà per ogni spermatocita (nell'uomo ci sono più spermatociti che entrano in meiosi) si avranno 4 cellule che si chiamano spermatidi, vere cellule aploidi.

A questo punto la meiosi è finita ma la spermatogenesi no: infatti gli spermatidi non sono ancora in grado di fecondare, non essendo ancora cellule mature. Gli spermatidi devono differenziarsi per specializzarsi in spermatozoi e solo a questo punto avremo dei gameti in grado di fecondare.

Le modificazioni che devono specializzare lo spermatozoo hanno come scopo finale quello di ottenere:

- una c. estremamente motile, perché la fecondazione avviene nelle tube di Fallopio (fecondazione interna) e quindi gli spermatozoi depositati in vagina devono risalire le tube all'interno;
- una c. in grado di penetrare.

Per raggiungere questi due risultati la prima modificazione è la perdita di tutto il citoplasma cellulare che costituirebbe una zavorra. Poi la c. acquisisce un flagello, detto coda, che serve per il movimento. Per il movimento serve anche energia: per questo, tutti i mitocondri si addensano in una zona chiamata "collo", compresa tra la cellula vera e propria ("testa") e la "coda".

Perciò lo spermatozoo è formato da una testa, dove c'è il nucleo, da un collo, dove ci sono i mitocondri e da una coda che serve per il movimento.

In relazione all' penetrazione, lo spermatozoo avrà bisogno di enzimi che serviranno per penetrare l'uovo. Questi enzimi si raggruppano nell'acrosoma, una specie di sacco presente in cima alla testa e che deriva dall'apparato de Golgi (il che non deve stupire se si pensa che il RER sintetizza alcune proteine che poi sono trasformate nel Golgi; alcune di queste proteine sono per esempio proprio quelle che nello spermatozoo serviranno come enzimi per la penetrazione). Perciò, quando si parla di spermatogenesi, che nell'uomo è un processo che avviene continuamente dalla pubertà alla morte, ci si riferisce ad un ciclo che dura circa 28 giorni e che parte dallo spermatogonio.

Oogenesi'

La spermatogenesi è molto più semplice rispetto all'oogenesi dei mammiferi.

Anche nella donna esistono cellule indifferenziate che si chiamano oogoni e che si moltiplicano per mitosi. Anche nella donna alcune di queste c. si differenziano in oociti primari che sono in grado di entrare in meiosi. Anche nella donna c'è una prima ed una seconda divisione meiotica che per quanto riguarda il materiale genetico dà origine a 4 cellule. Tuttavia, le 4 cellule non sono tutte uguali: infatti, fin dalla prima divisione meiotica e poi nella seconda, il materiale genetico viene ripartito equamente ma il materiale citoplasmatico viene addensato in un'unica cellula che se deriva dalla prima divisione meiotica si chiama oocita secondario, se deriva dalla seconda divisione meiotica si chiama cellula uovo. Le altre cellule sono corpuscoli polari che hanno il materiale genetico ma sono privi totalmente di citoplasma e tendono a degenerare. Il citoplasma si addensa tutto in una c. perché serve come nutrimento all'embrione nei primissimi istanti dello sviluppo, nel caso che la c. uovo venga fecondata. Prima che vengano formati tutti gli apparati della gravidanza, tra cui l'annidamento nell'utero, la placenta il cordone ombelicale e così via, l'embrione nei primissimi giorni, quando deve raggiungere l'utero e durante l'annidamento (circa una

OVULAZIONE: Completamento della
1^a divisione meiotica

settimana), trae nutrimento da questa massa di citoplasma. Quanto appena descritto è ciò che è diverso rispetto alla meiosi "classica".

Per quanto riguarda i tempi, nella donna il **processo moltiplicativo degli oogoni** avviene nella vita intrauterina come pure il **differenziamento in oocita primario** e comincia la **prima divisione meiotica** che si arresta in **diplotene**. Tutto questo avviene intorno al terzo mese di vita intrauterina del feto; quindi, una bimba alla nascita non avrà più momenti duplicativi, non avrà più mitosi per quanto riguarda gli oogoni e avrà tutti i suoi **oociti primari bloccati in profase I** (con i cromosomi appaiati). La **prima divisione meiotica** si ha dal momento della **pubertà** fino alla **menopausa** (dai 13 ai 52-53 anni) e mensilmente, con un ciclo che si chiama ovulazione, un oocita, raramente due, completano la **prima divisione meiotica** e formano degli oociti secondari.

La **seconda divisione meiotica** si completa solo ed esclusivamente dopo la **penetrazione** da parte dello spermatozoo, altrimenti l'oocita secondario viene perso e viene distrutto. → NESTADIONE

La penetrazione è il momento di avvio perché l'oocita secondario completi la **seconda divisione meiotica**, deve espellere il corpuscolo polare, dopo di che avverrà la vera fecondazione che è la fusione del nucleo maschile, portato dallo spermatozoo e del nucleo femminile che ha completato la seconda divisione meiotica.

N.B. Spermatozoni: cellule STAMINALI perché in grado di riprodursi

Oogoni: NO cellule STAMINALI perché NON in grado di riprodursi

Lezione 21 (04/04)

Domanda: è stato detto che dopo la prima divisione meiotica si devono considerare i cromosomi come aventi una doppia informazione, quindi diploidi. Però nella spermatogenesi dopo la prima divisione meiotica è stato detto che sono aploidi. Perché?

Nella maggioranza dei libri di testo si trova che sono aploidi senza ulteriori specifiche.

In effetti, se l'aploidia si riferisce al **numero dei cromosomi**, si passa da $2n$ a n . Però, oltre a guardare il numero va guardata anche la **qualità del DNA** ed abbiamo accennato che i cromosomi omologhi possono portare una **sequenza diversa di DNA**, esprimere una stessa proteina ma in maniera diversa. Inoltre la definizione di aploidia comporta che la cellula porti una **sola informazione**, una sola sequenza di cromosomi. Perciò la cellula, dopo la prima divisione meiotica, è aploide per quanto riguarda il numero dei cromosomi, ma se si esamina come sono fatti, si hanno ancora dei cromatidi che però **non sono più cromatidi fratelli** e l'informazione potrebbe essere diversa (per la proteina A si potrebbe avere una forma A ed una a, cioè essere eterozigoti).

Quindi, c'è bisogno di un'ulteriore divisione meiotica (equazionale) in modo da separare i cromatidi. Così, sia in termini di **numero dei cromosomi** sia di **quantità di DNA** sia della **qualità dell'informazione**, si avrà una c. aploide a tutti gli effetti. Tuttavia, dopo la prima divisione meiotica si ha una c. che per numero di cromosomi deve essere considerata aploide.

Concludiamo la **gametogenesi femminile** che abbiamo visto più complessa nei tempi e nei modi di quella maschile. [Il processo meiotico è sempre lo stesso in quanto prescinde dalla gametogenesi] ci può essere una variazione, come avviene nella femmina di alcuni mammiferi, quando esiste una particolare distribuzione nel tempo delle varie fasi. Perciò ricordiamo che tutti gli oociti primari, cellule differenziate dopo la moltiplicazione degli oogoni, si bloccano in **profase meiotica I** durante il 3° mese della vita intrauterina, la meiosi I si completa dalla **pubertà** in poi, fino alla **menopausa**. Ciò porta ad alcune osservazioni da fare sulla gametogenesi femminile:

- i cromosomi omologhi rimangono **appaiati** per moltissimo tempo (l'ovulazione è un fenomeno mensile che avviene per circa 40 anni durante i quali vengono "consumati" gli oociti che sono stati depositati durante la vita intrauterina; si parte da milioni di cellule per arrivare a centinaia di oociti primari che via via si perdono anche durante il corso della vita). Ciò può essere causa di un problema patologico detto **NON disgiunzione meiotica**, che si osserva anche negli altri animali e quindi non ha nulla a che vedere con la gametogenesi e con i mammiferi in particolare. È un errore che può avvenire **durante la meiosi** e che fa sì che i **cromosomi omologhi non si separino all'anafase**; in pratica non avviene la segregazione. Le conseguenze, di cui ripareremo, sono errori nella corretta costituzione del patrimonio genetico; in modo particolare si può già immaginare che il fatto che i due cromosomi non si separino farà sì che andranno insieme in una stessa cellula ed inevitabilmente l'altra c. avrà un cromosoma in meno (nell'uomo parleremo di **trisomie** e di **monosomie**). Ovviamente la non disgiunzione può avvenire sia in prima che in seconda divisione meiotica perché possono non separarsi anche i cromatidi fratelli. Sembra che il fatto che nella donna i cromosomi omologhi rimangano appaiati

per molto tempo, possa essere causa di diversi casi di non disgiunzione e dare origine a gameti che sono malformati e quindi ad aborti o a sterilità. La sindrome di Down (trisomia del cromosoma 21) è stata sicuramente correlata con l'età materna, a dimostrazione che più tempo i cromosomi omologhi rimangono appaiati, più perderebbero la capacità di separarsi. Questo è uno dei problemi cui va incontro l'utilizzo di oociti primari troppo anziani;

la donna non rinnova mai il suo patrimonio gametico. Il maschio ricomincia ogni volta il ciclo da una mitosi, quindi da una moltiplicazione degli spermatogoni che poi passano ai vari stadi descritti durante la sua vita feconda, che teoricamente è fino alla morte (anche se a lungo andare il ciclo si rallenta, gli spermatozoi diventano più rari, possono perdere la capacità di differenziarsi e quindi magari non essere mobili o comunque perdere la capacità di penetrazione). La donna invece nasce con un patrimonio di gameti già definito, essendo nella fase di oocita primario bloccato in meiosi; quindi non moltiplica più le sue cellule, non le rinnova; quantitativamente il patrimonio è in abbondanza ma non viene rinnovato. Perciò, l'apparato femminile è più delicato per quanto riguarda l'impatto di mutageni chimici e fisici; in particolare ci riferiamo all'uso di radiografie o altre metodiche diagnostiche del genere nelle quali si deve porre attenzione a proteggere la zona per evitare di indurre danni irreversibili ai gameti. Anche i farmaci per le cure delle neoplasie possono indurre dei danni che, mentre nell'uomo dopo un periodo di non fecondità si risolvono, nella donna, se il patrimonio gametico è stato colpito, non c'è possibilità di recupero.

LA GENETICA

Ereditarietà: evoluzione storico-culturale

Per moltissimi secoli, ad eccezione di poche menti illuminate come Ippocrate o Aristotele, si è sempre creduto che, almeno le forme più semplici di vita, potessero nascere spontaneamente. Pertanto, tutto il problema dell'ereditarietà della trasmissione dei caratteri, del concepimento, erano ampiamente ignorati in quanto si era convinti che vi fosse una generazione spontanea (si credeva che potessero nascere dei viventi da materiale non vivente: per esempio, da un pezzo di carne potevano nascere i vermi). Qualche dubbio veniva per l'uomo perché il fatto che i figli somigliassero ai genitori, che ci fosse bisogno di un accoppiamento perché nascesse un bambino, faceva venire qualche sospetto.

Un esperimento di Redi e Spallanzani dimostrò senza ombra di dubbio che non esisteva generazione spontanea nemmeno per le forme più semplici di vita (se si copre la carne e quindi non possono arrivare le mosche a depositare le uova, la carne si deteriora ma da essa non nasce nulla), da cui poi la teoria cellulare che venne in seguito, l'invenzione del microscopio con la dimostrazione che esistevano delle cellule (celle) che si dividevano e così via.

Si cominciò seriamente a studiare come la vita veniva trasmessa e soprattutto come venivano trasmessi quei caratteri che si trasmettevano da padre a figlio.

Redi e Spallanzani risalgono al XVII l'uno e XVIII l'altro, quindi non agli albori della scienza.

I nomi importanti intervenuti sull'argomento (in relazione all'uomo perché per le forme più semplici si era ancora convinti della generazione spontanea) sono stati:

- **Ippocrate** (460-377 a. C.). Fu uno dei primi a rendersi conto che ci doveva essere qualcosa che veniva trasmessa con il concepimento; si parlò di “semi” e la visione è estremamente moderna.
- **Aristotele**, circa un secolo dopo, diede un parere più filosofico dicendo che nel concepimento veniva trasmessa la “sostanza” (della mente) dalla femmina mentre la “forma” del corpo dal maschio.
- **Bonnet** (1720-93). Si deve arrivare al '700, secolo dell'illuminismo e dell'interesse per le scienze, perché l'argomento fosse nuovamente oggetto di interesse. A ciò contribuì la dimostrazione di Redi che non esisteva la generazione spontanea neanche per le forme di vita più semplici ed inoltre, verso la fine del '600, un costruttore di lenti si era accorto che attraverso di esse nel liquido spermatico si potevano osservare degli **animaletti** che si muovevano. L'osservazione accese molti interessi e, poco dopo, alla scoperta dei **follicoli di Graaf** nella femmina, una polemica tra “ovisti” e “spermisti”, per attribuire maggior peso all'uno o all'altro nel nuovo individuo che si stava formando. Bonnet parlò di “**preformismo**” o di “**in scatolamento dei geni**”, intendendo che durante il concepimento fosse trasportato nel corpo materno un “**omuncolo**” che era già preformato nello spermatozoo. La donna aveva un ruolo da incubatrice nella quale l'omuncolo già preformato si sviluppava.
- **Wolff** (1798). Sviluppò la teoria “**epigenistica**” che si contrapponeva all'idea dell'omuncolo già preformato. Sosteneva che il nuovo organismo si formasse “**ex novo**” da un **materiale indifferenziato** che non era chiaro cosa potesse essere. La particolarità della teoria era che gli organi si formavano durante lo sviluppo dell'individuo, cioè non erano in alcun modo preformati.
- **Darwin** (1809-82). Lo ritroveremo per le teorie evolutive e, di fatto, si occupava di altre cose, quali grosse trasformazioni degli individui. Tuttavia l'argomento era così di moda che anche lui se ne occupò parlando di “**pangenesi delle gemmule**”. Con ciò intendeva che, in una maniera non meglio specificata, attraverso il circolo sanguigno viaggiassero **copie esatte in miniatura di organi** (gemmule) che poi si assemblavano nel corpo materno e lì si sviluppavano e si ingrandivano fino alla formazione di un nuovo individuo.

Tutte queste teorie, se pur varie, hanno in comune il fatto di considerare l'ereditarietà e quindi la nascita di un nuovo individuo qualcosa che avviene per **mescolamento**.

L'originalità di Mendel (1822-84) è quella di aver proposto una teoria di eredità “**particolata**”: ci sono delle **particelle che vengono trasmesse** (non avviene per mescolamento di organi ma ci sono delle particelle che mantengono la loro autonomia senza mescolarsi mai).

Mendel deve essere considerato molto **moderno** considerando il periodo in cui si è trovato ad agire. Le sue opere maggiori sono state pubblicate nel 1860-65 ed in quel momento non era stato ancora inventato il microscopio, non si parlava di teoria cellulare (fine dell'800), gli studi della mitosi e della meiosi sono avvenuti nella seconda metà avanzata dell'800, nulla si sapeva della fecondazione. Inoltre, nonostante che si sia oramai scoperto che il modo di trasmettere caratteri ipotizzato da Mendel avvenga per pochissimi caratteri, per quei pochi caratteri le sue teorie sono ancora valide a distanza di oltre un secolo e mezzo.

Mendel va considerato il padre della genetica anche perché è stato il primo ad utilizzare un **metodo scientifico**, cioè porsi un problema, fare un protocollo per cercare di risolvere al meglio quel problema, applicare il protocollo, registrare i risultati e valutarli da un punto di vista matematico al fine di dare una valutazione oggettiva e non soggettiva. In più, ha avuto l'opportunità (da abate di un convento) di utilizzare per i suoi studi una pianta, il **pisello odoroso** - *pisum sativum* - che aveva il grande vantaggio di riprodursi per **autofecondazione**, cioè aveva sia il seme maschile che quello femminile e si può utilizzare della stessa pianta entrambi i semi con le stesse caratteristiche.

Un altro vantaggio di questa pianta è di avere un **ciclo riproduttivo** che dura una stagione, cioè abbastanza veloce al fine di vedere i risultati (uno dei grossi problemi di fare delle osservazioni scientifiche è proprio quello di vedere i risultati in un tempo ragionevole in modo da avere più dati possibili. Come vedremo, per quello che riguarda la genetica, lo studio delle piante è stato soppiantato dall'uso di un insetto, la **Drosophila** il cui ciclo riprodotto di 15 giorni).

Infine, l'intelligenza di Mendel fu di andare a studiare **forme alternative** di un certo carattere. Osservando le piante di questa specie, si accorse che su alcuni caratteri si potevano notare delle differenze:

| Carattere | Alternative |
|--------------------|-------------------------------------|
| SEME | Rotondo o rugoso |
| - cotiledoni | Gialli o verdi |
| - mantello | Grigio o chiaro |
| BACCELLO | Pieno o con costrizioni |
| - colore | Verde o giallo |
| STELO con baccelli | Assiali o terminali (infiorescenza) |
| | Alto o nano |

alcune piante avevano il seme rotondo e liscio, altre rugoso; alcuni semi avevano i cotiledoni (le due parti che formano il seme) gialli, altri verdi; il mantello poteva essere grigio o chiaro.

Il baccello poteva essere pieno liscio o con costrizioni, verde o giallo. Riguardo allo stelo, i baccelli possono essere assiali (lungo tutto l'asse) o terminali ed il fusto poteva essere alto o nano.

In pratica, Mendel riuscì ad individuare **7 caratteri** che si potevano presentare in forme alternative, (per studiare le modalità di trasmissione dei caratteri se ne devono avere forme diverse perché se sono uguali non ci si accorge di come un certo carattere viene trasmesso), e iniziò a studiare la trasmissione di un singolo carattere.

Prima di effettuare gli esperimenti veri e propri, si procurò "**linee pure**", cioè piante riprodotte per **autofecondazione** per diverse generazioni, che dessero **sempre la stessa caratteristica**.

In pratica prese un po' di piante a seme liscio ed un po' a seme rugoso, le fece riprodurre per diverse generazioni finché non individuò delle piante che avevano sempre dato seme liscio o sempre seme rugoso: queste piante le definì "**linee pure**". Ottenute le linee pure le **incrociò tra loro**: prese una pianta a seme liscio ed una a seme rugoso, le fecondò ed osservò il risultato:

- alla **prima generazione**, tutte le piante presentavano **semi lisci**. La caratteristica seme rugoso sembrerebbe scomparsa;

una pianta si riproduce per autofecondazione sempre in linea pura, una pianta riproducendosi presentava sempre prole mista.

- successivamente fece riprodurre le piante della prima generazione per autofecondazione e si accorse che nella generazione successiva queste piante davano un rapporto di 3 piante con i semi lisci ed 1 pianta con i semi rugosi (salta una generazione ed alla generazione successiva ricompare quella caratteristica che sembrava scomparsa);
- facendo riprodurre queste piante per autofecondazione, si accorse che un quarto di quelle piante, osservandone le generazioni successive, davano sempre piante con semi lisci: quindi erano linee pure. Un altro quarto dava sempre piante con semi rugosi (ancora linee pure), l'altra metà delle piante riproponeva la situazione dei genitori, cioè $\frac{3}{4}$ a seme liscio ed $\frac{1}{4}$ a seme rugoso.

Le piante che davano sempre una progenie mista le chiamò "linee ibride" ad indicare che avevano l'informazione per due alternative e non per una sola.

A questo punto, Mendel aveva definito una **linea pura**, cioè una linea che riproducendosi nelle generazioni darà sempre un solo carattere ed una **linea ibrida**, cioè una linea che riproducendosi presenta nella progenie più caratteristiche (vedi appunti per disegni).

La prima osservazione fatta da Mendel fu che alla prima generazione uno dei due caratteri non si manifesta ma rimane mascherato (non sparisce perché poi si ripropone alla generazione successiva); a questo punto espresse il principio della "**dominanza**": tra due caratteri antagonisti uno dei due domina sull'altro. Questo principio per vari motivi nel tempo è stato modificato ed oggi ci si è accorti che non tutti gli antagonisti dominano l'uno sull'altro, ma comunque rimane valido il fatto che alla prima generazione si ha una progenie che è sempre tutta uguale (per un singolo carattere). Perciò il principio della dominanza si è trasformato in **principio dell'uniformità** (stiamo sempre parlando di prima generazione di linee pure).

Un'ulteriore osservazione è che il carattere che non si era manifestato nella prima generazione (F1), compare nella generazione successiva. Perciò, una grande scoperta è che i caratteri mantengono la loro caratteristica, non si mescolano, non si modificano.

La conclusione di Mendel fu che esistono delle entità "**particolate**", intese come particelle, che chiamò "**determinanti**" o "**fattori ereditari**" e che ciascun individuo porta due determinanti per ciascun carattere (senza saperlo aveva scoperto la diploidia), perché altrimenti non si poteva spiegare come da una pianta che era liscia, potessero nascere sia piante lisce che piante rugose. Infine, intuì che nel momento in cui si formavano le **cellule germinali**, in quelle cellule in qualche modo c'era andato a caso un **solo determinante** dei due che ogni pianta aveva (aveva scoperto al meiosi, la separazione degli omologhi).

Sulla base di queste conclusioni, Mendel definì la prima legge.

1^a GENERAZIONE

| | | |
|---|----|----------------|
| A | A | A SEME LISCIO |
| a | Aa | Aa SEME LISCIO |
| a | Aa | Aa SEME LISCIO |
| a | aa | aa SEME RUGOSO |

100% SEME LISCIO

2^a GENERAZIONE

| | |
|---|-------|
| A | a |
| A | AA Aa |
| a | Aa aa |

75% SEME LISCIO
25% SEME RUGOSO

Lezione 22 (05/04)

2 per ogni carattere

Mendel aveva concluso che esistevano dei "determinanti" che venivano trasmessi da un individuo, ad un altro ed erano in grado di esprimere alcune caratteristiche; inoltre, alcuni determinanti erano **dominanti** su altri. Ciascun individuo aveva due determinanti uguali o diversi fra loro che durante la formazione delle cellule germinali si separavano, perciò ciascuna c. germinale aveva un solo determinante; l'unione delle c. germinali avveniva a caso.

Rivediamo l'esperimento effettuato da Mendel sulla base delle conclusioni da lui fatte.

Mendel partiva da linee pure, cioè una pianta che riprodotta per autofecondazione, nel tempo desse sempre lo stesso carattere esteriore. Se partiamo dal presupposto che ciascuna pianta deve avere due determinanti, è chiaro che linee pure li hanno uguali in quanto solo quella deve essere la caratteristica presente. Invece di disegnare, scriviamo (vedi appunti) il seme liscio con alcune lettere; indicheremo il carattere **dominante** con la **maiuscola** (L, liscio) ed il **recessivo** con la **minuscola** (l, rugoso). Essendo linee pure, i determinanti sono uguali quindi le piante a semi lisci saranno L/L e le rugose l/l. Durante la formazione delle linee germinali, i due determinanti si separano e nei gameti si avrà in una pianta L (tutti uguali, non ha altro carattere da dare) e per l'altra l. La fecondazione tra queste due piante darà una pianta che avrà entrambe le caratteristiche e quindi sarà L/l. Perciò, non sarà più una linea pura perché non ha un solo tipo di determinante ma ne ha due diversi e quindi viene chiamata linea "ibrida". Alla formazione dei gameti, questa pianta non darà più un solo tipo di gameti ma ne darà due, una metà L ed una metà l. Dato che la fecondazione avviene a caso, se si fanno riprodurre queste piante per autofecondazione, casualmente una in una certa quantità di gameti si incontreranno L/L, qualche volta L/l, l/L e l/l, cioè tutte le possibilità. Per vedere quali sono le possibilità, la cosa migliore è quella di fare un disegno a griglia di questo tipo:

| | | |
|---|------------|------------|
| | L | l |
| L | L/L (L) | L/l (L) |
| l | l/L (L) | l/l (l) |

Da una parte si mettono i gameti femminili (L/l) e siccome la pianta è la stessa si è certi che i gameti maschili sono ugualmente L/l (questo è il vantaggio dell'autofecondazione).

L'incontro avviene a caso e nel primo quadratino si incontrano i gameti L/L, nel secondo L/l; dall'altra parte si incontreranno l/L e l/l (l'ordine non è importante).

Nei riquadri è scritto quello che la pianta porta di informazione mentre la pianta appare come è scritto in basso a destra fra parentesi: se la pianta ha soltanto L il carattere che si manifesta può essere solo quello, così come se la pianta porta due determinanti l, mostrerà il carattere rugoso.

Tutte le volte che ci sono due determinanti diversi, Mendel asseriva che c'era sempre uno dei due che dominava sull'altro. Si è visto che non è sempre così ma rimane il fatto che la F1, quando la

pianta appare solo con semi lisci, qualsiasi sia il comportamento delle due caratteristiche fra loro, la **F1** rimane sempre **uniforme**. Lo schema mostrato si sovrappone perfettamente a quanto detto nella scorsa lezione cioè l'incrocio di due linee pure (anche dette "parentali"), la **F1 che è tutta uguale** e che presenta uno solo dei due caratteri, quindi la scomparsa di uno dei due caratteri, e la generazione successiva in cui si ha $\frac{1}{4}$ di piante con i semi lisci, $\frac{1}{4}$ con i semi rugosi, $\frac{2}{4}$ sempre con i semi lisci che se vengono reincrociati non sono linee pure ma si comportano come ibridi.

La terminologia suggerita da Mendel è ovviamente superata ed oggi sappiamo che "l'entità particolare" è un **tratto del DNA** (vedremo come si è arrivati a stabilire questo); sappiamo che questi tratti di DNA possono non essere sempre identici (sappiamo che le cellule sono diploidi) e quindi viene l'idea che questi caratteri possano essere tratti di cromosomi omologhi.

Le definizioni moderne sono:

- **genotipo**. È la costituzione genetica, l'informazione che ciascuno porta;
- **fenotipo**, cioè "tipo manifesto", cioè quello che si vede all'esterno.

Il gioco tra genotipo e fenotipo è dato proprio dal comportamento dei due determinanti tra loro.

A proposito del termine determinante, si deve stabilire che quando si parla di una funzione, di una caratteristica che si sta osservando (la forma del seme), viene definita **gene**, (che si dimostrerà essere un tratto di DNA); le diverse forme con cui questa caratteristica si può esprimere (liscio o rugoso), le alternative con cui il gene si esprime, si chiamano **alleli**.

Quindi, la **funzione del gene** si identifica con un **tratto di DNA** che esprime una certa caratteristica (colore dei capelli, degli occhi, forma delle ali, della coda, colore del seme, forma del seme ecc.) di quell'individuo. Le forme alternative con cui un gene si esprime, (cioè l'espressione della caratteristica), viene definito **allele** (si potrà avere l'allele per il seme liscio, per il seme rugoso, per il colore blu ecc. ecc.). Gli alleli, come abbiamo visto, possono avere dei comportamenti reciproci diversi (Mendel nei suoi esperimenti li ha trovati tutti dominanti). Oggi sappiamo che non sempre gli alleli si comportano con un rapporto di dominanza e recessività uno rispetto all'altro, ma il comportamento può essere:

- **codominanza**; sono due alleli che hanno la stessa capacità di esprimersi. Per esempio, esiste un gruppo sanguigno AB: cioè significa che c'è un allele che farà antigene di tipo A ed un allele che farà un antigene di tipo B e di questi due antigeni nessuno riesce a mascherare l'altro per cui li vediamo entrambi, li determiniamo entrambi.
- **dominanza parziale**, si verifica quando nell'ibrido non si manifesta né uno solo dei due né entrambi, ma si vede un **intermedio** (mescolamento dei prodotti). Un esempio molto chiaro è dato dalla pianta *mirabilis jalapa* (bella di notte) che esiste nelle forme fiori rossi e bianchi.

Se si prendono linee pure di piante con fiori rossi e bianche e le incrocio tra loro, si ottengono piante con fiori rosa. Il mescolamento è avvenuto a livello del prodotto, cioè l'allele R (rosso) ha fatto il suo pigmento, l'allele B (bianco) ha fatto il suo e poi si sono mescolati.

Ciò si può affermare perché se si prendono due piante a fiori rosa e si incrociano tra loro, si ottiene una pianta rossa, una bianca e due piante rosa. Ciò indica che **gli alleli sono rimasti integri** e si esprimono alla generazione successiva.

| | | |
|---|-------------|-------------|
| | R | B |
| R | R/R (R) | R/B (Ro) |
| B | R/B (Ro) | B/B (B) |

Ecco perché l'ereditarietà proposta da Mendel viene definita "particolata", in quanto ci sono delle "particelle" fisiche (tratti di DNA) che rimangono sempre integre nelle generazioni, che possono essere mascherate, possono essere espresse, i loro prodotti possono mescolarsi, ma l'allele (l'entità particolare) rimane sempre integra.

Se rivediamo l'esperimento di Mendel in termini di rapporto tra le circa un migliaio di piante esaminate dall'abate, si avrà:

2^o QUALE RAGIONE

per il genotipo
 1 (pianta pura) : 2 (piante ibride) : 1 (pianta pura)
 $\begin{matrix} RR & & RB & RB & & BB \end{matrix}$

e per il fenotipo
 3 (piante a seme liscio) : 1 (pianta a seme rugoso).

La definizione più moderna di linea pura è quella di riferirsi ad un individuo "omozigote" (nello zigote i due caratteri sono uguali), mentre per la linea ibrida si parlerà di "eterozigote" (i caratteri sono diversi tra loro). Ovviamente, quando usiamo questi due termini ci riferiamo al carattere o ai caratteri che stiamo osservando. (una pianta omozigote per seme liscio - L/L -, non vuol dire che per tutto il resto del suo patrimonio genetico sia omozigote).

Da ricordare l'importanza numerica dell'esperimento di Mendel in quanto quello che è stato fatto per il seme è stato ripetuto per le 7 caratteristiche ed il numero di piante esaminate è sul migliaio; il rapporto non è sempre uguale 3:1, ma ci sono delle piccole variazioni statisticamente non significative. Questo dimostra che Mendel ha affrontato il problema in maniera oggettiva, utilizzando la verifica matematica dei risultati.

Lezione 23 (10/04)

Riassunto. Fondamenti della genetica mendeliana.

- i caratteri sono determinati da "entità particolate" chiamate da Mendel "determinanti". Il concetto di entità particolata è molto importante perché si contrapponeva all'idea di "mescolamento" corrente fino a quel momento;
- in ogni individuo, per ogni carattere ci sono due "determinanti" che si separano al momento della formazione delle cellule germinali; la fecondazione, cioè l'unione delle due c. germinali fra loro è un evento del tutto casuale.

Termini più moderni:

- "carattere" = gene: Per gene si intende un tratto di DNA che svolge una certa funzione. Dato che il DNA può dare luogo solo alla formazione di proteine, per gene si intende un tratto di DNA che presiede alla formazione di una certa proteina utilizzata per una determinata funzione;
- "determinanti" = alleli. Per alleli si intende le forme alternative con cui un gene si può esprimere. In pratica il DNA è dato da una sequenza di nucleotidi che differiscono tra loro esclusivamente per basi diverse: quando si parla di alleli si immagina che un tratto ben preciso di DNA, chiamato "locus genico" (è il luogo fisico in cui è localizzato il gene sul DNA), che presiede ad un'unica funzione, può mostrare una sequenza di nucleotidi diversa da quella originaria. In questo caso si avrà la formazione di proteine che sono fra loro diverse; tale diversità di solito non comporta conseguenze per l'individuo ma dà adito ad alternative nell'espressione di quel carattere (gene), come per esempio il seme liscio o rugoso visto negli esperimenti di Mendel. Altre volte, invece, il cambiamento nella sequenza di nucleotidi può dare origine ad una proteina con funzione totalmente diversa o addirittura priva di funzione (incapace di svolgere una certa funzione): in questo caso, quindi, le conseguenze possono essere peggiori, dando origine a forme patologiche che studieremo più avanti parlando di mutazioni;
- "linea pura" = omozigote. Ha due alleli uguali;
- "linea ibrida" = eterozigote. Ha due alleli diversi. La scrittura L/L oppure L/l sta ad indicare la presenza di alleli uguali o diversi su cromosomi omologhi; ciascun allele è portato da un cromosoma omologo (cromosomi omologhi: due cromosomi uguali per morfologia, per funzione, che possono essere diversi per sequenza nucleotidica). Si usa la stessa lettera per indicare che la funzione è la stessa; si usa la maiuscola o la minuscola seguendo ancora la rappresentazione mendeliana che indicava in maiuscolo i caratteri dominanti e con la stessa lettera minuscola i caratteri recessivi. Oggi sappiamo che non c'è sempre un rapporto di dominanza e recessività fra gli alleli ma si può avere codominanza e dominanza parziale. Nel caso della codominanza (molto frequente) si userà la stessa lettera di base con un indice diverso: A^I , A^{II} , oppure come nel caso dei gruppi sanguigni, I^A , I^B (stessa funzione, alleli diversi);
- genotipo = costituzione genetica dell'individuo, cioè quali sono gli alleli che l'individuo porta;
- fenotipo = caratteristica espressa, ciò che appare. Il fenotipo sarà diverso dal genotipo o comunque si avrà il dubbio di quale sarà il genotipo tutte le volte che l'individuo è eterozigote. Nell'omozigosi, sia che sia dominante (L/L) sia recessiva (l/l), si conosce già specialmente nel caso della recessività, quale sarà il genotipo. Tutte le volte che è manifesto un carattere recessivo, si sa con certezza qual è il suo genotipo; infatti, il carattere recessivo si esprime solo se è presente in duplice copia. Se si vede una pianta a semi lisci, non si può sapere se è L/L o L/l perché il fenotipo è lo stesso; al contrario, se si vede una pianta a semi rugosi non ci sono dubbi sul suo genotipo.

In conclusione ricordiamo che si parla di rapporti che possono essere di 3:1 nel caso di un rapporto fenotipico o di 1:2:1, per quanto riguarda quello genotipico. Questi rapporti probabilistici sono rispettati quanto più grande è il campione studiato.

Il secondo obiettivo che si pose Mendel fu di verificare che cosa succedesse quando si analizzano **due caratteri contemporaneamente** invece di uno singolo. Il quesito era: **i caratteri sono indipendenti l'uno dall'altro o si influenzano in qualche modo nella trasmissione?**

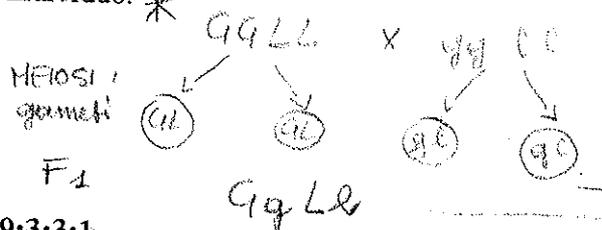
Mendel prese in considerazione i **due caratteri liscio/rugoso e giallo/verde** (forma e colore del seme). Partì sempre con linee pure, cioè caratteri omozigoti, con semi ^{gg ll} gialli/lisci come caratteri dominanti e ^{GG LL} verde/rugoso come recessivi.

La **prima generazione (F1)** non presenta novità rispetto all'attesa: le piante sono tutte uguali e presentano i caratteri dominanti (seme giallo/liscio).

L'incrocio per **autofecondazione** di queste piante, che mette al riparo dal dubbio che ci siano altri genotipi coinvolti (è lo stesso identico genotipo), dà rapporti nei quali si hanno **9/16 di piante con caratteri dominanti** (giallo/liscio), **3/16 con un carattere dominante** (liscio) ed uno recessivo (verde), altri **3/16 mostrano l'altro carattere dominante** (giallo) ed uno recessivo (rugoso); infine, **1/16 mostra entrambi i caratteri recessivi** (verde/rugoso). Ovviamente, nel caso del carattere recessivo non si hanno dubbi sul genotipo dell'individuo. *

Mendel trovò:

- 315 piante con seme giallo/liscio;
- 101 verdi/lisci,
- 108 gialli/rugosi,
- 32 verdi/rugosi, che torna con il rapporto di **9:3:3:1**.



È interessante che se si raggruppano questi numeri per singolo carattere, cioè, per esempio, considerando solo il **colore** del seme a prescindere dalla forma, si ottiene:

315 (gialli) + 108 (gialli) = **423** piante con semi gialli;

101 (verdi) + 32 (verdi) = **133** piante con semi verdi;

e per la forma:

315 (lisci) + 101 (lisci) = **416** piante con semi lisci;

108 (rugosi) + 32 (rugosi) = **140** piante con semi rugosi.

I rapporti tra questi numeri sono di **3:1** sia per quanto riguarda il colore sia per la forma.

Questo vuol dire senza ombra di dubbio che **non c'è stato alcun tipo di mescolamento e che una coppia di caratteri non ha influenzato l'altra coppia**. In altre parole, le **due coppie sono indipendenti l'una dall'altra** e ciò dimostra che anche quando si prendono in considerazione due coppie di caratteri il **comportamento è identico a quello della singola coppia**.

Perciò, riscrivendo l'esperimento di Mendel con gli alleli, si otterrà lo stesso risultato: *

si parte da: **giallo/liscio** x **verde/rugoso (linee pure)**

i genotipi sono: **GG/LL** **gg/ll**

Alla formazione dei gameti i due determinanti si separano, dando **G/g** e **G/g**.

Al momento della fecondazione si avrà un individuo che sarà **Gg/Ll**, cioè un **ibrido**.

| | | |
|---|-------|-------|
| ♀ | g l | g l |
| ♂ | G l | G l |
| | Gg Ll | Gg Ll |
| | Gg ll | Gg ll |

Questo ibrido viene incrociato per **autofecondazione** (quindi i gameti sono gli stessi).

Si prende in esame una coppia per volta; partendo con **Gg**: se è vero che non c'è influenza tra le coppie, la separazione di questa coppia sarà indipendente dalla separazione dell'altra e si avranno gameti **GL, Gl, gL** e **gl** (in pratica, visto che la segregazione è casuale, G una volta va con L ed una con l, g una volta va con L ed una con l). Questi gameti si devono autofecondare e quindi si avranno gli stessi gameti per l'altro sesso. Si fa il quadrato di Punnett:

| F / M | GL | Gl | gL | gl |
|-------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| GL | GG/LL (GL) | GG/Ll (GL) | Gg/LL (GL) | Gg/Ll (GL) |
| Gl | GG/lL (GL) | GG/ll (Gl) | Gg/lL (GL) | Gg/ll (Gl) |
| gL | Gg/LL (GL) | Gg/Ll (GL) | gg/LL (gL) | gg/Ll (gL) |
| gl | Gg/lL (GL) | Gg/ll (Gl) | gg/lL (gL) | gg/ll (gl) |

Raggruppando per **fenotipi** si ottiene: **9 GL** (entrambi i caratteri dominanti), **3 Gl** (un carattere dominante ed uno recessivo), **3 gL** (come precedente ma inverso), **1 gl** (entrambi recessivi).

Quindi, anche riscrivendo in maniera più moderna quanto proposto da Mendel, si confermano gli stessi rapporti. Nel rapporto **genotipico** le cose cambiano perché si devono scegliere tutti quelli che sono doppio omozigote (per entrambi i geni), cioè GG/LL, da tutti quelli che sono omozigoti per un carattere ed eterozigoti per l'altro, da tutti quelli che sono doppio eterozigote o doppio ibrido (Gg/Ll). A questo risultato si può arrivare anche matematicamente in quanto è un prodotto di un binomio: $(3:1) \times (3:1) = 9:3:3:1$. Questa soluzione può essere utile per i **polibridi**, cioè quando il numero di geni aumenta (es: $3:1 \times 3:1 \times 3:1$).

Così si possono calcolare i rapporti specifici dei vari fenotipi.

Le leggi di Mendel sono valide e si applicano ai caratteri **monofattoriali** semplici (un solo gene con una semplice ereditarietà genetica); più avanti vedremo che non sempre le cose sono così semplici cioè non sempre si avrà un solo gene ed in più entra anche l'ambiente nel determinare un certo fenotipo.

Leggi di Mendel. Sono due, anche se alcuni testi ne citano 3 considerando il principio della dominanza come una legge (questo non è una legge, non essendo sempre rispettato).

Il principio della dominanza è sostituito dal principio della **uniformità** della F1.

Prima legge di Mendel:

FECONDAZIONE

durante la formazione dei gameti i determinanti (**alleli**), **segregano in due diversi gameti.**

Seconda legge di Mendel:

in ibridi per due coppie di determinanti (doppi eterozigoti, cioè Aa, Bb, Cc, ecc.), ciascuna coppia **segrega indipendentemente dall'altra.**

Queste leggi, pubblicate intorno al 1865, ebbero una grande risonanza immediata alla quale seguì un lungo oblio. Per molti anni si continuò a non dare più importanza a queste leggi, per vari motivi, molti dei quali dovuti al momento nel quale furono effettuati gli studi. Infatti, non era ancora in uso il microscopio, non si conoscevano mitosi, meiosi e cromosomi. Perciò, la grande modernità di Mendel ha segnato anche la fine dei suoi studi perché mancanza di comprensione. Gli studi si spinsero quindi verso lo studio della morfologia della cellula e di qualche sua funzione, seguendo altre strade.

Nei primi del '900, Sutton riscopri le leggi di Mendel associandole a quanto avveniva in meiosi. In particolare, si era pensato che i cromosomi omologhi segregassero e se i due omologhi vengono identificati con lettere, per esempio A ed a, quando segregano, in un gamete si avrebbe A ed in uno a, come diceva Mendel. Allo stesso modo, per l'assortimento indipendente dei cromosomi, descritto anche se non provato, se si partiva dal presupposto di avere due coppie di cromosomi Aa e Bb, si poteva avere l'alternativa Aa e bB; alla segregazione si avrebbe AB, ab e Ab e aB, cioè i quattro gameti presupposti da Mendel per un ibrido.

In quel periodo le leggi assumevano un altro significato perché c'era qualcosa che si poteva vedere al microscopio, che aiutava a pensare che avessero una base reale. Le osservazioni di Sutton (non c'erano le prove che ci fosse l'assortimento indipendente dei cromosomi), lo portarono a formulare la cosiddetta "teoria cromosomica", cioè che, data la similitudine tra quello che accadeva alla meiosi ed il comportamento dei determinanti mendeliani, i determinanti stessi fossero localizzati sui cromosomi. Questa terminologia è ancora in uso: ancora oggi si usa dire "i cromosomi portano i geni", "i geni sono localizzati sui cromosomi", anche se è inesatta: infatti i geni sono pezzi di cromosomi (non sono "portati" dai cromosomi).

Da questo momento in poi, siamo ai primi del '900, qualsiasi teoria dovrà essere provata e non si prescindere più dal metodo scientifico; vedremo che la teoria cromosomica sarà provata.

Test cross o "reincrocio" (o progeny test) → *guardando qualcuno.*

È molto utile in genetica perché permette di capire il genotipo di un individuo guardando la sua progenie. Già Mendel lo aveva fatto quando aveva incrociato le (3) piante a semi lisci della F₂, dimostrando che non erano tutte linee pure; la pianta che dava tutte piante a semi lisci era L/L, le piante che davano semi rugosi erano ibridi. Nell'uomo, (dove non si può incrociare per sperimentare) si effettua esaminando gli alberi genealogici, mentre sperimentalmente (negli animali e nelle piante) si attua utilizzando il fenotipo doppio recessivo.

Se l'individuo del quale non si conosce il genotipo (l'incrocio si effettua perché non si conosce il genotipo e non si può sempre fare l'autofecondazione che è tipica delle piante) viene reincrociato con un individuo recessivo, che si riconosce fenotipicamente, le cose si semplificano molto.

Per esempio, si hanno due individui che fenotipicamente appaiono GL e Gl e dei quali non si conosce il genotipo. Le ipotesi sono due: che sia un doppio eterozigote o un doppio omozigote.

Se si reincrociasse con un altro individuo del quale non si conosce il genotipo, sarebbe molto complicato. L'unico individuo di cui si sa con certezza il genotipo è il recessivo. Perciò si ottiene.

Lezione 24 (12/04)

La teoria di Sutton concludeva che i **geni fossero** portati dai **cromosomi**, partendo dalla convinzione che alla **meiosi** non solo segregassero gli omologhi (ampiamente dimostrato), ma anche che ci fosse un **assortimento casuale dei cromosomi omologhi in piastra metafasica**.

Non potendo basare leggi della genetica su presunzioni, entrambi queste cose andavano dimostrate. La principale cosa da dimostrare era proprio che alla meiosi accadesse quanto era stato previsto.

La dimostrazione di ciò fu un colpo di fortuna perché in quel periodo si stava studiando soprattutto la determinazione del sesso; l'attenzione era rivolta proprio ai cromosomi, che in quel momento era possibile studiare al microscopio. In effetti si evidenziò chiaramente che a volte esisteva un **cromosoma soprannumerario**, in più, nel maschio o nella femmina. Per esempio, nella **cavalletta** il **maschio** aveva un cromosoma in più, in un **emittero** (insetto), il cromosoma in più era nella **femmina**; nel **Protenor** ancora nella **femmina**; la cosa interessante che venne determinata fu che a volte maschio e femmina potevano avere lo stesso numero di cromosomi ma nel maschio (è poi fu dimostrato anche nella femmina) i due cromosomi potevano essere una **coppia eteromorfa**, cioè essere diversi. In tutti questi casi c'è sempre un sesso che fa gameti diversi: la femmina del primo caso, che ha 22 cromosomi li dividerà equamente 11 in ciascun gamete, ma il maschio, che ne ha 23 dovrà fare una serie di **gameti con 11 cromosomi** ed una serie con **12** perché ne ha uno in più.

Così quando il numero è uguale ma c'è una coppia eteromorfa ci sarà un sesso che fa **gameti diversi**: l'uomo, per esempio, fa gameti con la Y e con la X; nel pollo è la femmina che fa gameti diversi, alcuni con Z ed altri con W (così vengono identificati i cromosomi sessuali del pollo). Perciò, in generale si può parlare di **eterogametia maschile**; quando è il maschio che fa gameti diversi o, viceversa, di **eterogametia femminile** (la diversità può consistere sia nella presenza di un cromosoma soprannumerario sia in una differenza morfologica).

Ciò per dire che nei primi del '900 fervevano gli studi sulla gametogenesi ed in parallelo sulla determinazione genetica del sesso. La studiosa **Eleanor Carothers** stava studiando la spermatogenesi dell'insetto **trimerothrophis** che aveva la caratteristica di avere il **maschio con un cromosoma soprannumerario** ed in più una **coppia di omologhi** (che non avevano nulla a che fare con la determinazione del sesso) con **forma diversa**. Quindi questo insetto presentava 3 cromosomi diversi uno dall'altro (è evidente che per dimostrare che qualcosa avviene alla meiosi si devono distinguere i cromosomi tra loro e questo non è possibile con i cromosomi omologhi).

Perciò, si partiva da un individuo (vedi appunti) che aveva una coppia di cromosomi eteromorfi ed un cromosoma singolo soprannumerario che indicava il sesso maschile. Dopo la duplicazione del DNA si ha l'appaiamento degli omologhi e la disposizione in piastra metafasica. Con questo tipo di situazione fu facile dimostrare che in piastra metafasica, al momento della migrazione, il **cromosoma soprannumerario** migrasse una volta con il cromosoma più piccolo ed una volta con quello più grande della coppia eteromorfa. Questo stava a significare senza ombra di dubbio che in metafase si verificava un **assortimento casuale dei cromosomi omologhi**. Infatti, in assenza di marcatori fisici dei cromosomi, nel momento in cui si disegnano i cromosomi appaiati non si può

capire se sono indipendenti e si assortiscono a caso. Così invece è banale perché l'aver 4 tipi di gameti porta inevitabilmente a dover ammettere che il cromosoma singolo segreghi una volta con il cromosoma più piccolo ed una volta con quello più grande. In pratica, avere a disposizione questo genoma così particolare consentì di dimostrare il primo punto, cioè che alla metafase meiotica ci fosse un assortimento casuale dei cromosomi. ~~Cio però non dimostrava ancora che i geni fossero "portati" dai cromosomi;~~ il problema della dimostrazione genetica è sempre quello di mettere insieme dati citologici, cioè della cellula, visti fisicamente al microscopio, con dati genetici cioè con i risultati che si ottengono dal punto di vista della progenie. Un primo passaggio per dimostrare ciò fu un'ulteriore riprova: in quel periodo c'era stato un altro grande cambiamento negli studi di genetica; si era passati lentamente a studiare gli animali ed in particolare venne utilizzata la *Drosophila Melanogaster*, un insetto con ~~due paia di ali (dittero)~~ che resterà l'animale di elezione per gli studi di genetica in quanto presenta un'enorme quantità di caratteri alternativi (es. colore occhio, ali, setole, bilancieri, ecc.) ed in più può essere allevata con pochissima spesa ed ha un ciclo riproduttivo breve (15-20 gg) che consente di studiare molte generazioni in pochissimo tempo (invece dell'anno se non due delle piante). Nel 1910 uno studio effettuato da **Morgan** seguì in particolare la caratteristica del **colore degli occhi**; in un ceppo (insieme di insetti selezionati per alcune caratteristiche) fu notato un "**mutante**" che presentava **occhi chiari** ed era maschio. Morgan cercò di capire come venisse trasmesso questo carattere, facendo riferimento alle leggi di Mendel. Incrociò quindi una **femmina con occhi rossi** con il **maschio mutante** e alla F1 si ottennero **tutte Drosophile con occhi rossi**, con il pieno rispetto delle leggi di Mendel. Quindi, maschi e femmine della progenie furono incrociati fra loro attendendosi il rapporto mendeliano 3:1 che, dal punto di vista numerico, venne rispettato in quanto si ebbero $\frac{3}{4}$ di individui con occhi rossi ed $\frac{1}{4}$ con occhi bianchi. La cosa particolare fu che questo $\frac{1}{4}$ di individui era costituito soltanto da **maschi**. L'esperimento successivo incrociò il maschio con occhi bianchi (il "**mutante**") con una delle femmine con **occhi rossi della F1**, che si presupponeva fossero ibride. Questo incrocio costituirebbe un "test cross" e dovrebbe dare il 50% di individui con occhi rossi ed il 50% con occhi bianchi: in effetti si ottennero il 50% delle femmine con occhi bianchi ed il 50% con occhi rossi e così pure nei maschi. Finora si erano incrociati solo **maschi con occhi bianchi**, visto che si era partiti con un maschio "mutante" con occhi bianchi e non si era mai provato ad incrociare una femmina con occhi bianchi (ottenute con il "test cross"). A questo punto si incrociarono **femmine con occhi bianchi con maschi con occhi rossi**: si sarebbe dovuto trattare ancora di un incrocio tra **linee pure** e quindi ci si attendeva una F1 uniforme tutta con occhi rossi. Invece, le femmine ebbero tutte **gli occhi rossi** ed i **maschi tutti gli occhi bianchi** e, reincrociati fra loro questi due individui diedero la distribuzione di femmine e maschi al 50% con occhi rossi e con occhi bianchi. ~~Si pensò che ci fossero delle eccezioni alle leggi di Mendel, ma Morgan ebbe l'idea, dato che il maschio della Drosophila ha cromosomi del sesso XY e la femmina XX, che fosse vero quanto proposto da Sutton, cioè che i geni fossero sui cromosomi ed in particolare che il carattere colore degli occhi fosse posto sui cromosomi sessuali.~~

Se così fosse stato sarebbe stata logica una differenza tra maschi e femmine vista la diversità dei cromosomi tra i due sessi.

In effetti, se si riscrive il primo esperimento ammettendo che i cromosomi sessuali portino il carattere, ed in particolare che sia portato dalla X^w (perché se fosse portato dalla Y non si avrebbero femmine con gli occhi bianchi), si ha:

un maschio con gli occhi bianchi con $^wX^wY$ e la femmina con occhi rossi con $^wXX^w$ ($W = \text{White}$).
I gameti maschili saranno wX e Y mentre quelli femminili saranno wX e X^w .

Facendo il quadrato del Punnett:

| | | |
|-------|-------------------|-------------------|
| | wX | X^w |
| wX | $^wXX^w$ (o.r) | $^wXX^w$ (o.r) |
| Y | wXY (o.r) | wXY (o.r) |

cioè si avranno femmine eterozigoti $^wX X^w$ con occhi rossi e maschi X^wY con occhi rossi.
Perciò alla F_1 il carattere bianco scompare.

Nella generazione successiva si incrociano questi due, cioè una femmina eterozigote ed un maschio con occhi rossi che si vuole dimostrare abbia un corredo cromosomico come quello mostrato. Ancora una volta il maschio fa due tipi di gameti, cioè wX e Y così come la femmina che fa wX e X^w . La progenie sarà:

| | | |
|-------|-------------------|-------------------|
| | wX | X^w |
| wX | $^wXX^w$ (o.r) | $^wXX^w$ (o.r) |
| Y | wXY (o.r) | wXY (o.b) |

cioè **femmine omozigoti** con occhi rossi, **femmine eterozigoti** con occhi rossi, **maschi** con occhi rossi e **maschi** con occhi bianchi. Quindi è stato confermato il rapporto mendeliano di 3:1 ma l'1 è dato soltanto da maschi. Il problema nasce dal fatto che la prima legge di Mendel incrociava due eterozigoti; qui si incrocia un eterozigote con un altro eterozigote che però non lo è per quel carattere. Infatti, da due gameti diversi ma per tipo di cromosoma, non per carattere in quanto il cromosoma Y non porta l'altro locus per quel carattere (nel tempo vedremo che nella *Drosophila* il cromosoma Y va considerato pressoché vuoto comunque non ha mai gli stessi geni che hanno le X). Questa dimostrazione del fatto che, supponendo che i caratteri fossero posti sulla X , effettivamente si ottenevano i risultati di Morgan, fece pensare che la teoria cromosomica fosse valida. Mancava ancora la prova citologica vera e propria che si ebbe dopo qualche anno quando, continuando a studiare caratteri legati alla X , o presupposti tali, ci si scontrò con risultati ancora più inattesi: osservando i cromosomi al microscopio ci si accorse che i cromosomi X della femmina erano affacciati, cioè non segregavano alla meiosi. Questa fu la prova definitiva che portò a concludere che i cromosomi fossero la localizzazione fisica dei geni in quanto una diversità nei cromosomi (l'essere affacciati) portava un inatteso risultato nella progenie e ciò costituiva la dimostrazione definitiva che i cromosomi fossero i "portatori" dei caratteri mendeliani.

Lezione 25 (19/04)

Abbiamo concluso la scorsa lezione con l'enunciare come venne dimostrato che i geni "si trovano" sui cromosomi (questo è un modo di dire ancora utilizzato anche se sappiamo che un gene è un tratto di DNA e quindi è una parte di cromosoma; il cromosoma, quindi, non è un contenitore).

I **geni** sono tratti di DNA hanno una loro particolarità fisica, non si mescolano, sono delle "entità particolate", come Mendel li aveva definiti, che vengono trasmessi alle generazioni successive.

La **risposta fenotipica**, cioè il fatto che a volte un fenotipo può essere diverso dal genotipo, dipende dal **rapporto** tra gli **alleli**. Tutto questo si riferisce a "**fattori mendeliani semplici**", cioè a caratteri codificati da un **unico gene** e che abbiano un'espressione esclusivamente genetica (tali caratteri esistono e sono i primi ad essere stati scoperti). Quanto detto finora, inoltre, si riferisce a studi effettuati tra la metà dell'800 ed i primi del '900 (la scoperta della struttura del DNA è degli anni '50). Infine, avevamo accennato agli studi effettuati sulla determinazione del sesso, che avevano parallelamente portato ad individuare dei caratteri posti sui cromosomi che determinano il sesso. Quest'ultimo poteva essere determinato in vario modo.

Riassumendo, ~~con la scoperta di geni che possono essere localizzati sui cromosomi che determinano il sesso si comincia a parlare di eredità legata al sesso (linked):~~

~~poteva esistere una digametia maschile, è il maschio della specie che forma gameti diversi.~~

~~Questa digametia (due gameti) può essere dovuta o all'assenza di un cromosoma (la femmina ha un cromosoma in più), oppure alla presenza di due cromosomi diversi come forma.~~

~~Perciò possiamo avere una femmina XX, la scelta di questa lettera è dovuta alla morfologia del cromosoma in metafase mitotica. Infatti il cromosoma è metacentrico (centromero a metà) e quando è duplicato somiglia moltissimo ad una X. Il maschio è XO, cioè privo di un cromosoma, oppure XY, lettera scelta ancora per morfologia in metafase mitotica. La Y è un cromosoma con centromero acrocentrico (submetacentrico), cioè con un braccio molto più piccolo, e quando si duplica assume una forma che ricorda una Y.~~

~~Possiamo perciò avere un'eredità legata alla X, cioè X-linked: in tal caso si parla di eredità~~

~~DIAGINICA (dal greco "δια"=attraverso e "γυνε"=femmina), cioè "attraverso la femmina".~~

~~L'eredità Y-linked viene definita anche eredità OLANDRICA (dal greco "ολοσ"=solo e "ανδρος"=uomo), cioè che si riscontra soltanto nei maschi; è infatti evidente che, se ci sono dei caratteri legati alla Y, avendo solo il maschio quel cromosoma, solo il maschio potrà esprimerli.~~

~~In realtà ci sono pochissimi esempi di eredità Y-linked: la zigodattilia (fusione di due dita), la ichthyosis hystrix gravior (uomo porcospino: peluria molto evidente, tipo setola, diffusa su tutto il corpo), la peluria nel padiglione auricolare (carattere mai riscontrato nelle donne). Sono tutti casi dubbi perché estremamente rari e quindi studiati con difficoltà: la genetica permette lo studio dei caratteri quando se ne ha una trasmissione relativamente importante.~~

~~Tuttavia, in linea teorica questo tipo di eredità esiste.~~

~~Si può poi avere digametia femminile che è tipica di molti uccelli, come per esempio dei polli, dove il maschio ha due cromosomi uguali e quindi fa un solo tipo di gamete (per il cromosoma~~

sessuale) mentre la **femminina** può essere **XO** oppure **XW** (può avere due cromosomi diversi). Nella denominazione di questi cromosomi non c'è nessuna connessione con la loro morfologia.

Ancora una volta possiamo avere un'eredità **Z-linked** (caratteri legati al cromosoma Z) e quindi avere un'eredità **DIANDRICA**, cioè trasmessa attraverso il maschio ed un'eredità **OLOGINICA**, cioè caratteri che si riscontrano **solo nelle femmine** ed in effetti nei polli si osserva questo tipo di eredità e quindi c'è la possibilità che il cromosoma W porti dei geni.

Di vari tipi di modalità di determinare il sesso e quindi di avere caratteri sui cromosomi "sessuali", ci occuperemo soltanto dell'eredità diaginica perché la maggior parte dei mammiferi, incluso l'uomo, mostrano questo tipo di ereditarietà, come pure molti insetti, come la drosofila, che sono stati oggetto degli studi di genetica.

Perciò, è il tipo di eredità legata al sesso che viene maggiormente studiata (poche specie presentano la digametia femminile e quindi non è molto studiata).

Si ricorda che quando si parla di cromosomi coinvolti nella determinazione del sesso si parla di **cromosomi "sessuali"**; gli altri cromosomi sono definiti **"autosomici"**.

Quindi in un **cariotipo** di qualunque specie si distinguono una serie di **cromosomi autosomici** (che non concorrono alla determinazione del sesso) ed una **coppia o un singolo cromosoma** che vengono definiti **cromosomi "sessuali"**.

È interessante notare che esiste un comportamento diverso nella determinazione del sesso in drosofila, nella quale è stata studiata inizialmente, e nell'uomo pur essendo in entrambi i casi cromosomi di tipo X Y. La differenza consiste nel fatto che la **determinazione del sesso** nella specie uomo è data dalla presenza del **cromosoma Y**. Tutte le volte cioè che in un **cariotipo** compare il cromosoma Y siamo di fronte ad un **cariotipo maschile "normale"** (rispetto alla frequenza con cui si presenta) se i cromosomi sessuali sono **X Y**, **patologico** se i cromosomi sessuali sono **X X Y**. Comunque, la presenza del cromosoma Y determina un individuo di sesso maschile (con fenotipo più o meno fisiologico, ma maschio). Il **cromosoma Y della specie uomo** porta tutti i geni che contribuiscono alla determinazione dei **caratteri sessuali secondari**.

Al di là di quanto citato (caratteri sessuali secondari, qualche esempio dubbio e qualche gene che interagisce con la X ma sempre per la determinazione del sesso), il **cromosoma Y** si può considerare **pressoché vuoto**, cioè il suo DNA è quasi tutto **eterocromatico** cioè formato da cromatina condensata che non viene mai trascritta. Quindi si può considerare la Y **priva di tratti codificanti**.

Per quanto riguarda invece la determinazione del sesso femminile, questo è dato proprio dalla **presenza di una doppia X** (e dall'assenza della Y); ma il fatto che ci sia X X non è una condizione sufficiente per avere il sesso femminile. Così come la presenza di una sola X, patologica, non è una condizione sufficiente per NON essere femmina; un **individuo patologicamente XO** ed una **donna XX** sono **entrambe di sesso femminile**: in un caso avremo un **cariotipo patologico** (sindrome di Turner), nell'altro avremo un **cariotipo fisiologico** ma in **entrambi i casi avremo sesso femminile** (a riprova che la presenza della Y determina il sesso). ←

X e Y non sono cromosomi omologhi ed i geni non sono probabilmente legati stessi loci.

Il cromosoma X porta tutti i geni che determinano i caratteri sessuali ~~sessuali~~ femminili ed inoltre tutta una serie di geni che non sono presenti sulla Y: per esempio quello che determina la **coagulazione** del sangue, quello che determina l'**assorbimento** corretto della **vitamina D**, quello che determina la **visione dei colori**, e tanti altri. Questa è una condizione particolare perché fa sì che il **maschio X-Y** non possa mai essere né omozigote né eterozigote per i geni portati dai cromosomi sessuali, in quanto non ha mai l'equivalente sull'altro cromosoma. Per questo il **maschio** viene definito "**emizigote**". Dal punto di vista ereditario ciò ha come conseguenza che nel maschio i **caratteri recessivi sono immediatamente manifesti** perché il rapporto tra gli alleli è dato dalla presenza di una doppia dose, ed un carattere recessivo può essere mascherato da uno dominante che si trovi sull'altro cromosoma (infatti un carattere recessivo si manifesta solo se omozigote).

Per i caratteri **X-linked** nel maschio manca il "locus" (il tratto di DNA) corrispondente e si ha un solo allele; ciò porta alla **visibilità immediata dei caratteri recessivi**. Ciò può portare all'errata convinzione che determinate caratteristiche, o meglio **patologie X-linked** si manifestino solo nei maschi. In effetti, perché nella donna si manifesti una malattia **X-linked**, si deve avere una **omozigosi**, cioè una doppia dose che derivi da una **madre portatrice** e da un **padre malato**. Perché si abbia un **uomo con quel carattere** (spesso una malattia), sarà sufficiente che la **madre sia portatrice**. Quindi, a livello della popolazione, sarà **più frequente** che una **madre eterozigote partorisca un figlio** con quel carattere piuttosto che ci sia l'incontro di due persone di cui una **affetta ed una portatrice**. Perciò, nelle donne è più raro che si verifichi l'espressione di caratteri X-linked.

Vediamo ora come vengono trasmessi questi caratteri facendo vari esempi, ricordando che il **maschio** è un **emizigote** e quindi manifesta subito il carattere. Per la specie uomo si dà per scontato che i caratteri ai quali ci riferiamo diano quasi sempre patologie (**emofilia, malassorbimento** della **vitamina D** con rachitismo congenito, mancanza di glucosio-6-fosfato deidrogenasi -G6PD- la cui mancanza determina il **favismo**, il **daltonismo X-linked**, ecc.); in molti altri animali non c'è questo legame con la patologia per cui in generale si dovrebbero usare i termini eterozigote ed omozigote (per la drosophila avere il corpo giallo, carattere X-linked, piuttosto che marrone, che è l'alternativa, non crea certo problemi).

Possibili matrimoni in una popolazione casuale relativamente al Daltonismo (indicato con c; cioè "**ceca ai colori**"; quasi sempre nella specie uomo si tratta di caratteri recessivi ad eccezione del rachitismo congenito):

1) **maschio affetto X^c Y** x **donna sana X X^C**

| | | | |
|----------------|--|--|--|
| | | X ^C | |
| X ^c | | X ^c X ^C (port.) | X ^C X ^C (port.) |
| Y | | X ^c Y (sano) | X ^C Y (sano) |

Tutti sani

Handwritten diagram showing the inheritance of X chromosomes:
 X^c X^C X^c X^C
 Y X^C Y X^C Y

* Alleli di uno stesso gene occupano lo stesso cromosoma.

la madre farà un solo tipo di gameti con C (nel quadrato si deve scrivere una sola colonna perché la donna fa un solo tipo di gameti). Si avranno **maschi sani** e **femmine portatrici**, il **maschio affetto** non trasmette il carattere al figlio in quanto gli trasmette la Y.

2) **maschio sano** x **donna portatrice**

| | | |
|-------|--------------------|----------------------------|
| | X^C | X^c |
| X^C | $^CXX^C$ (sana) | $^cXX^c$ (port.) |
| Y | CXY (sano) | cXY (maschio malato) |

50% sano
25% port
25% maschi (do maschi)

in questo caso il padre farà due tipi di gameti, uno con la X^C ed uno con la Y, e la madre farà due tipi di gameti, uno X^C ed uno X^c . Avremo **donne sane**, omozigoti C, **donne portatrici** come la madre, **maschi daltonici** e **maschi sani**. Quindi la mamma trasmette la malattia e viene chiamata **eredità "diaginica"** perché passa attraverso la donna, che per altro è sana. Dal matrimonio precedente abbiamo visto nascere donne portatrici: un padre affetto dà il carattere alla figlia femmina che però non lo mostra; la figlia femmina lo passa al figlio maschio che lo mostra. Quindi è un'eredità che salta una generazione e passa attraverso le femmine e ritorna ai maschi. Perciò questo tipo di eredità è detta anche a "zig zag" (maschio | femmina) maschio).

3) **maschio affetto** x **donna portatrice**

La madre fa ancora due tipi di gameti, uno X^C ed uno X^c ; il padre fa due tipi di gameti, uno X^c ed uno Y.

| | | |
|-------|---------------------|----------------------|
| | X^C | X^c |
| X^c | $^cXX^C$ (port.) | $^cXX^c$ (malata) |
| Y | cXY (sano) | cXY (malato) |

Per la progenie di sesso femminile avremo:

- $\frac{1}{2}$ **donne malate** ed $\frac{1}{2}$ **portatrici**,

e per quella maschile:

- $\frac{1}{2}$ **maschi malati** ed $\frac{1}{2}$ **maschi sani**.

Quindi perché da un matrimonio nascano donne malate devono essere rispettate **due condizioni**: una **padre malato** ed una **madre portatrice**. Perciò le donne malate sono meno numerose nella popolazione. (che è più raro e eredit.)

Infine, ricordiamo che quando si vuole fare un calcolo della **probabilità** su un **carattere X-linked**, o si prende in considerazione **tutta la progenie** oppure si **divide per sesso**: perciò si può dire che le **donne affette** sono $\frac{1}{4}$ della **progenie** o sono $\frac{1}{2}$ delle **femmine**.

$X^c X^c$ $X^c X^c$ $X^c X^c$ $X^c X^c$ $X^c X^c$
 Y $X^c Y$ $X^c Y$

Lezione 26 (24/04)

Abbiamo fatto alcuni esempi di matrimoni tra persone affette o portatrici di caratteri posti sulla X. Avevamo specificato che usiamo i termini "affetto", "portatore" o "sano", esclusivamente per l'uomo, perché la maggioranza dei caratteri posti sulla X si rivela determinare malattie.

Questo non vuol dire che tutti i caratteri portati dalla X in tutti gli animali o in tutti gli organismi determinino malattie (il carattere occhi bianchi o occhi rossi in drosophila è X-linked e non determina alcuna affezione particolare) ed in generale sarebbe meglio parlare di omozigote ed eterozigote; tuttavia, diamo più importanza all'uomo, utilizzando per questo i termini sopracitati.

La seguente tabella riassume i possibili matrimoni dei quali abbiamo parlato.

| | ♀ sana | ♀ portatrice | ♀ affetta |
|-----------|------------------------------------|--|---------------------------------------|
| ♂ sano | ♂ e ♀ sani (100%) | ♂ sani (25%) ♂ affetti (25%) ♀ sane (25%) ♀ portatrici (25%) | ♂ affetti (50%) ♀ portatrici (50%) |
| ♂ affetto | ♂ sani (50%) ♀ portatrici (50%) | ♂ sani (25%) ♂ affetti (25%) ♀ portatrici (25%) ♀ affette (25%) | ♂ e ♀ affetti (100%) |

Per quanto riguarda le donne i genotipi ed i fenotipi sono 3 mentre per l'uomo sono soltanto 2. Questo perché il maschio è un emizigote, cioè avendo un solo cromosoma X non potrà essere né eterozigote né omozigote e sarà sano se porta l'allele che non determina la malattia, o affetto se porta quello che determina la malattia.

- Un matrimonio tra un uomo sano ed una donna sana, cioè omozigote per l'allele normale ci darà ovviamente tutti figli sani.
- Tra un maschio sano ed una donna portatrice, cioè eterozigote, si avranno maschi e femmine sane, maschi affetti e femmine portatrici (da questo matrimonio non nasceranno femmine affette).
- Tra maschio sano e femmina affetta avremo 50% di femmine portatrici e 50% di maschi affetti. Questo perché il maschio prende la X dalla madre e se questa porta due X entrambe con il carattere che determina la malattia, i maschi possono essere solo affetti.
- Tra maschio affetto e donna sana avremo femmine portatrici e maschi sani. Questo è il matrimonio che ci fa dire che l'eredità è diagenica perché saranno queste figlie a dare il maschio affetto; il carattere non passa da padre in figlio ma da nonno a nipote.
- Tra maschio affetto e femmine portatrici avremo maschi e femmine affetti (25% ciascuno), maschi sani e femmine portatrici.
- Tra un maschio affetto ed una femmina affetta (matrimonio raro) avremo tutti i figli affetti.

Di tutti i matrimoni, 2 (di cui uno veramente molto raro) su 6 danno femmine affette e questo rende conto della minor frequenza delle femmine affette rispetto ai maschi che possono nascere da ben 4.

* $X^c X^c$ $X^c Y$ $X^c X^c$ $X^c Y$

matrimoni su 6. Ciò fa sì che nella popolazione i maschi malati abbiano una frequenza maggiore rispetto alle donne. D'altra parte è difficile che in un'ampia popolazione si verifichi un matrimonio tra maschio affetto e donna eterozigote. Se studiamo l'albero genealogico di una certa famiglia nella quale non vi sono stati matrimoni tra consanguinei, è molto probabile che nella sua storia si trovino più maschi affetti che femmine, proprio perché il matrimonio rispecchia la situazione della popolazione normale.

Il termine "pseudo dominanza" vuole dire che nel maschio, mancando l'altro cromosoma X, il carattere recessivo si manifesta immediatamente non essendo mascherato dall'allele dominante; quindi, il carattere recessivo si evidenzia anche in singola dose.

Corpo di barr.

Esiste la possibilità di regolare l'espressione del DNA (perché non codifichi per determinate proteine), attraverso l'eterocromatinizzazione, cioè la condensazione della cromatina che porta alla sua mancata espressione (eterocromatina facoltativa). Espressione di questa possibilità si trova nei mammiferi dove una delle X della femmina si eterocromatinizza per creare un "compenso di dose". Tale meccanismo, ipotizzato da Mary Lyon (per cui si dice anche "lionizzazione"), si attua per compensare la doppia dose che le femmine di quasi tutti i mammiferi avrebbero.

Infatti, esistono molte caratteristiche non legate al sesso codificate da geni localizzati sulla X, come per esempio la produzione di enzimi (come la G-6-PD). Per questi caratteri, escludendo quindi quelli che servono alla determinazione del sesso (per i quali è evidente che ci deve essere una differenza tra maschio e femmina), se entrambi gli alleli funzionassero la femmina avrebbe una doppia dose di prodotto.

Perciò interviene il fenomeno dell'eterocromatinizzazione per cui, a caso, una delle due X si condensa e non codifica più (solo per i caratteri che non hanno nulla a che vedere con la determinazione del sesso). In questo modo, la femmina ha la stessa dose di prodotto che ha il maschio. Ovviamente, questo non vuol dire che la femmina diventi "emizigote" perché, dato che la condensazione avviene a caso nelle linee cellulari, in alcune cellule sarà condensato il cromosoma X paterno ed in altre quello materno; quindi la donna avrà un clone di cellule nel quale è espresso per esempio l'allele "A" ed un altro clone nel quale è espresso "a"; perciò a livello di prodotto la donna è sempre eterozigote (naturalmente le due X sono regolarmente duplicate durante il ciclo cellulare, prendono normalmente parte alla formazione dei gameti e sono trasmesse separatamente alla progenie come abbiamo visto). Quindi, l'eterocromatinizzazione riguarda l'espressione del DNA e non la sua trasmissione.

Una prova che questo meccanismo si attua anche negli altri animali è non solo nell'uomo è data dal gatto calico: la femmina presenta un manto a 3 colori, bianco, nero e rossiccio, mentre il maschio è sempre di uno o al massimo due colori. Infatti, il colore rosso è legato alla X e solo nelle femmine si verifica l'espressione a macchie dovuta al fatto che in alcuni gruppi di cellule si eterocromatinizza una X; per esempio quella del colore rosso e quindi si esprime il nero, ed in un altro gruppo di cellule avviene il contrario per cui viene fuori la macchia rossa. Perciò, il maschio non avrà mai mescolati insieme i tre colori.

matrimoni su 6. Ciò fa sì che nella popolazione i maschi malati abbiano una frequenza maggiore rispetto alle donne. D'altra parte è difficile che in un'ampia popolazione si verifichi un matrimonio tra maschio affetto e donna eterozigote. Se studiamo l'albero genealogico di una certa famiglia nella quale non vi sono stati matrimoni tra consanguinei, è molto probabile che nella sua storia si trovino più maschi affetti che femmine, proprio perché il matrimonio rispecchia la situazione della popolazione normale.

Il termine "pseudo dominanza" vuole dire che nel maschio, mancando l'altro cromosoma X, il carattere recessivo si manifesta immediatamente non essendo mascherato dall'allele dominante, quindi, il carattere recessivo si evidenzia anche in singola dose.

Corpo di Barr.

Esiste la possibilità di regolare l'espressione del DNA (perché non codifichi per determinate proteine), attraverso l'eterocromatinizzazione, cioè la condensazione della cromatina che porta alla sua mancata espressione (eterocromatina facoltativa). Espressione di questa possibilità si trova nei mammiferi dove una delle X della femmina si eterocromatinizza per creare un "compenso di dose". Tale meccanismo, ipotizzato da Mary Lyon (per cui si dice anche "lionizzazione"), si attua per compensare la doppia dose che le femmine di quasi tutti i mammiferi avrebbero.

Infatti, esistono molte caratteristiche non legate al sesso codificate da geni localizzati sulla X, come per esempio la produzione di enzimi (come la G-6-PD). Per questi caratteri, escludendo quindi quelli che servono alla determinazione del sesso (per i quali è evidente che ci deve essere una differenza tra maschio e femmina), se entrambi gli alleli funzionassero la femmina avrebbe una doppia dose di prodotto.

Perciò interviene il fenomeno dell'eterocromatinizzazione per cui, a caso, una delle due X si condensa e non codifica più (solo per i caratteri che non hanno nulla a che vedere con la determinazione del sesso). In questo modo, la femmina ha la stessa dose di prodotto che ha il maschio. Ovviamente, questo non vuol dire che la femmina diventi "emizigote" perché, dato che la condensazione avviene a caso nelle linee cellulari, in alcune cellule sarà condensato il cromosoma X paterno ed in altre quello materno; quindi la donna avrà un clone di cellule nel quale è espresso per esempio l'allele "A" ed un altro clone nel quale è espresso "a"; perciò a livello di prodotto la donna è sempre eterozigote (naturalmente le due X sono regolarmente duplicate durante il ciclo cellulare, prendono normalmente parte alla formazione dei gameti e sono trasmesse separatamente alla progenie come abbiamo visto). Quindi, l'eterocromatinizzazione riguarda l'espressione del DNA e non la sua trasmissione.

Una prova che questo meccanismo si attua anche negli altri animali è non solo nell'uomo e data dal gatto calico: la femmina presenta un manto a 3 colori, bianco, nero e rossiccio, mentre il maschio è sempre di uno o al massimo due colori. Infatti, il colore rosso è legato alla X e solo nelle femmine si verifica l'espressione a macchie dovuta al fatto che in alcuni gruppi di cellule si eterocromatinizza una X, per esempio quella del colore rosso e quindi si esprime il nero, ed in un altro gruppo di cellule avviene il contrario per cui viene fuori la macchia rossa. Perciò, il maschio non avrà mai mescolati insieme i tre colori.

Inoltre, è bene precisare che finora abbiamo parlato di caratteri legati al sesso (in particolare X-linked), ma non si può ignorare che ci sono anche caratteri **LIMITATI** dal sesso. Ciò avviene tutte le volte in cui l'espressione del carattere è influenzata dal sesso.

Un esempio chiaro è la **calvizie**, carattere genetico che si eredita teoricamente, ci si dovrebbe aspettare anche **figlie femmine calve**, che in realtà sono meno frequenti.

Questo perché l'allele per la calvizie si comporta diversamente nei maschi e nelle femmine (influenzato in questo caso anche dagli ormoni). In pratica, **lo stesso allele nei maschi si comporta come dominante e nelle femmine come recessivo**. Così nei maschi è sufficiente una singola dose per essere calvi mentre nelle femmine occorre una doppia dose (cioè giustifica la minor frequenza).

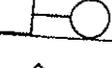
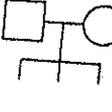
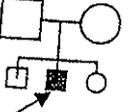
Un altro esempio è rappresentato dalle corna delle pecore Dorset che hanno un'espressione dominante nei maschi e recessiva nelle femmine.

Per ciò non si deve far confusione tra **carattere legato al sesso**, che è quello che si esprime allo stesso modo nei maschi e nelle femmine ma ha una diversa frequenza per motivi di distribuzione, e **carattere limitato dal sesso**, in cui l'espressione degli alleli è diversa.

Alberi genealogici o pedigree.

Questo termine indica il seguire la storia di una persona sulla base della **storia familiare**, costruendola in uno schema. Ciò è indispensabile tutte le volte che si voglia fare una previsione sulla trasmissione di un certo carattere. Infatti, quando si rivolgono ad un consultorio genetico le coppie che hanno notizia di una certa patologia nella famiglia e vogliono sapere che rischio abbiano di mettere al mondo un figlio affetto da quella patologia, è necessario ricostruire, per quanto possibile, la loro storia familiare per vedere che tipo di trasmissione può verificarsi (un carattere X-linked nel maschio da fenotipi non corrispondenti alle leggi di Mendel perché c'è l'emizigosi).

Per fare un albero genealogico si ricorre alla seguente schematizzazione per simboli:

| | | | | | |
|--|--|---|--|---|--|
|  | = maschio; |  | = femmina |  | = matrimonio |
|  | = matrimonio tra consanguinei |  | = discendenza (i figli sono indicati in ordine di nascita) |  | = sesso non determinato (bambino non ancora nato, aborti, persone nella storia familiare di cui non si ha memoria) |
|  | = gemelli dizigotici |  | = gemelli monozigotici |  | = individui affetti |
|  | = eterozigoti per un gene autosomico recessivo |  | = portatrice di un gene recessivo legato al sesso |  | = morte |
|  | = aborto o nato morto (sesso non determinato) |  | = probando individuo dal quale partiamo, che ci interessa |  | = il probando è il bambino 2 della II generazione (o II-2) |

Le generazioni si indicano con numeri romani (I, II, III generazione) ed il numero di individui che sono in quell'albero sono indicati con i numeri arabi; quindi le persone dell'albero possono essere indicate, per esempio, come II-3, cioè l'individuo della seconda

generazione numerato con il 3. Ricordiamo che, per brevità, quando non è necessario l'ordine di nascita dei figli ma solo quanti figli di un certo tipo ci sono in quella famiglia, si può indicare il simbolo con dentro il numero che si riferisce al n° di figli di quel sesso:

| | |
|--|---|
| | <p>Da questa coppia sono nati 6 figli, due maschi e 4 femmine.</p> |
| | <p>Da questa coppia sono nati due maschi sani, 2 femmine sane ed una femmina affetta.</p> |

L'ordine di nascita ha scarsa importanza, cioè dire che un figlio è il 2 o il 3, perché la meiosi si ripropone "ex-novo" tutte le volte e ad ogni fecondazione si hanno le stesse probabilità e gli stessi rischi che alla prima. Per esempio, se una coppia ha una probabilità $\frac{1}{4}$ di trasmettere una data malattia, questa è uguale ad ogni gravidanza e avere già avuto un figlio con quel carattere non esclude che il secondo figlio non porti quel carattere.

Trasmissione di un carattere autosomico (non legato al sesso) recessivo: l'albinismo*

L'albinismo è la mancanza di pigmento della cute, dei capelli e dei peli, dell'iride (colore degli occhi). Può colpire anche persone di colore, con conseguenze culturali opposte: a volte vengono considerati discendenti diretti della divinità, a volte sono viste come demoni per la loro diversità (un albino crea minor turbamento in una popolazione bianca che in una nera).

Esistono diverse forme di albinismo, legate a più geni; si prende in considerazione quello più semplice che è l'autosomico recessivo.

| | |
|--|--|
| | <p>Da un maschio affetto che sposa una donna fenotipicamente non albina (potrebbe essere eterozigote!) nascono 4 figli: 2 maschi, 1 femmina ed 1 del quale non conosciamo il sesso, tutti sani.</p> <p>Nell'altra famiglia abbiamo due persone fenotipicamente non albine; nascono 6 figli di cui 2 gemelli dizigotici femmine, affette.</p> |
|--|--|

Dal matrimonio di II-4 e II-5, appartenenti a famiglie diverse nelle quali ci sono casi di albinismo, nascono 7 figli di cui 2 affetti.

Si può stabilire che è un carattere **autosomico recessivo** dalle seguenti osservazioni:

N.B. la femmine può essere affetta solo se il maschio (padre) è malato (omozigote) 123

autosomico in quanto è un carattere che si esprime indifferentemente nei maschi e nelle femmine; in appena 3 generazioni si vedono femmine affette e, soprattutto, sono figlie di padri affetti;

e, se la frequenza è uguale (tra maschi e femmine), ciò deve subito far pensare al fatto che il carattere non sia X-linked.

Però, se si devono individuare subito le femmine, ^{affetto} vedere come è il loro padre: se il padre non ha il carattere e, soprattutto, se non lo mostra nemmeno la madre, si può subito stabilire che il carattere non è X-linked. Perché si è detto "soprattutto non lo mostra anche la madre"?

Perché se molto raramente, potrebbe trattarsi di un carattere dominante legato alla X (sono i casi di emofilia); se fosse dominante, infatti, la madre potrebbe aver passato alla figlia la X con il gene affetto, perciò, possiamo dire che se i due genitori sono sani è impossibile parlare di carattere autosomico.

Se il carattere è recessivo, anche il padre dovrebbe essere affetto;

Se il carattere è dominante, dovrebbe essere affetta la madre.

Il carattere sia recessivo si stabilisce per due motivi:

1. Se i due genitori sani hanno un figlio affetto;

2. Se una madre affetta NON ha figli affetti (attenzione a dire che il recessivo non si mostra a tutte le generazioni perché in questo esempio non è vero).

È importante notare che se due genitori sani hanno un figlio affetto, quel carattere è recessivo.

Per parlare di malattie dominanti si usa dire che se i genitori sono sani non possono nascere figli affetti. Per completezza va specificato che si possono verificare le "new mutations" cioè delle mutazioni (cambiamenti nel DNA) "ex novo" che insorgono durante la vita.

Un esempio fatto sulla trasmissione di un carattere autosomico recessivo, è possibile calcolare la frequenza della nascita di un altro bambino albino in questa famiglia. Partendo dal fatto che i genitori sono entrambi eterozigoti (per avere due figli "a/a" entrambi i genitori devono portare il gene "A/a", la frequenza con la quale può nascere un figlio "a/a" è $\frac{1}{4}$).

Conosciamo alcuni caratteri monofattoriali (un singolo gene) semplici (ad andamento mendeliano) che si trasmettono secondo leggi di Mendel, dei quali alcuni con grande frequenza: la talassemia o morbo di Couley o anemia mediterranea (da *ταλασσο* = mare, sviluppata lungo il bacino del Mediterraneo), che è la mancanza di una catena β nella emoglobina da cui un mal funzionamento della proteina. Studi italiani (Silvestroni e colleghi) hanno dimostrato che la talassemia è correlata alle zone malariche con una sopravvivenza di eterozigoti che quindi trasmettono la malattia; è quindi una malattia autosomica recessiva che si trasmette con la frequenza su citata. È diffusa nelle ex zone malariche, Sicilia, Valle del Po, Puglia, regioni nelle quali è presente una numerosa popolazione di portatori della malattia (la malaria), per cui c'è una grande frequenza di matrimoni tra eterozigoti. Anche la mucoviscidosi è una malattia ereditaria monofattoriale autosomica recessiva.

Autosomi - 2 -

Trasmissione di un carattere autosomico dominante: il carattere "capelli lanosi" (capelli con l'aspetto della lana, ispidi, gonfi).

L'albero genealogico ci mostra subito che è un carattere dominante perché non salta mai una generazione cioè è estremamente presente. Si devono tenere presenti due concetti:

- la presenza in tutte le generazioni
- i matrimoni tra NON consanguinei

Infatti, se si ammettesse che questo fosse un carattere recessivo (anche nell'altro caso abbiamo visto non saltare nessuna generazione), vi sarebbero un certo numero di matrimoni (per esempio 5 o 6) da cercare nell'albero genealogico, con persone **ESTRANEE** alla famiglia che dovrebbero essere tutti portatori. In pratica bisognerebbe ammettere che un numero importante di persone estranee alla famiglia (questo è importante), sia **portatrice**. Ciò fa escludere che il carattere sia recessivo più del fatto che compaia ad ogni generazione perché, essendo comunque caratteri abbastanza rari è altamente improbabile che tutte le persone affette di quella famiglia abbiano incontrato estranei portatori; **in mancanza di altre indicazioni** (importantissimo), le persone estranee alla famiglia devono essere considerate omozigoti sani. Quindi si determina che è un carattere dominante.

Per determinare se è un carattere **autosomico**, si cerca un **matrimonio tra una femmina sana ed un maschio malato**: in questo caso è impossibile che un maschio affetto trasmetta la malattia al figlio (il padre trasmette al figlio la Y) e ciò fa escludere che sia un carattere X-linked. Il carattere autosomico dominante si trasmette con una probabilità $\frac{1}{2}$: è bene fare l'analisi su un campione ampio, esaminando tutti i figli di una generazione per valutare che questo atteso sia rispettato.

Nell'uomo un esempio di carattere ereditario autosomico dominante è il **prognatismo asburgico** (malocclusione di 3a classe). La **condroplasia** (nanismo disarmonico), una sproporzione tra gli arti ed il corpo in quanto viene bloccata la crescita delle ossa lunghe e non di quelle piatte (testa normale ed arti piccoli), è un carattere autosomico dominante la cui frequenza è dovuta alle "new mutation".

Trasmissione di un carattere X-linked recessivo: l'emofilia.

Osserviamo l'albero genealogico delle famiglie regnanti europee: dalla regina Vittoria d'Inghilterra, eterozigote (portatrice) dell'emofilia, la malattia si è diffusa nelle Case Regnanti di tutta Europa; attraverso i frequenti matrimoni tra consanguinei. Per esempio si è diffusa in Russia, colpendo l'ultimo zarevic Alessio (da cui il grande potere di Rasputin che faceva credere alla zarina di poter curare il figlio), in Spagna, in Prussia. L'emofilia è un carattere recessivo che però dimostra come i matrimoni tra consanguinei possano portare ad una rapida espansione.

Si può capire che è un carattere X-linked dal fatto che si trovano dei **matrimoni tipici** in cui un **maschio affetto** ha due figli entrambi **sani** ma la **figlia femmina** ha successivamente **due figli maschi entrambi affetti**. Questo è un tipico caso di trasmissione **diagnica** o a "zig zag", cioè da un maschio la malattia passa attraverso la femmina e ritorna nel maschio. Un'altra indicazione che ci dice che è un carattere X-linked è che una donna sana ha due maschi affetti.

Inoltre, dando uno sguardo d'insieme alla **progenie**, si vede che, pur essendo una famiglia enorme con molti matrimoni tra consanguinei, c'è una **decisa maggioranza di maschi affetti**.

Ciò al primo impatto ci dà l'idea che sia un carattere X-linked per la sproporzione degli affetti di sesso maschile; subito dopo si cerca il matrimonio rivelatore, cercando un nonno che abbia nipoti affetti ma figli sani. Si ricorda che nell'uomo sono caratteri recessivi X-linked il daltonismo, l'enzimopenia della G-6-PD ed un caso di albinismo.

Trasmissione di un carattere X-linked dominante: ^{il allele che trasmette è dominante} **formazione difettosa dello smalto** e di conseguenza una non corretta conformazione delle arcate dentarie (molti caratteri legati ai denti sono ereditari).

Si determina che è dominante e X-linked perché c'è una **trasmissione femmina/femmina** molto frequente e ciò dimostra che il carattere è dominante. Inoltre, la **presenza di un maschio malato con tutti i figli maschi sani e tutte le figlie femmine malate** dimostra che il carattere è X-linked (se fosse autosomico si avrebbero anche maschi malati).

La **dominanza** si evidenzia dal fatto che le femmine lo trasmettono immediatamente alle femmine, pur avendo mariti non affetti.

Nell'uomo, un altro carattere dominante X-linked è il **rachitismo congenito**, cioè un'incapacità ad assimilare la vitamina D, anche se somministrata, dando luogo ad una patologia che si determina fin dalla nascita ed è resistente alle cure.

Lezione 27 (26/04)

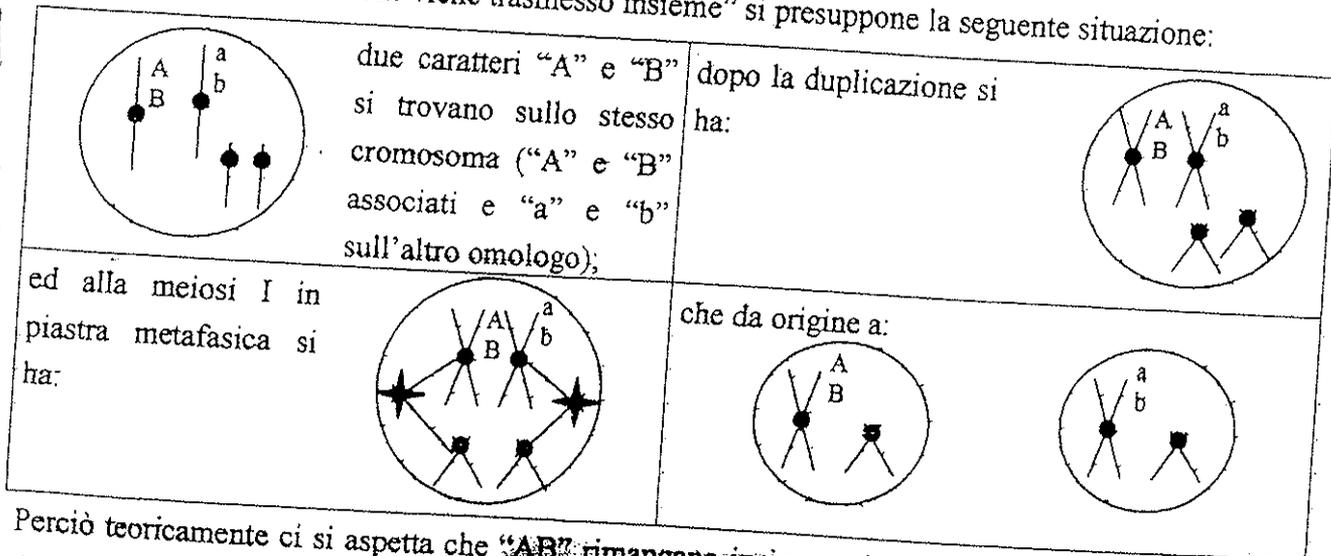
La scorsa lezione abbiamo esaminato la trasmissione di caratteri monofattoriali semplici cioè che riguardano un singolo gene con forme alternative (alleli) e senza alcun coinvolgimento dell'ambiente (definiremo più avanti cosa si intende per ambiente).

La trasmissione di questi caratteri risponde alle leggi mendeliane e quindi ha un'origine strettamente genetica.

Quando abbiamo parlato di **due caratteri**, di due o più geni, abbiamo fatto riferimento alla **seconda legge di Mendel**, parlando di caratteri indipendenti. Ora si può immaginare che **non tutti i caratteri possano essere indipendenti tra loro**, visto che per caratteri indipendenti si intende che siano su **cromosomi diversi**: infatti, l'unico modo per cui due caratteri possano comportarsi indipendentemente l'uno dall'altro è che siano posti su cromosomi diversi che **segregano in maniera indipendente alla meiosi**. Avevamo anche visto che se si prendono in esame due geni che siano indipendenti (posti su cromosomi diversi), durante la meiosi si formano **4 tipi di gameti** con diverse combinazioni che sono proprio dovute all'assortimento casuale dei cromosomi in piastra metafase.

Tuttavia fin dall'inizio degli studi, specialmente quelli fatti su drosofila dove ci sono una grande varietà di caratteri alternativi, si era intuito che **non tutti i caratteri potevano trovarsi su singoli cromosomi** (singoli caratteri su singoli cromosomi) perché il numero dei cromosomi non corrispondeva al grande numero di geni che ormai erano noti. Frequentemente si vedevano delle trasmissioni non di tipo mendeliano e la grande scommessa dei Ricercatori era quella di scoprire cose succedesse quando i **caratteri erano associati**, cioè non erano posti su cromosomi diversi. Teoricamente, quando due caratteri sono **associati**, cioè si trovano **insieme su uno stesso cromosoma**, dovrebbero essere ereditati e trasmessi insieme; in realtà questo non si riscontrava mai negli esperimenti, dai quali risultavano rapporti "strani" per cui non si riusciva a comprendere con chiarezza che cosa accadesse.

Per "carattere associato che viene trasmesso insieme" si presuppone la seguente situazione:



Perciò teoricamente ci si aspetta che **"AB" rimangano insieme e "ab" rimangano insieme** e quindi due tipi di gameti equifrequenti con "AB" ed "ab" con **frequenza 50%**.

In alternativa, se i geni fossero indipendenti, ci si attenderebbero 4 tipi di gameti anch'essi **equifrequenti** (frequenza del 25%), cioè "AB", "ab", "Ab" e "aB".

Tuttavia negli esperimenti si riscontravano **due classi molto più frequenti** di altre due classi; quindi si ritrovavano 4 tipi di gameti ma con frequenze diverse. Perciò, i geni non risultavano secondo l'atteso teorico nè associati nè indipendenti secondo le leggi di Mendel.

Le due classi più frequenti variavano a seconda del tipo di incrocio (a seconda di come era la classe parentale), mentre la frequenza delle classi a minor frequenza variava a seconda dei geni presi in considerazione. Morgan aveva effettuato i seguenti incroci su drosofila, partendo sempre da omozigoti (le linee pure di Mendel):

- si aveva il **maschio** completamente **dominante** e con caratteristiche **selvatiche** che in questo caso riguardavano il **colore degli occhi** (Pr = purple) e la **struttura delle ali** (Vg = vestigiali, cioè ridotte), mentre la **femmina** era **doppio recessivo** (mutato);
- un secondo tipo di incrocio prevedeva un **rapporto invertito** cioè il maschio era selvatico per un carattere e recessivo per l'altro mentre la femmina aveva il rapporto invertito, cioè era recessiva per il primo carattere e selvatica per il secondo carattere.

In pratica i geni erano gli stessi ma i due incroci parentali erano diversi.

I risultati (alla F2) furono identici per quanto riguardava le frequenze dei gameti ma erano invertiti per quanto riguardava il tipo di classe:

- nel primo caso, le due classi più frequenti furono **tutto selvatico** o tutto mutato,
- nel secondo caso le due classi più frequenti furono **selvatico** per un **carattere mutato** per l'altro e viceversa.

Morgan aveva notato che le **classi più frequenti** erano sempre le **classi cosiddette "parentali"**, cioè le stesse combinazioni di geni che si trovavano in partenza nell'incrocio parentale (il primo incrocio fatto), mentre le **due classi la cui frequenza era minore**, che vennero chiamate "**ricombinanti**" perché presentavano una combinazione di geni che non era quella iniziale, rimaneva costante anche se era invertita, cioè in dipendenza di quello che era l'incrocio parentale.

Prendendo in osservazione altri geni, il risultato rimaneva lo stesso, cioè **classi parentali più frequenti** e **classi ricombinanti meno frequenti**, ma la frequenza di queste ultime variava a seconda dei geni presi in esame.

Sulla base di queste osservazioni (fatte numerose volte e su più geni diversi) Morgan arrivò alla seguenti conclusioni:

- i **geni** erano disposti **linearmente e costantemente sul cromosoma** (cosa che fino ad allora non era mai stata detta),
- in ogni individuo i geni si trovano **associati in gruppi** che corrispondono al numero **aploide** dei **cromosomi**, cioè se una specie ha come numero aploide 4, come la drosofila, si avranno tutti i geni raggruppati su questi 4 cromosomi. I **geni** che si trovano sullo stesso cromosoma saranno associati tra loro, mentre saranno **indipendenti** quelli che sono su cromosomi diversi.

Un'ulteriore conclusione, per spiegare i risultati di perdita di associazione, fu che dovevano avvenire scambi tra cromosomi omologhi.

Dato che precedentemente era stato osservato il "crossing-over" a livello citologico, si fece riferimento a quel momento, cioè si pensò che il "crossing-over" potesse proprio essere il momento in cui avvenisse lo scambio tra cromosomi omologhi.

Ma la % di ricombinazione, sempre uguale tra due geni, varia tra geni diversi e quindi si immaginò che la distanza tra i geni fosse coinvolta.

Con queste affermazioni si stabilisce che ciascun gene ha sul cromosoma un posto fisico e quindi si introduce il concetto di "locus" genico; inoltre, Morgan dovette necessariamente concludere che la **frequenza dei ricombinanti dipende dalla distanza tra i geni ed a questa direttamente correlata.**

Il fatto che la frequenza del "crossing-over" (dei ricombinanti), dipenda dalla distanza fra i geni non deve meravigliare: lo scambio avviene a livello dei cromatidi ed è dovuto ad una effettiva rottura del DNA e ad una sua ricombinazione cosiddetta "illegittima" (perché il DNA si ripara in maniera "errata"). Supponendo di avere due geni

| | |
|--|---|
| | <p>perché avvenga ricombinazione tra questi alleli si deve immaginare che in mezzo avvengano delle rotture del DNA</p> |
| | <p>Se si immaginano altri due geni A e C, se deve avvenire una rottura nel mezzo, avviene a livello di una sequenza di nucleotidi dei quali ognuno ha il proprio spazio fisico.</p> |

Una rottura che possa essere riparata, in maniera corretta o illegittima, deve avvenire tra un nucleotide e l'altro (sul legame fosfodiesterico); quindi, se nel primo caso si hanno, per esempio, 7 nucleotidi tra un gene e l'altro e nel secondo 10, si avrà un maggior numero di possibilità di rottura nel secondo caso rispetto al primo. Questo tipo di crossing-over è detto **intergenico**.

Esiste anche la possibilità che la rottura avvenga all'interno del gene, cioè sia **intragenico**; tuttavia questo è un evento che in molti casi non dà alcun risultato fenotipico perché molto spesso due alleli diversi si differenziano per un solo nucleotide, a volte per due. Perciò, molto spesso non si evidenzia nemmeno perché c'è un **piccolissimo scambio** in un punto ma rimane la stessa sequenza perché **non viene coinvolto il nucleotide diverso**. Qualche volta, il crossing-over intragenico può dare anche luogo alla combinazione di nuovi alleli: per esempio si parte da un eterozigote "Aa" e viene fuori un allele "A²", totalmente diverso perché la ricombinazione dei singoli nucleotidi può essere tale da dare luogo ad un altro allele. Questo però è un **fenomeno piuttosto raro**, < 1% il che vuol dire che nell'individuo si vede con una frequenza ancora più bassa (l'omozigote è 1% per 1%). Quindi il crossing-over intragenico avviene in natura ma con una frequenza talmente bassa che, pur potendo essere causa di variabilità genetica (può formare un nuovo allele), sperimentalmente non è detto che si riesca a vedere.

Continuiamo perciò a parlare di crossing-over intergenico (tra geni diversi) e prendiamo in esame la distanza tra un gene e l'altro: se è **maggiore**, si ha una maggiore quantità di possibili punti di rottura e di conseguenza una maggior % di crossing-over (di classi ricombinanti).

Handwritten notes:
 > la distanza tra i geni è direttamente proporzionale alla frequenza di ricombinazione
 > la frequenza di ricombinazione è direttamente proporzionale alla distanza tra i geni

L844RE

L'ipotesi di Morgan, cioè che i geni fossero disposti linearmente, che con il crossing-over si arrivasse a ricombinare gli alleli (cioè a cambiare la combinazione di partenza) e che, soprattutto, la frequenza della ricombinazione fosse dovuta alla **distanza fra i geni**, fu ripresa da un suo allievo, Sturtevant, che affermò che **la % di ricombinazione potesse essere utilizzata come indice di distanza per costruire delle mappe dei cromosomi**; in pratica, se è vero che i cromosomi hanno dei "loci" fisici, se è vero che sono messi uno dietro l'altro, se è vero che più sono lontani più ricombinano, è possibile costruire una mappa dei cromosomi e dire che su quel cromosoma ci sono quei geni, messi in quell'ordine e ad una certa distanza.

Per poter costruire queste mappe statistiche Sturtevant utilizzò un indice puramente teorico, un'unità di misura statistica, cioè che **l'1% dei ricombinanti** fossero da considerare **uguali ad una unità di mappa**. L'unità di mappa (u m), quindi, non è una misura fisica (1 cm, 1 mm, 1 Å) ma è una convenzione che dice che tra due geni che distano per esempio 20 unità di mappa ci si attende il 20% di ricombinazione e tra due geni che ricombinano per il 20% ci si attende che distino 20 unità di mappa. Ciò in assoluto non vuol dire nulla ma messo in relazione con altri geni può stabilire la sequenza dei geni: se per esempio ~~se~~ A e B ricombinano con una frequenza del 20%, vuol dire che distano 20 unità di mappa e se A e C distano 30 unità di mappa, si evince che viene prima A poi B, poi C e B e C distano 10 unità di mappa (è quindi un'unità di misura relativa). Ancora, se A e B distano 30 unità di mappa daranno il 30% di ricombinanti.

Quindi in un primo tempo il lavoro fatto è stato quello di **effettuare una serie di incroci per vedere quale potesse essere la distanza tra i geni su uno stesso cromosoma**.

Ovviamente non in tutti i casi si sapeva già che i geni erano su uno stesso cromosoma: molto spesso si scopriva che erano su cromosomi diversi. Veniva rispettata la seconda legge di Mendel (dell'indipendenza) e si poteva dedurre che due geni non erano associati; era quindi anche un modo per scoprire quali erano i geni associati e quali erano ricombinanti.

Sulla base della frequenza di ricombinazione è stato possibile costruire **le mappe genetiche statistiche**, cioè mappe che si basano esclusivamente su calcoli statistici; così si è costruita la **mappa di tutti i cromosomi della drosofila**. Per cui, per esempio sapere che il gene "occhio vermiglio" mappasse a 33.0 mentre il gene "ali piccole" mappasse a 36.1, significava dire che tra questi due geni c'era una distanza di mappa di 3.1 unità di mappa il che significa che se si incrociano ci si attende il 3.1% di ricombinanti.

Come si è potuto determinare che un certo gene si trova su un certo cromosoma e non su un altro?

Ovviamente, per quello che riguarda i cromosomi sessuali le cose sono chiare per l'ereditarietà particolare di tali cromosomi che consente di capire se l'ereditarietà è di tipo **autosomico** o **X-linked**. Per quanto riguarda i cromosomi autosomici inizialmente si sono semplicemente visti i gruppi di associazione cioè, per esempio, che il gene "corpo nero" era insieme al gene "ali vestigiali"; questo non dice se si trovano sul cromosoma 1 o sul 2, ma semplicemente che si trovano insieme. Quindi il primo lavoro è stato quello di raggruppare i geni su uno stesso cromosoma, indipendentemente dal cromosoma (1, 2 oppure 3), in quanto chiamare il cromosoma 1 o 2 o 3 è una convenzione (nell'uomo la nomenclatura 1, 2, 3, 4, ecc. è stata fatta in base alla grandezza),

cioè qualcosa che viene fatto a posteriori. Una volta che i geni sono stati raggruppati su un cromosoma e sono stati denominati con un numero, si deve stabilire che quei geni stanno sul cromosoma più grande piuttosto che su quello più piccolo.

Se due caratteristiche (per esempio occhi verdi e corpo nero) si presentano su una stessa drosofila con una % di ricombinazione del 3.1 %, significa che sono sullo stesso cromosoma perché se si fossero trovati su cromosomi diversi si sarebbe avuta una % di ricombinazione del 50% cioè alleli equifrequenti in quanto sarebbe scattata l'indipendenza. È ovvio che si poteva pensare che distassero 50 unità di mappa e per questo all'inizio in molti casi sono stati **considerati indipendenti** geni che in realtà erano **associati**. Mendel stesso fece questo errore con una delle coppie di caratteri studiate che descrisse come indipendenti mentre a posteriori fu scoperto che erano associati ma tanto distanti tra loro da simulare l'indipendenza.

Un altro problema è che più i geni sono distanti e più il crossing-over è frequente e, anche se si è parlato di un singolo evento di crossing-over (una rottura ed una ricongiunzione), gli scambi che coinvolgono uno stesso cromatidio possono essere diversi. Perciò molto spesso **nonostante ci sia stato lo scambio, questo non si manifesta**, perché si ripropone la situazione di partenza.

Quindi le mappe statistiche sono piuttosto imprecise e ci dicono soltanto la distanza relativa tra un gene e l'altro, la sequenza su un cromosoma. Molte di queste mappature statistiche sono state fatte con **3 geni (saggio a tre punti)**, proprio per mettere in mezzo sempre un marcatore che indicasse se era avvenuto un doppio scambio. Quindi, via via che si piazzano i geni insieme su un cromosoma si incrociano tra loro più volte per aumentare la precisione della mappa.

Nel fare ciò ci si può accorgere che geni che erano stati catalogati come indipendenti di fatto sono associati e si trovano agli estremi del cromosoma.

Invece, si determina che un certo numero di geni stanno sul cromosoma 2 piuttosto che sul 3, perché sono state fatte delle mappe citologiche, cioè più "fisiche", utilizzando per la drosofila i cromosomi salivari, cromosomi estremamente grandi che si trovano nelle ghiandole salivari, dovuti a numerose divisioni mitotiche senza separazione dei cromatidi (restano insieme circa un migliaio di cromatidi attaccati uno all'altro). Ciò rende il cromosoma particolarmente visibile e su questi è stato possibile fare delle mappe fisiche utilizzando dei cromosomi dove c'erano delle mutazioni relative alla struttura del cromosoma.

Nell'uomo questo tipo di mappatura è stata utilizzata per anni, studiando a posteriori le famiglie cosiddette "informative", cioè raggruppando le famiglie sulla base della progenie, individuando il genotipo dei genitori che poteva essere interessante e sulla base di questo è stata fatta l'analisi statistica (si studiano 10 famiglie i cui genitori sono "A/a" e "B/b", si studia come segregano questi geni nella progenie e si fa un'analisi statistica sui figli).

Oggi la mappatura dei geni viene fatta a livello molecolare ma questo procedimento è relativo a meno di 10 anni fa.

Il gene prende il nome dalla mutazione perché si è messo in evidenza mediante la mutazione (se non ci fosse stata la mutazione non si sarebbe visto). La mappatura viene fatta indicando l'allele mutato perché il gene prende quel nome. Per esempio, un locus si chiama "scarlet" (scarlatta) e a

questo locus si può avere scarlet selvatico (l'occhio rosso selvatico) o l'occhio mutato. Anche l'ABO nell'uomo è un locus che prende il nome da tutti i fenotipi possibili (A, B, 0); di fatto in questo locus si può avere l'allele I^A , I^B e i . quindi, dire che c'è un locus "scarlet" vuol dire che in quel tratto di DNA si ha un gene che codifica per il pigmento dell'occhio e che, se il gene è normale, dà il rosso, se è mutato dà lo scarlatto. C'è poi un altro gene, "white" (bianco) che dà l'occhio bianco quando è mutato; se ci sono vari geni che intervengono nel determinare quel colore dell'occhio, se ne funziona male uno si avrà una certa mutazione, se ne funziona male un altro, se ne avrà una diversa. Quindi i vari geni che intervengono si devono chiamare con il nome della mutazione. Infatti in natura, così come nell'uomo, esistono delle catene metaboliche; ciò significa che il pigmento è prodotto alla fine di numerosi passaggi che prevedono la trasformazione di una sostanza iniziale nel pigmento finale. Ogni trasformazione durante la catena metabolica è mediata da enzimi e per ogni enzima che interviene, a monte c'è un gene; quindi ecco perché un carattere "colore degli occhi" è poligenico perché ci sono tanti passaggi che concorrono a formare il pigmento finale e se sono necessari 10 enzimi ci saranno 10 geni che li controllano.

$$\lg \frac{0,04x}{0,05-x} \rightarrow \lg 0,08 + x - (\lg 0,05 - x)$$

Lezione 28 (8/05)

È stato dimostrato che il crossing-over avviene effettivamente con una rottura del DNA e con una riunione cosiddetta **illegittima**; questo è stato dimostrato grazie a dei cromosomi particolari che presentavano dei marcatori fisici (rotture, riunioni particolari) e quindi si riuscì a dimostrare che quando si parla di crossing-over si fa diretto riferimento ad una **effettiva rottura e scambio di materiale genetico con una riunione "illegittima"**.

Tutte le volte che avviene un danno al livello del DNA, per esempio una rottura provocata da danni fisici o chimici, ogni volta il DNA cerca di riparare, a volte ripara in maniera corretta (riunendo i due pezzi che si sono separati), a volte ripara in maniera non corretta (illegittima) dando luogo a dei cambiamenti nella struttura dei cromosomi (traslocazioni, inversioni, ecc, che rivedremo).

Quindi in natura esiste la possibilità che il DNA possa rompersi e che possa ricongiungersi in maniera illegittima. In questo caso, però, la riunione illegittima avviene non tra cromosomi diversi, ma tra cromatidi diversi di due cromosomi omologhi (possono esistere anche scambi tra cromatidi fratelli).

Quando si parla di **geni associati** ed in particolare si fa riferimento ad individui **eterozigoti**, a partire dalla scrittura molto generica del genotipo (Aa Bb), ci possiamo trovare di fronte a due diversi tipi di associazione:

- **CIS**: i due dominanti sono sullo stesso cromosoma e i recessivi sono insieme sul cromosoma omologo, cioè $\frac{A \quad B}{a \quad b}$
- **TRANS**: sullo stesso cromosoma si ha un dominante ed un recessivo e sul cromosoma omologo si ha un dominante ed un recessivo, cioè $\frac{A \quad b}{a \quad B}$

Questo porta a risultati completamente diversi perché le classi parentali sono diverse; tuttavia vengono indicate con la stessa dicitura genotipica (Aa Bb).

Quindi, tutte le volte che ci poniamo a studiare in che modo sono associati dei geni, ed in particolar modo gli alleli (perché questo significa trasmettere ai figli certe caratteristiche), dobbiamo verificare se gli alleli sono in CIS o sono in TRANS.

Oggi le mappe statistiche non si usano più perché, in modo particolare nell'uomo, la mappa statistica è estremamente complicata, perché non potendo programmare degli incroci idonei, bisogna andare alla caccia di **famiglie informative** (trovare famiglie informative non sempre è semplice, soprattutto quando ci troviamo di fronte a caratteri molto rari (che non sono particolarmente frequenti). Questo ha fatto sì che la mappatura dei caratteri dell'uomo sia stata abbastanza ritardata (1960), decisamente in ritardo rispetto alla mappatura dei caratteri della drosophila (che aveva il vantaggio di poter essere incrociata "ad hoc").

In maniera alternativa, per poter mappare i geni almeno sui cromosomi, più che farne una mappa statistica fra loro, ma almeno localizzarli sui cromosomi, nell'uomo è stato utilizzato inizialmente un sistema cosiddetto di **ibrido somatico**, cioè si facevano delle fusioni con cellule di diverso tipo (molto spesso topo-uomo); ibridi di questo tipo, cioè ibridi somatici (questi ibridi venivano fatti in vitro e quindi non davano origine ad un nuovo individuo) avevano la caratteristica che nel tempo

cominciano a perdere gradualmente i cromosomi di una delle due specie. Nell'ibrido uomo-topo i cromosomi che vanno via prima sono quelli umani; veniva seguito il destino di un marcatore, cioè si sceglieva una caratteristica fenotipica (scarlatto) e venivano osservate le espressioni fenotipiche delle cellule che gradualmente perdevano cromosomi, fino a che si cercava di restare con un unico cromosoma con la speranza che quella cellula poi esprimesse quel certo carattere. Così si poteva dire che quel carattere si trovava sull'unico cromosoma rimasto in dell'ibrido. Questa indagine fatta in vitro era ovviamente molto lunga, complessa e fortunosa.

Successivamente si è cominciato a fare delle **ibridazioni in situ** (si parla degli ultimi decenni) con delle sonde di DNA del gene che si vuol andare a localizzare, a mappare, marcandolo radioattivamente (oggi si usa la fluorescenza per marcare) e poi si sfruttava la capacità di formare ibridi, cioè che queste sonde si andassero a legare al DNA con le basi complementari, e quindi si andava a vedere fisicamente dove questa sonda si andava a localizzare (su quale cromosoma e su quale punto di tale cromosoma). In questo modo si otteneva una mappatura molecolare particolarmente esatta, ma questo tipo di mappatura ha il grande svantaggio che per poterla effettuare occorre avere un tratto di DNA che codifica per quella proteina che sia già isolato, quindi in realtà bisogna avere il gene già isolato.

Quindi si usava un metodo indiretto, cioè se si riusciva ad isolare la proteina, da questa si ricostruiva attraverso la sequenza dei nucleotidi si risaliva alla sequenza del DNA, quindi si riusciva ad ottenere una molecola complementare da usare come sonda. Con questo metodo molti geni sono stati mappati nell'uomo.

Recentemente si è cercato di "**camminare sul cromosoma**" (**walking** o **jumping** cioè saltare sul cromosoma utilizzando dei marcatori che non danno luogo a particolari fenotipi (a proteine particolari), perché sono dei marcatori che si trovano nelle zone **introniche***)

* Nel DNA degli eucarioti non tutto il DNA è codificante e all'interno di un tratto di DNA che codifica per una proteina, cioè all'interno di un gene, ci sono zone, dette **ESONI** che poi verranno tradotte e daranno origine ad aminoacidi, e zone che non verranno tradotte, dette **INTRONI**. Per questo motivo si dice che il gene degli eucarioti è un **gene discontinuo**.

I tratti che non vengono tradotti sono molto più variabili (diversi) di quanto lo siano i tratti esonici. Questo è facilmente intuibile perché, non dando origine ad una certa proteina, possono facilmente cambiare in maniera casuale; quindi si dice che sono delle zone **altamente polimorfiche**, cioè che si presentano con una variabilità molto alta.

Seguendo l'ereditarietà di questi marcatori (di queste zone introniche), o facendo sequenze di DNA o tagliando il DNA e facendo **elettroforesi** per vedere la lunghezza dei cosiddetti **frammenti di restrizione**, è possibile seguire il destino di alcuni geni e riuscire a marcarli.

Quindi si ha bisogno di avere una certa variabilità in modo da renderne più facile lo studio nella popolazione. Questo tipo di mappatura viene detta **mappatura regionale** e viene fatta:

- utilizzando i frammenti di restrizione (il DNA è tagliato con degli enzimi e poi viene fatta l'elettroforesi: a seconda della sequenza del DNA troviamo frammenti di diversa lunghezza);
- oppure si utilizzano delle zone del DNA particolari che sono delle sequenze ripetute; in questo caso si parla di **mappaggio molecolare**.

Si è parlato di aver sequenziato i cromosomi umani: quindi, teoricamente, non dovremmo avere problemi per mappare o localizzare dei geni. In realtà si è creata una gran confusione perché si è riusciti a sequenziare il DNA e non i geni cioè, sapere che una molecola di DNA è fatto da una certa sequenza di basi piuttosto che un'altra, non ci dice nulla circa la funzione di quel determinato tratto di DNA. Non siamo arrivati ancora al punto di correlare un certo gene alla rispettiva sequenza di DNA. Teoricamente si sarebbe dovuto prima mappare e poi sequenziare, mentre è stato fatto il contrario perché era più facile grazie ai mezzi oggi a disposizione (una macchina che fa la sequenza del DNA). La cosa complicata è quella di dare ad ogni singolo tratto di DNA la propria funzione, cioè associare una certa funzione con quella sequenza. Questo è stato fatto per moltissimi geni, ma non per tutti i cromosomi umani.

Quello che si è scoperto con questa sequenziazione è che pochissimi tratti di DNA sono attivi, cioè codificanti e quindi se già prima si diceva che moltissimo DNA degli eucarioti sembrava inutile (in realtà sappiamo che ha altre funzioni), perché non aveva capacità codificanti, in realtà si è visto che il DNA non codificante (che non dà origine a proteine), è molto di più di quanto si immaginasse. Quindi i geni sono veramente molto pochi, meno di quelli che ci si aspettava e questo vuol dire che moltissimi geni devono collaborare tra loro per fare tutti i prodotti che utilizziamo normalmente. E molti geni devono avere una doppia funzione.

L'elettroforesi è una tecnica, utilizzata inizialmente per le proteine e successivamente anche per il DNA, che sfrutta un substrato di materiale inerte (agarosio per il DNA, amido per le proteine) posto in una piastra e che si sottopone ad un campo elettrico (avremo un polo positivo ed uno negativo). Si usano delle soluzioni tampone che consentono il trasporto della corrente senza variazioni di pH. Il campione da studiare (estratto dalle cellule e messo in soluzione), viene "caricato" sulla piastra a livello di pozzetti posti alle sue estremità. Al passaggio della corrente elettrica, le proteine o il DNA si spostano a seconda della loro grandezza e della loro carica e quindi si ha la migrazione del materiale verso il polo idoneo (positivo per il DNA). Se il DNA è stato precedentemente tagliato, avremo tante piccole molecole che si posizionano a seconda della lunghezza (le più piccole più avanti e le più grandi rimarranno indietro).

Caratteri mendeliani e non mendeliani

Si è detto più volte che i caratteri mendeliani semplici non sono sempre così come li abbiamo descritti, con due alternative (ali corte o lunghe), ma molto spesso uno stesso gene può determinare più caratteristiche fenotipiche (come per esempio il gene dei gruppi sanguigni).

Allelia multipla: possibilità che ad uno stesso "locus genico" vi possano essere più di due alleli; ovviamente sono alternative di espressione dello stesso gene e quando si va ad osservare il genotipo di un singolo individuo diploide, troveremo al massimo 2 alleli.

L'allelia multipla è stato un modo per dimostrare che l'alternativa allelica non era di presenza-
assenza, ma che in realtà si parla di un cambiamento che poteva essere di vario tipo. Questo vuol dire che all'inizio si pensava che avere, per esempio, il fiore rosso o il fiore bianco significasse avere un allele o non averlo, avere un gene o non averlo. Con la dimostrazione che ad uno stesso

in realtà si parla di un cambiamento che poteva essere di vario tipo (come il colore del fiore)

locus genico si possono avere più di due alternative, si dimostrava che in realtà il gene doveva poter avere la possibilità di cambiare.

L'allele multipla è una condizione abbastanza frequente; gli alleli ad un certo locus genico possono essere più o meno frequenti. Quando si parla di **polimorfismo** o di **multiallelia** con tutti alleli **comuni**, vuol dire che questi alleli hanno una **frequenza abbastanza alta** nella popolazione; quando si parla invece di **alleli rari**, vuol dire che si hanno un paio di alleli più frequenti (**comuni**) e raramente si hanno altre alternative. Nell'uomo sono noti molti esempi di geni multiallelici, primo fra tutti quello del GRUPPO SANGUIGNO ABO.

Assieme alla condizione di allele multipla, si ha una condizione di **POLIGENIA**, cioè il concorso di più geni nel determinare un certo fenotipo. Quando intervengono più geni, le cose si complicano perché i rapporti tra questi geni possono essere di vario tipo.

Prima di passare a questo tipo di discorso bisogna concludere il discorso sui caratteri mendeliani monofattoriali semplici, complicando un po' le cose.

Sono due concetti che tendono a complicare le cose:
penetranza: ci troviamo di fronte alla presenza di **genotipi identici** ma **fenotipi diversi**, cioè a situazioni di genotipo due individui possono presentare un fenotipo diverso.

penetranza può essere di due tipi:
penetranza completa (100%): quando ad un genotipo identico corrisponde sempre lo stesso fenotipo;

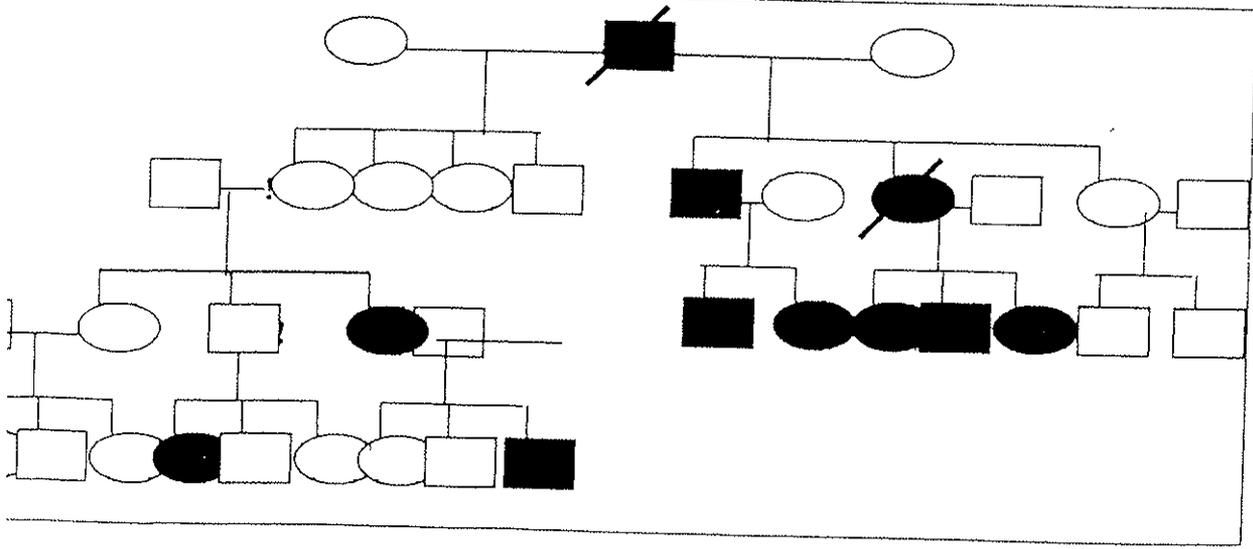
penetranza incompleta: quando non accade quanto sopracitato.

PENETRANZA è la % di individui che con specifico genotipo esprime un fenotipo diverso o esprime il fenotipo.

un campione di 10 persone se 8 su 10 mostrano il giusto fenotipo possiamo dire che la penetranza è dell'80%, cioè quel genotipo si esprime in 8 persone su 10.

diventa più chiaro andando a vedere gli alberi genealogici.

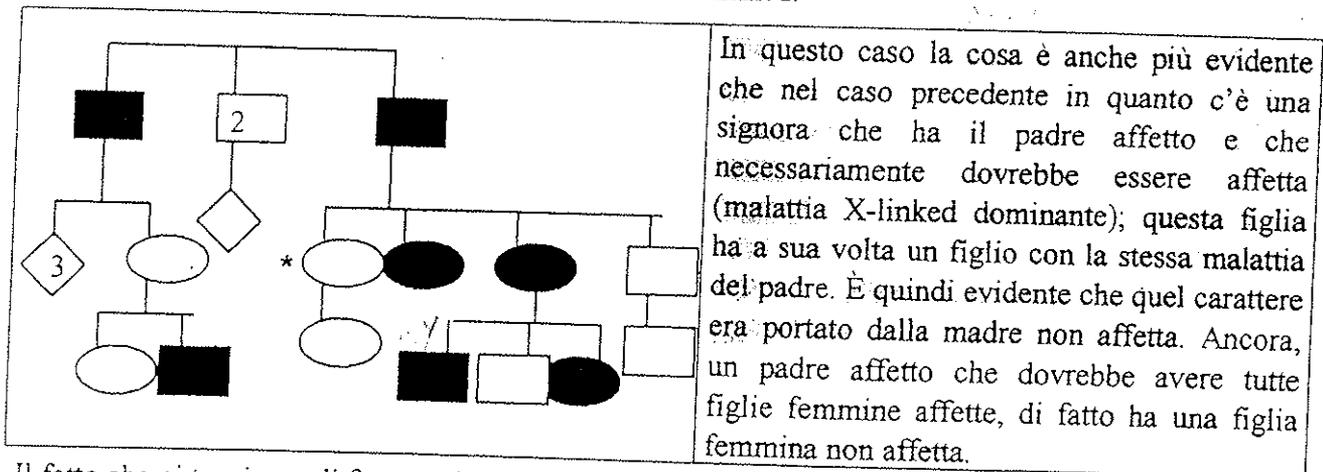
Si esaminano gli alberi genealogici di due caratteri ereditari autosomici dominanti mendeliani (fragilità ossea; campodattilia, malformazione del dito mignolo), si osserva quanto segue:



Mentre sulla destra dell'albero genealogico si nota con molta chiarezza che è un carattere dominante (un padre lo passa a un figlio e ad una figlia), sulla sinistra dell'albero si ha lo stesso padre (che ha avuto due matrimoni) che ha una serie di figli sani, ma **c'è un signore che non è malato che ha una figlia malata**. Quindi abbiamo due persone apparentemente sane che però trasmettono il carattere ma questo è incompatibile con un carattere dominante autosomico.

Perciò quelle due persone sane ma portatrici (con il punto esclamativo) devono necessariamente portare l'allele che porta la malattia, ma in loro la malattia non si è mostrata a livello fenotipico. Non è ancora chiaro come si verifichi questo fenomeno, ma è chiaro che alcuni geni non hanno una penetranza completa, cioè pur essendo trasmessi come se fossero caratteri monofattoriali mendeliani (quindi con la normale probabilità di poter calcolare il verificarsi di un certo genotipo), di fatto quando si ha quel genotipo, non sempre viene espresso con il fenotipo corrispondente.

Un altro esempio è dato da una malattia X-linked dominante, è il rachitismo congenito resistente alla vitamina D, uno dei pochi caratteri dominanti X-linked:



Il fatto che ci troviamo di fronte ad un caso di persone che **sicuramente** portano quell'allele ma non lo mostrano, è dato da una controprova: le persone affette da questa forma di rachitismo hanno una concentrazione di fosforo inorganico nel siero che è anormalmente bassa. Tutte le persone che sono rachitiche o lo dovrebbero essere (le persone con l'asterisco), hanno valori di fosforo inorganico particolarmente basso e questo conferma il fatto che quelle signore dovrebbero essere malate. Quindi anche questo carattere non ha una penetranza completa.

Un altro parametro del quale va tenuto conto è l'**Espressività**, cioè quanto intensamente un carattere riesce ad esprimersi. Questo vuol dire che tra individui che sicuramente portano un certo genotipo, si può trovare una gradualità nell'espressione del fenotipo.

Ad esempio possiamo portare l'occhio della drosofila che presenta l'allele "lobato". La normale espressività di questo allele fa presentare l'occhio con la mancanza di un lobo; tuttavia l'espressione di questo gene può essere molto maggiore, fino ad arrivare all'assenza totale degli occhi.

L'espressione di questo carattere risente della temperatura.

Perciò quando si parla di **espressività** di un carattere ci si riferisce alla **gradualità** di espressione di quel carattere in un individuo che lo porta.

Per esempio nell'uomo c'è la sindrome Holt-Oram che essenzialmente dà problemi cardiovascolari e di origine scheletrica; persone con genotipo che dovrebbe dare questa sindrome, in realtà presentano un quadro clinico molto diverso, che va dalla **ipoplasia della mano** (sviluppo non corretto dello scheletro della mano, fino alla **focomelia** (mancanza di un arto). Quindi, la gravità della sindrome è quanto mai variabile. Non si conosce sempre il biochimismo di questo fenomeno, ma diciamo che possono esistere dei quadri clinici che possono essere più o meno intensi anche a parità di genotipo; ovviamente si sta parlando di caratteri monofattoriali, perché nei caratteri **polifattoriali** il quadro si complica.

Sindrome: termine clinico e sta ad indicare un **quadro complesso**. Quando il quadro clinico è dato da **caratteri monofattoriali**, ci si può trovare di fronte ad una sindrome se a monte c'è un altro evento che è la **pleiotropia**.

Si parla di **PLEIOTROPIA** tutte le volte in cui un carattere monofattoriale, cioè un singolo gene, può essere responsabile di **molteplici effetti differenti**.

Per esempio la **falcemia** (è un tipo di anemia con un globulo rosso a forma di falce), sappiamo con certezza che è determinata da un singolo allele, è un carattere monofattoriale semplice e viene ereditato secondo la legge di Mendel. Nonostante ciò si parla di sindrome perché, pur essendo la falcemia dovuta all'omozigosi di un singolo allele, partendo dall'emazie a falce si passa ad una serie di rapporti correlati tra loro per cui si arriva ad un quadro clinico estremamente variabile, che definiamo sindrome (si può avere astenia, disfunzione cardiaca, paralisi, polmoniti, reumatismi, **disfunzioni renali, lesioni alla milza**), cioè un quadro clinico che riguarda diversi organi, pur essendo determinata da un singolo gene.

Bisogna sottolineare che quando si studia un gene si può farlo a vari livelli: uno fenotipico, uno diagnostico, uno clinico; per esempio un eterozigote falcemico, a livello clinico fenotipico è normale, ma a livello diagnostico (forma dei globuli rossi) ci si accorge che è completamente differente da quella normale.

Un altro esempio di **pleiotropia** è l'albinismo: è un singolo gene ma riguarda vari aspetti della persona; anche qui sappiamo che a monte c'è una non corretta formazione della melanina.

Un altro esempio è l'**aracnodattilia**, un allungamento sproporzionato delle dita, ma che coinvolge anche tutte le ossa lunghe e la **fenilchetonuria**.

Caratteri poligenici

È ormai dimostrato che i caratteri monofattoriali semplici sono veramente pochi, mentre esiste tutta una serie di interazione tra geni abbastanza complicate.

Quando si parla di ereditarietà bisogna fare una differenza tra i **caratteri qualitativi** e quelli **quantitativi**.

Fin ora abbiamo sempre parlato di caratteri qualitativi, (ala corta, ala lunga, occhio rosso o bianco, dita corte o lunghe, ecc). Tutte le volte che si parla di **caratteri monofattoriali mendeliani**, ci si riferisce **SEMPRE** a **caratteri qualitativi**.

Tutte le volte che si parla di **caratteri quantitativi**, cioè che si differenziano non per qualità ma per misure fisiche, si parla sempre di **caratteri multifattoriali**.

Quindi, il carattere mendeliano semplice da sempre un'ereditarietà di tipo qualitativo, mentre per poter avere un'ereditarietà di tipo quantitativo devo avere più geni che interagiscono fra loro.

Questo perché l'ereditarietà quantitativa ha la caratteristica di distribuirsi secondo una curva normale gaussiana (curva a campana); se si osserva la distribuzione dei falcemici, si troverà un istogramma, non si avranno mai situazioni intermedie che permettano di fare una gaussiana.

Quando invece si parla di caratteri quantitativi (peso, altezza, ecc.) si può sempre trovare una misurazione intermedia che permette di disegnare una curva gaussiana. Tale situazione si può avere solo se più geni interagiscono tra loro.

Nel momento in cui si hanno più geni che intercorrono a determinare un certo carattere, non sempre si ha un carattere quantitativo: infatti si è detto che un carattere monofattoriale dà sempre un'eredità quantitativa ma non si è detto che caratteri polifattoriali danno sempre eredità quantitativa, ma piuttosto un carattere quantitativo è sempre polifattoriale. Infatti, si possono aver tutta una serie di geni che sono polifattoriali e che non sono quantitativi ma riguardano sempre la qualità (per esempio il colore dell'occhio).

Cosa accade quando due geni interagiscono tra loro dal punto di vista qualitativo?

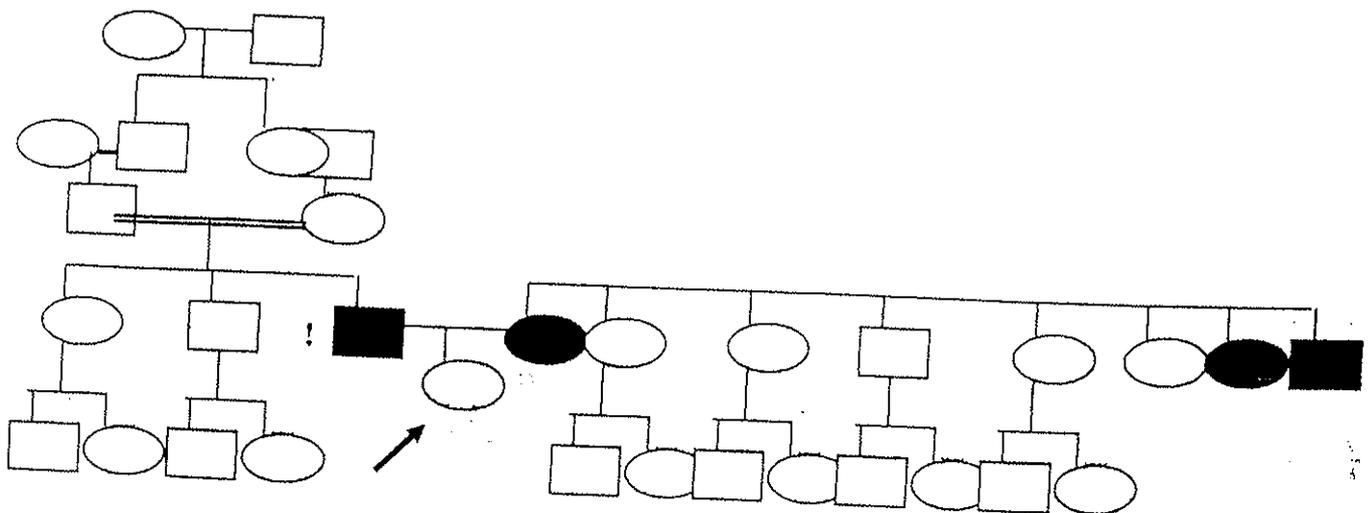
Si possono vari possibilità di espressione:

- l'attività di un gene può influenzare l'attività di un altro gene. Quindi, la presenza di più fattori a determinare un carattere si realizza con un'interferenza di un gene su un altro; in questo caso si parla di **EPISTASI**;
- due geni possono concorrere in maniera del tutto indipendente a determinare un certo fenotipo.

In quest'ultimo caso, si possono avere due possibilità:

- un effetto **additivo**, cioè ciascun gene va per conto suo ma il prodotto finale si somma (carattere quantitativo, per esempio il colore della pelle);
- oppure, due geni, del tutto **indipendentemente**, si comportano in modo analogo e ciascuno di loro, da solo, dà origine a tutto il fenotipo.

L'albero genealogico attraverso il quale si è scoperta questa strana interazione tra due geni, riguarda l'ereditarietà dell'albinismo:



in una famiglia ad un certo punto compare un fenotipo albino (non ci deve meravigliare perché sappiamo che è un carattere recessivo); nell'altro lato della famiglia c'è una signora albina con casi di albinismo in famiglia; queste due persone si sposano ed hanno una figlia non albina.

In pratica, nonostante un matrimonio **tra due persone con fenotipo malato**, si ha progenie con **fenotipo normale**.

Escludendo il caso di non paternità, l'unica spiegazione probabile, che poi è stata dimostrata, è che **ci siano in azione due geni** che concorrono in maniera indipendente, non additiva, a dare lo stesso fenotipo. In pratica si possono avere più mutazioni su diversi cromosomi che danno poi lo stesso fenotipo. Questo è il caso dell'albinismo per il quale conosciamo ormai 5-6 geni che determinano la malattia, di cui uno X-linked.

Ciò vuol dire che, se s'immagina che ci siano **due geni** indipendenti l'uno dall'altro, che non danno nessun effetto sommatorio, si può avere una mutazione su un cromosoma che fa in modo che non si formi correttamente la melanina.

Quindi in questa famiglia, supponendo che sia mutato il gene "A", si avrà che il padre è probabilmente "aa"; se si ammette che esiste un altro gene che può dare una non formazione della melanina, questo causerà ancora una volta un fenotipo albino (ma è un gene diverso dall'altro) e perciò si deve ammettere che la madre sia "bb".

Ciò vuol dire che il padre è "aa BB" e la madre è "AA bb".

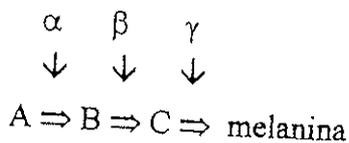
La loro figlia, sana, avrà preso "a" dal padre ma "A" dalla madre e avrà preso "B" dal padre e "b" dalla madre (sarà "A/a B/b"). Quindi la figlia **non può essere albina** perché nel suo genotipo ha "A" e "B" che funzionano normalmente e quindi l'unica spiegazione possibile è che siano coinvolti geni diversi

Lezione 29 (10/05/01)

Nell'ultima lezione avevamo visto che da persone con fenotipo mutato nasceva progenie con fenotipo normale. Come lo spieghiamo?

Quando è possibile (perché non sempre lo è), si deve far riferimento alle **catene metaboliche**.

La **catena metabolica** che porta alla formazione della melanina è nota ed ogni passaggio è modulato da un enzima. Se ipotizziamo che la suddetta catena sia:



sono noti **diversi geni indipendenti** in termini di funzionamento che danno lo stesso identico fenotipo, cioè assenza di melanina. Non è difficile immaginare che se il gene α non funziona, la **catena metabolica** si blocca a quel punto ed il risultato è assenza di melanina.

Se nella stessa catena metabolica non funziona il gene β , la catena si ferma a quel livello e non si avrà melanina. Questo si può immaginare per **ogni passaggio** che deve essere effettuato per formare la melanina.

Il risultato sarà che **diversi geni possono portare indipendentemente all'assenza di melanina**.

in queste cose la figlia sana
avrebbe il gene A funzionante.

Perciò si può immaginare un **individuo** fenotipicamente **albino** che possa essere di genotipo a/a (il primo gene della catena è mutato) ma possa essere B/B perché il secondo funziona benissimo; si può anche immaginare un altro individuo che sia A/A e b/b ; **entrambi gli individui sono albini** ma il gene per cui sono albini è diverso. Ci si attende che la progenie di questi individui (a/a B/B x A/A b/b) sia albina, mentre avrà genotipo a/A B/b preso dai due genitori, per cui entrambi i geni funzionano e l'individuo sarà sano.

Per dimostrare questo si effettua un test che si chiama "Test di complementazione" o "Cis Trans" in cui si dimostra, a seconda del fenotipo che abbiamo nella progenie, se gli alleli corrispondono a cistroni diversi (cistrone = gene), oppure se la mutazione riguarda lo stesso gene mutato in punti diversi. Se la mutazione riguarda lo stesso cistrone, cioè punti diversi dello stesso gene, si avrà una progenie di fenotipo diverso a seconda che le due mutazioni, i due alleli sono in cis oppure in trans (spiegazione sospesa perché troppo difficile).

Variabilità discontinua o quantitativa

Finora abbiamo parlato di **caratteri mendeliani semplici** e abbiamo visto la possibilità che ci siano due o più alleli che intervengano per dare la variabilità.

Si è poi accennato a **caratteri mendeliani complessi**, cioè si è presa in esame la possibilità che due geni interagiscano fra loro e si è visto che possono interagire con l'**epistasi** (impedendo il funzionamento di un altro gene); si è inoltre visto che possono **interagire dando lo stesso fenotipo** con qualche variabilità, si è visto comunque che c'è la possibilità che non tutto sia semplice come sono i caratteri mendeliani semplici, ma che **ci può essere un quadro di interazione tra geni diversi** che però ci daranno sempre un **fenotipo di tipo qualitativo**, un'ereditarietà di tipo **discontinua** cioè a salti (nei gruppi sanguigni A oppure B, oppure AB; nelle malattie talassemico o non talassemico; falcemico o non falcemico; emofilico o non emofilico ecc.); in altre parole, **alternative di tipo qualitativo**.

Esiste anche una **variabilità continua**, che segue più o meno una curva gaussiana.

Ciò significa che tra due punti che si sono determinati ci si può sempre aspettare un punto intermedio. **Questo tipo di variabilità è sempre legato alla presenza di più geni.**

L'unico modo in cui si può spiegare la presenza della variabilità continua, la presenza di caratteri quantitativi, è quello di ammettere che intervengano più geni a determinare quel fenotipo.

La distribuzione della frequenza delle creste digitali in un campione di una popolazione può essere molto variabile e può essere considerato un carattere di tipo quantitativo, cioè una variabilità continua, perché se si valuta la frequenza delle persone e si mette in rapporto al numero di creste, ci si accorge che la distribuzione è pressoché normale, cioè rientra in una curva gaussiana.

L'unico modo per spiegare dal punto di vista genetico questo tipo di variabilità è quello di ammettere la presenza di **più geni con effetto additivo**: due o più geni intervengono e ognuno di loro porta, cioè addiziona qualche cosa.

Questo tipo di ereditarietà **quantitativa** si può per es. riscontrare per il **colore della pelle nell'uomo**. Si sarebbe portati a dire che il colore della pelle sia un carattere qualitativo perché da una qualità: in realtà c'è una **variabilità** di intensità del colore che va dal nero scuro al bianco più

chiaro dei Paesi Nordici con varie tonalità intermedie. Da un matrimonio tra una persona con pelle molto scura e una con pelle molto chiara, mentre a volte ci si aspetta la nascita di meticci (colore intermedio), a volte il colore è talmente chiaro da far confondere con la carnagione del tipo nordico. Questo è dovuto proprio al fatto che si verifica l'intervento di diversi geni con effetto additivo, e quindi a seconda della quantità dell'uno o dell'altro il fenotipo sarà più o meno chiaro.

Per poter spiegare la distribuzione del colore della pelle nell'uomo e le varie tonalità, i vari fenotipi attesi nella F2 (cioè nei matrimoni tra eterozigoti, tra ibridi) bisogna ammettere un sistema almeno a tre geni. Quindi, quando parliamo del colore della pelle o del colore degli occhi dobbiamo immaginare che ci siano più geni che intercorrano nel determinare quel fenotipo (3 geni) con effetto additivo, cioè il prodotto di ciascuno di questi geni va a sommarsi al prodotto degli altri.

Se si ha un sistema a 3 geni con due alleli, le persone con fenotipo scuro saranno omozigoti per tutti e tre i geni e tutti gli alleli dei tre geni; quindi, avranno, per esempio, A/A B/B C/C.

Man mano che il colore tende a schiarire, avremo sempre meno alleli di tipo A e sempre più alleli del tipo "recessivo", fino ad arrivare al fenotipo chiaro in cui avremo a/a, b/b, c/c, cioè non avremo più nessun allele che dà pigmentazione molto scura ed il colore diventerà decisamente chiaro.

Un altro esempio di caratteri quantitativi può essere quello dell'altezza: se si esamina la distribuzione dell'altezza in una compagnia di soldati di leva di circa 20 anni dal 1874 al 1960, si vede che è aumentata di 9 cm (la distribuzione di frequenza è descritta da una curva gaussiana).

Nel caso dell'altezza, però, così come per molti altri geni, i fenotipi possono essere determinati, oltre che dai geni, anche da altre caratteristiche che in generale definiamo "ambientali": stile di vita, abitudini alimentari, ambiente intrauterino, gestazione piuttosto che periodo post-parto.

Per "ambientale", quindi, si intende tutto ciò che circonda un individuo ad esclusione dell'effetto puramente genetico.

Facendo dei calcoli statistici l'aumento dell'altezza su citato è eccessivo, pur volendo ammettere che ci sia stata un certo tipo di selezione e di variabilità. Ciò vuol dire che nel tempo gli alleli possono variare e possono selezionarsi gli alleli più utili; in questo caso non si può ammettere un'utilità dell'aumento dell'altezza e in più il tempo (meno di un secolo) è molto poco per poter immaginare che ci sia stata un'ampia variazione a livello del DNA e una selezione così precisa verso una certa caratteristica.

Perciò si deve ammettere che la statura non è soltanto ereditaria, ma che anche altri fattori possono intervenire nel variarla, in quanto variazioni così drastiche nel tempo non possono essere spiegate solo con fattori genetici, ma devono avere anche il supporto di altri fattori.

Ciò vuol dire che la statura, così come altri caratteri, ha una duplice componente sia di tipo genetico (genitori piccoli avranno figli mediamente più piccoli e viceversa) sia di tipo ambientale.

In questo caso (i bambini oggi nascono più lunghi, 50-51 cm, rispetto ai 45-46 cm di pochi anni fa), il miglioramento della gravidanza (le donne sono più seguite, si nutrono in maniera corretta, lavorano meno), dell'alimentazione dei bambini, lo sport, hanno contribuito all'aumento dell'altezza con gli anni.

Caratteri che siano un misto di genetico e di ambientale sono definiti multifattoriali (da non confondere con i poligenici: un carattere multifattoriale può essere dovuto anche **ad un solo gene**). La parte genetica può essere di tipo **unigenico** o **poligenico** cioè il fattore ambientale può agire anche sull'espressione di un singolo gene.

Ovviamente, tutte le volte che si hanno dei caratteri che presentano una grande variabilità nell'espressione, si pone sempre il dubbio che possano essere a base genetica e quanto possano essere anche a base ambientale. Quando non si riesce ad osservare una trasmissione dei caratteri di tipo mendeliano, quando non si riesce a spiegare la trasmissione dei caratteri nemmeno ammettendo un sistema di caratteri complessi, nemmeno ammettendo una poliginia (cioè che più geni concorrono), si deve prendere per forza in esame la possibilità che ci sia l'intervento dell'ambiente. Si possono fare esempi di diverse malattie: il diabete, le malattie cardiovascolari, alcune malattie polmonari; si è visto che c'è una cosiddetta "**tendenza familiare**", ma di fatto non è possibile verificare una discendenza matematica. In questo caso la prima possibilità da prendere in esame è che sia un carattere multifattoriale, cioè che dipenda anche dall'ambiente.

Per studiare questo tipo di influenza, i gemelli sono una popolazione ottimale perché:

- i **gemelli monovulari** sono fratelli con lo stesso identico genotipo, hanno condiviso l'ambiente intrauterino, il parto e i primi anni di vita;
- i **gemelli dizigoti** hanno anche loro condiviso l'ambiente intrauterino, il momento della nascita e i primi anni di vita, **ma non hanno lo stesso patrimonio genetico**;
- i **fratelli** (non gemelli) hanno condiviso la prima infanzia ma non hanno condiviso l'ambiente intrauterino e non hanno nemmeno lo stesso patrimonio genetico.

Queste 3 figure, correlate anche ai cosiddetti "no relate", cioè ai "non parenti", ci permettono di dimostrare se un carattere è **esclusivamente genetico** (ci si attende che i gemelli dizigoti siano identici), oppure se è un carattere multifattoriale.

La differenza tra monozigoti e dizigoti (anche i monozigoti possono essere un po' variabili tra di loro), permette di stabilire la percentuale relativa alla genetica e quella relativa all'ambiente.

Per esempio, se i monozigoti sono simili tra loro al 90% per un carattere e al 70% per un altro carattere, si potrà affermare che il primo carattere ha una base genetica più forte del secondo, per il quale sicuramente l'influenza dell'ambiente è maggiore.

Effetto soglia

Si accennava che ci sono dei caratteri che sono a base genetica, **apparentemente qualitativi** (avere il diabete o non averlo non può essere di tipo quantitativo), ad **andamento familiare** e per i quali si dà una spiegazione anche di tipo multifattoriale, ma per i quali questa spiegazione **non è sufficiente**; oltre a ciò si deve ammettere per loro anche un'altra condizione: la condizione di "effetto soglia".

Infatti ci sono delle **caratteristiche apparentemente qualitative** che in realtà sono determinate dalla presenza di più geni ma con un effetto che è in maniera subdola (nascosta) di **tipo additivo**.

Ciò vuol dire che per questi caratteri **qualitativi** si deve ammettere comunque la presenza di più geni e si deve ammettere che **occorre "accumulare" un certo quantitativo di alleli perché il fenotipo si possa sviluppare.**

Supponiamo di avere 5 geni con 2 alternative (cioè si deve essere A/A b/b C/C D/D E/e): se si accumulano un certo numero di alleli che portano a quella malattia, si avrà la **predisposizione** a sviluppare quel carattere ("predisposizione" significa che poi dovranno influire le caratteristiche ambientali e comunque si deve aver raggiunto una certa quantità di alleli mutati perché altrimenti la malattia non si sviluppa).

Questo spiega perché tantissimi caratteri clinici, di cui sempre più si scopre una qualche origine genetica, di fatto presentino una trasmissione particolare; per esempio, molte malattie neurologiche hanno sicuramente una base genetica, ma non si può affermare che con una certa probabilità verranno ereditate nei figli, perché ci sono tantissimi fattori che possono influenzare: un effetto soglia e un effetto ambientale che sicuramente incidono moltissimo.

Perciò, sapere che in una famiglia ci sono certe malattie è importante perché predispone ad avere uno stile di vita idoneo a prevenire quelle malattie, ma non si deve assolutamente immaginare che, dato che c'è un avo diabetico, sicuramente c'è una probabilità calcolabile che un discendente sia diabetico. Al contrario se un soggetto è eterozigote per la talassemia, è possibile calcolare la probabilità di avere figli talassemici.

In sintesi, l'effetto soglia è una condizione per cui, per poter sviluppare una malattia si deve avere un genotipo dato dall'accumulo di un certo numero di alleli mutati: per esempio, se l'effetto soglia è dato dall'aver 4 alleli mutati, si può avere a/a, b/b, e tutti gli altri dominanti oppure avere a, b, c, d, e tutti gli altri dominanti; è quindi una questione di numero di alleli e non di qualità. ⁴

Se finora si è detto che se ci sono due alleli c/C, almeno uno funzionerà e si avrà un certo fenotipo, in questo caso la **modificazione del fenotipo** è data dalla **somma di tutti gli alleli di un certo tipo**, recessivi piuttosto che dominanti (dipende dal gene).

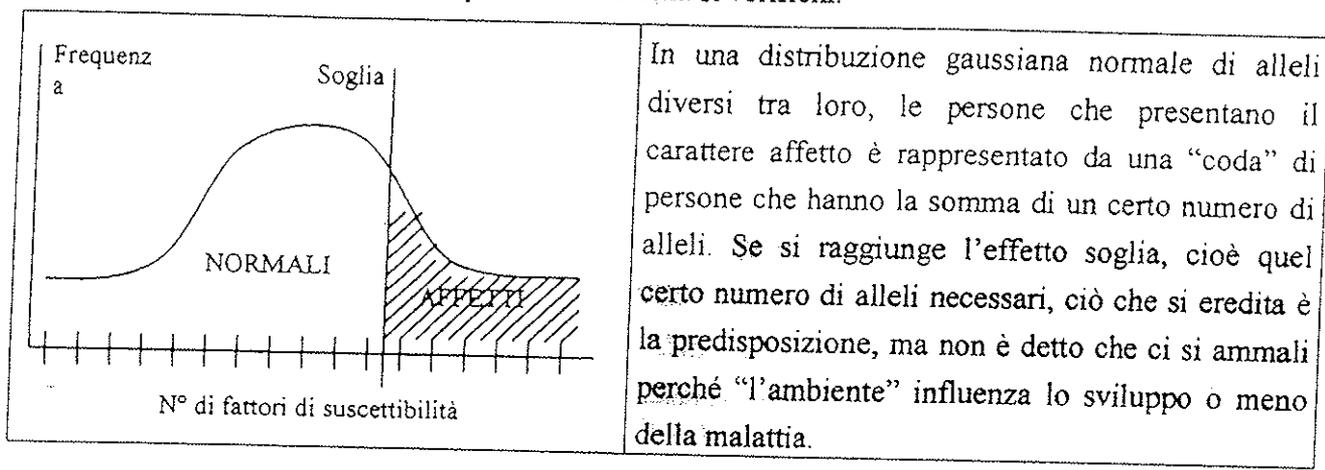
Lezione 30 (17/05/01)

Effetto soglia

È detto così perché sembra un carattere di tipo qualitativo, cioè un carattere in cui una determinata caratteristica si presenta in maniera discontinua. Il carattere ad effetto soglia si presenta allo stesso modo, cioè l'individuo o è malato o è sano, non c'è una gradualità di tipo quantitativo, non c'è una distribuzione continua. Tuttavia, l'ereditarietà non è di tipo mendeliano semplice e l'unico modo in cui si può spiegare l'ereditarietà del carattere ad effetto soglia è quello di immaginare che sia un sistema poligenico (come la statura) e che quindi diversi geni, ognuno con i propri alleli, concorrano a determinare questa caratteristica. Quindi ci si attende una distribuzione degli alleli di tipo continuo perché è quella data dal sistema poligenico, ma ancora una volta non si riesce a spiegare l'ereditarietà ammettendo il solo sistema poligenico (tipo colore della pelle), ma dobbiamo ammettere anche l'influenza dell'ambiente (come per i caratteri quantitativi). Tuttavia, resta il fatto che non si ha una distribuzione continua dei fenotipi: nel carattere altezza o peso, si osserva una distribuzione gaussiana dei genotipi e dei corrispondenti fenotipi, tenendo conto del fatto che è un

carattere influenzato dall'ambiente. Se invece si osserva un carattere ad effetto soglia, ci si accorge che i fenotipi non sono distribuiti in maniera continua, ma simulano molto i caratteri mendeliani semplici di tipo qualitativo (malato o non malato). La prova che sia un carattere comunque con un'influenza mendeliana è data dal fatto che se si osserva la frequenza di queste malattie nella popolazione (il diabete, la palatoschisi, ecc.) è per la palatoschisi (labbro leporino) dell'1%; nei gemelli monozigoti la concordanza è del 40%, nei gemelli dizigotici è del 4% e nella famiglia la distribuzione è molto casuale. Quindi si deve ammettere un'influenza genetica perché nei gemelli monozigotici c'è più concordanza nella presenza della malattia di quanto ci sia tra i dizigotici.

Si deve anche ammettere un'influenza dell'ambiente, ma per il tipo di distribuzione della malattia che salta molto, non si presenta in maniera coerente nella famiglia, si deve anche ammettere che occorre un certo numero di alleli perché la malattia si verifichi.

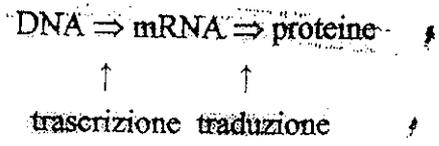


Quindi è uno dei modelli più complessi di ereditarietà perché mette insieme la poligenia, il multifattoriale (l'influenza dell'ambiente) e tiene conto del fatto che si deve raggiungere un certo numero di alleli mutati per avere la predisposizione alla malattia (si ereditano fattori di suscettibilità). Fattori di suscettibilità significa ereditare un certo numero di alleli che rende suscettibili alla malattia: l'ammalarsi o meno dipende poi dall'influenza ambientale. Se non si ha un certo numero di alleli che rende suscettibili alla malattia, l'influenza dell'ambiente è nulla.

Quindi come base prioritaria c'è l'aver un certo genotipo; tuttavia, avere quel certo genotipo non vuol dire andare sicuramente incontro alla malattia. Oltre alle malattie già citate, presentano questo tipo di distribuzione la lussazione dell'anca (non di tipo traumatico), la stenosi pilorica, l'artrite reumatoide, la schizofrenia.

LA SINTESI PROTEICA

È la sintesi delle proteine. In realtà ciò che adesso sembra banale ha alle spalle studi durati molto tempo che hanno portato alla scoperta di quello che va sotto il nome di "dogma centrale della biologia":



dal DNA si passa ad una molecola intermedia che è l'RNA messaggero per poi arrivare alle proteine; quindi la possibilità che il DNA si duplicasse e ancora la possibilità di passare dall'RNA al DNA, cosa che riguarda alcuni virus, attraverso un enzima che si chiama trascrittasi inversa.

Negli anni '60-'70 si era già capito molto bene che il DNA guidava la sintesi delle proteine ma il difficile era capire in che modo. Il linguaggio del DNA era rappresentato dai nucleotidi; le proteine erano delle molecole costituite da aminoacidi, il cui linguaggio quindi era dato da aminoacidi. bisognava trovare il meccanismo con cui questi due linguaggi si correlassero. Non a caso il passaggio tra l'mRNA e le proteine è stato chiamato "traduzione" perché effettivamente si tratta di ciò in quanto si ha un messaggio scritto con una sequenza di nucleotidi e dobbiamo passare ad un prodotto che è fatto da aminoacidi.

La trascrizione Come dice il termine stesso si verifica una ricopiatura: un'informazione contenuta nella molecola del DNA viene "trascritta" in un linguaggio simile. È come se si avesse un manoscritto antico che venisse prima copiato e poi tradotto. Ma perché questo passaggio di copiatura?

Per molto tempo i testi hanno risposto a questa domanda dicendo che la trascrizione è un processo necessario perché il DNA non lascia il nucleo e la traduzione avviene nel citoplasma.

Questa spiegazione è troppo frettolosa e troppo superficiale. Infatti:

- i batteri che non hanno membrana nucleare fanno la stessa cosa (è impensabile che i batteri prima abbiano fatto diversamente, poi siano arrivati gli eucarioti che hanno sviluppato la trascrizione per necessità e poi i batteri in qualche modo l'abbiano copiata: l'evoluzione in genere non avviene così ma avviene casualmente e poi si fissa se è utile).

Quindi, l'utilità negli eucarioti è chiara. Ma perché la trascrizione si è fissata nei procarioti?

È molto probabile che i motivi siano diversi:

- un meccanismo di preservazione del DNA che eviti che il DNA sia continuamente usato;
- il DNA è complessato a proteine e quindi tradurre qualcosa di complesso è difficile (sempre nel caso degli eucarioti perché nei procarioti tale complessità non c'è);
- il DNA è a doppia elica e l'apparato di traduzione è complesso e risulta complicato per una molecola che sia a doppia elica; da qui la necessità di avere una molecola a singolo filamento. Si deve tenere conto che molto probabilmente i primissimi acidi nucleici sono stati proprio gli RNA che poi si sono complicati sotto forma di doppia elica per una questione di protezione delle basi, perché così la parte informativa è maggiormente protetta. Una volta che la molecola si è complicata necessariamente se ne è dovuta formare una più semplice per la sintesi delle proteine.

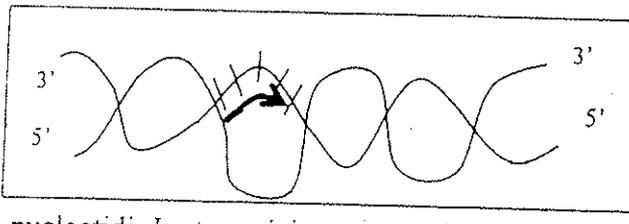
Quindi, nella trascrizione la doppia elica del DNA si deve aprire per fare da stampo e dare ai ribonucleotidi (basi azotate legate ad un ribosio e ad un fosfato) la possibilità di riconoscere le basi complementari; anche la trascrizione si basa sulla complementarietà delle basi così come la duplicazione del DNA. Il meccanismo di base è più o meno lo stesso:

- apertura della doppia elica del DNA;
- messa a disposizione dello stampo;

- entrata dei ribonucleotidi a copiare l'informazione di quel tratto.

Innanzitutto, temporalmente la trascrizione avviene tutte le volte che c'è necessità di quella proteina. Quindi non ha nulla a che vedere con il ciclo cellulare (se non per la sintesi delle proteine necessarie al ciclo), non rispetta tempi precisi come la duplicazione del DNA.

Nello spazio, non tutto il DNA è utilizzato, ma è usato solo quel tratto che codifica per quella proteina; si ricorda che non in tutte le cellule viene utilizzato tutto il DNA, perché negli organismi pluricellulari le cellule sono specializzate. Ciò significa che ogni cellula di una certa linea codifica solo per alcune proteine e quindi avrà tutta una parte di DNA che non viene mai trascritta (le cellule della tiroide faranno essenzialmente tiroxina, mentre quelle muscolari non la fanno mai; i geni però sono sempre gli stessi). Questo è importante perché introduce ad un altro argomento che tratteremo che è la regolazione della sintesi proteica.

| | |
|---|--|
|  | La molecola di DNA è aperta, le basi sono esposte, arrivano i ribonucleotidi [trifosfato] che portano energia per la polimerizzazione, interviene una RNA polimerasi che deve fare il legame tra i vari |
|---|--|

nucleotidi. La trascrizione, come la duplicazione, avviene in direzione 5'-3' cioè legando al C₃ del primo ribonucleotide il successivo ribonucleotide. L'altro filamento, che è antiparallelo, non viene trascritto perché del DNA viene trascritto solo un filamento. Questo per una questione di traduzione: essere basi complementari non vuol dire essere uguali e quindi dare lo stesso aminoacido. Trascrivendo entrambi i filamenti si avrebbero due messaggeri diversi con due prodotti diversi (il che in qualche raro caso avviene ed è un modo per aumentare il prodotto, ma è un caso eccezionale); normalmente viene trascritto un solo filamento, sempre lo stesso per lo stesso gene; se cambia il gene può cambiare il filamento. Si dice che di solito viene trascritto il filamento più "pesante" cioè quello più ricco di basi puriniche che sono le più grandi.

La trascrizione è asimmetrica perché non riguarda entrambi i filamenti.

L'RNA polimerasi è costituita da 5 subunità di cui una di queste (la subunità σ) è necessaria perché avvenga una giusta trascrizione, cioè perché la trascrizione cominci nel punto corretto.

Si è visto che molecole di polimerasi, private della subunità σ , contribuiscono ugualmente alla trascrizione, ma la trascrizione ha inizio in un punto a caso della molecola di DNA.

Inoltre, spesso gli studenti dicono che l'RNA copia il DNA, ma questa terminologia non è completamente corretta perché la molecola di RNA si forma durante la trascrizione, non esiste nessuna azione diretta dell'RNA nella trascrizione; l'RNA viene formato e quindi è un prodotto che è il risultato della trascrizione. E quindi si può dire che durante la trascrizione avviene la formazione dell'mRNA e non che l'mRNA copia il DNA.

Lezione 31 (21/05/01)

Nell'ultima lezione si è cominciato a parlare di dogma centrale e di trascrizione, ricordando sempre che la trascrizione del DNA è alla base della sintesi delle proteine e si era ricordato anche che la sintesi proteica avviene tutte le volte che una certa proteina occorre alla cellula.

Si era anche detto che non tutti i geni si esprimono in tutte le cellule, ma che negli organismi pluricellulari c'è prima la specializzazione e dopo il differenziamento, cioè lo specializzarsi di alcune cellule a svolgere determinati lavori e poi, mano a mano che questa specializzazione si perfeziona, la perdita di alcune funzioni. Ciò implica la non disponibilità del DNA ad essere trascritto, mentre altri geni sono abbondantemente trascritti. Questo problema fa parte di un problema più ampio che è quello della regolazione genica (che vedremo in chiusura di corso).

Abbiamo visto come avviene la trascrizione: negli eucarioti gli RNA che verranno poi tradotti, devono subire delle trasformazioni.

A questo proposito si deve dire che negli eucarioti c'è molto DNA che non è informazionale:

- esiste un DNA altamente ripetitivo, cioè segmenti di DNA che sono costituiti da tratti che si ripetono con molta frequenza (10^6 - 10^7 copie): questo tipo di DNA si ritrova nella zona dei centromeri, nella zona dei telomeri, nelle zone eterocromatiniche che troviamo lungo un cromosoma a formare le bande. Il DNA altamente ripetitivo non è mai informazionale e costituisce l'eterocromatina costitutiva, proprio perché non viene mai trascritto (è condensato e non disponibile ad essere trascritto anche se poi viene duplicato);
- esiste poi un DNA mediamente ripetitivo: questi tratti vengono ripetuti un numero minore di volte (da 10^2 a 10^5 copie). Questo DNA va a costituire i geni ridondanti, cioè geni che devono codificare per un prodotto che serve in maniera particolarmente abbondante: il tRNA e l'rRNA che sono coinvolti nell'apparato di traduzione così come i geni ridondanti danno origine agli istoni (le proteine che vanno a costituire la cromatina). Quindi, al di là degli istoni (che sono delle vere e proprie proteine), negli altri casi non si ha un prodotto proteico ma un RNA che va a svolgere una certa funzione: ciò dimostra che la trascrizione non dà sempre origine a una sintesi proteica ma è comunque una tappa per la formazione di molecole che poi vengono utilizzate dalla cellula. Il DNA mediamente ripetitivo si trova distribuito fra i cistroni (geni) ed ha essenzialmente una funzione regolativa (vedi in seguito);
- infine, in quantità minima, troviamo il DNA a singola copia, cioè quello che ha le cosiddette sequenze informative e i cosiddetti geni strutturali che sono quelli che poi codificheranno per le proteine. Negli eucarioti i geni a singola copia non sono continui nella loro distribuzione, ma presentano tratti che verranno tradotti detti esoni e tratti che non verranno tradotti, detti introni.

In che modo questi tratti non codificanti vengono eliminati dalla molecola dell'mRNA?

L'esclusione degli introni dalla molecola di mRNA avviene con un processo detto splicing ("taglia e cuci") per cui alcuni enzimi intervengono nel tagliare il tratto di DNA che non deve essere tradotto e altri enzimi provvedono a ricucire i tratti che invece devono essere tradotti.

Questo fa sì che l'RNA maturo che arriverà nel citoplasma per la traduzione sia un mRNA più corto di quello nucleare (il processo avviene nel nucleo e riguarda tutti i geni degli eucarioti mentre per i procarioti solo per quelli dell'rRNA e comunque dei geni ridondanti).

Quindi, la lunghezza dell'RNA nascente (anche detto nucleare - nmRNA - o eterogeneo, indicato con la sigla hmRNA, o RNA ad alto peso molecolare) è minore di quella che poi verrà tradotta. Il fatto che l'RNA nascente fosse più lungo di quello che viene maturato e che arriva nel citoplasma, ha permesso di scoprire i geni discontinui: infatti, facendo esperimenti di ibridazione tra mRNA maturo e rispettivo DNA, si è evidenziata la formazione di anse (loop), dovute alle zone introniche che erano state eliminate. Quindi l'mRNA arriva nel citoplasma molto più leggero (con molti meno nucleotidi); ciò fa intuire che non è possibile risalire alla lunghezza di un gene partendo dalla proteina o dal suo mRNA (non c'è una corrispondenza quantitativa esatta).

Principio di colinearità

È la corrispondenza che c'è tra tripletta ed amminoacido e quindi tra gene ed amminoacido.

Oltre a questo tipo di maturazione, esistono anche altri tipi di trasformazioni a cui l'mRNA va incontro.

— la formazione di un cappuccio di guanosina (capping) all'estremità 5' dell'mRNA. Questo cappuccio fa parte del processo di maturazione dell'RNA ed è molto importante perché servirà per riconoscere una sequenza particolare del ribosoma che serve a far riconoscere e a far legare mRNA e ribosoma, una delle strutture essenziali per la traduzione.

— una coda di poli-A, che viene aggiunta all'estremità 3' dell'mRNA; in pratica viene aggiunta una corta sequenza di nucleotidi costituiti tutti da adenina (quindi una coda AAAA).

Oltre per il riconoscimento del ribosoma, il cappuccio di guanosina e la coda poli-A vengono aggiunti per avere una maggiore protezione nel DNA: gli enzimi endonucleasici (cioè quegli enzimi che tagliano il DNA) attaccano preferenzialmente le estremità delle molecole e più difficilmente operano all'interno. Quindi, proteggere la molecola di mRNA con una coda di poli-A (soprattutto) o con un cappuccio di guanosina significa una maggiore sicurezza nella conservazione della molecola stessa.

A questo punto la molecola di mRNA è matura: dopo aver subito lo splicing (rimozione degli introni), il capping, la poliadenilazione, è pronta per arrivare nel citoplasma ed essere tradotta.

Traduzione

È chiaramente un momento più complesso del precedente. Infatti, mentre la trascrizione non è altro che una ricopiatura di una molecola con la formazione di una molecola molto simile (cambia uno zucchero o una base e quindi l'apparato è molto meno complesso), nella traduzione le cose si complicano perché si passa da un linguaggio scritto in nucleotidi ad un linguaggio scritto in amminoacidi e quindi la cosa importante è trovare una chiave di lettura.

Il codice genetico

È un elenco di regole che servono per decodificare l'informazione, per tradurla. È una chiave di lettura che permette di tradurre il messaggio; non ha nulla a che vedere col DNA, se non per il fatto che permette di tradurre il messaggio (che non è altro che la copia del DNA).

Il codice genetico è stato costruito sulla base di una serie di esperimenti che hanno permesso di arrivare ad alcune regole:

il codice è **universale**: qualsiasi **organismo** si osservi si trovano le stesse identiche modalità di **traduzione**. Si sottolinea la parola organismo perché è stato visto che nei mitocondri il codice genetico è un po' diverso: a determinate sequenze corrispondono amminoacidi diversi. Esiste un'eccezione anche fra gli animali (verme) che fa eccezione per un paio di amminoacidi. Per il resto si può dire che per i viventi il codice genetico è universale.

Ma in che modo può avvenire la traduzione dato che le basi azotate sono 4 e gli amminoacidi 20?

Non c'è una corrispondenza 1:1 e nemmeno 2:1 (due basi riconoscono un amminoacido) che darebbe la possibilità di avere 16 combinazioni (4 basi azotate prese a 2 a 2 da $4^2=16$ combinazioni), ancora insufficienti per leggere i 20 amminoacidi.

Perciò si è capito che per poter leggere i 20 amminoacidi occorre combinazioni diverse di 3 basi, facendo un semplice calcolo matematico si ha $4^3=64$, con un esubero di combinazioni rispetto al n° di amminoacidi. Questo primo passo del tutto intuitivo fatto sulla base di un calcolo matematico, è stato poi dimostrato con la costruzione di cortissimi mRNA sintetici, prima tutti uguali (tutta una sequenza di U, o tutta una sequenza di G, o di C, o di A e così via), e poco a poco è stato possibile costruire una tabellina che assegna ad ogni combinazione (delle 64 possibili) un amminoacido. Dalla tabellina, fatta sperimentalmente, si evincono 2 cose:

ad ogni tripletta è stato possibile dare un amminoacido corrispondente, tranne che in 3 casi dove si è visto che a quella tripletta, cioè UAA, UAG, UGA, non corrispondeva nessun amminoacido. Da un RNA sintetico che contenga solo sequenze di questo tipo ripetute (UAA, UAA, UAA e così di seguito) non si ottiene nessuna sequenza amminoacidica; per questo motivo queste 3 triplette sono state chiamate triplette non-senso, cioè triplette che non hanno significato, che non codificano per alcun amminoacido.

Ne rimangono 61 che hanno senso ed è stato provato che più triplette codificano per lo stesso amminoacido: essendo gli amminoacidi 20 e avendo a disposizione 61 combinazioni, ovviamente si potevano avere casi di non significato (come nei casi citati) o casi in cui più triplette codificassero per lo stesso amminoacido. Questa caratteristica prende il nome di codice degenerato termine che intende che più triplette codificano per lo stesso amminoacido.

Quando ciò accade, molto spesso le triplette diverse che codificano per lo stesso amminoacido si differenziano soltanto per l'ultimo nucleotide: questa situazione è chiamata vacillamento della terza base. Il vacillamento della 3a base è sicuramente una sorta di protezione: se avviene una mutazione, cioè un cambiamento del DNA a livello della 3a base, ciò non porta alcuna conseguenza perché la tripletta codifica per lo stesso amminoacido.

Inoltre, questo fa pensare che originariamente il codice genetico fosse a coppie: probabilmente gli amminoacidi utilizzati inizialmente non erano i 20 che oggi conosciamo (forse erano meno) e si è partiti da un codice a coppie che poi si è complicato; a quel punto la 3a base non sempre ha rivestito un gran significato (ha rivestito un significato solo nei casi in cui doveva riconoscere qualcosa di diverso), perché comunque si doveva arrivare da 16 amminoacidi a 20 e ne mancavano solo 4 e

quindi, come già detto, in moltissimi casi, il cambiamento della 3a base non porta a nessuna conseguenza (è questo il caso della valina, dell'alanina, del triptofano, della prolina, della serina, della glicina, dell'arginina e così via).

Si deve ricordare che il DNA non è a triplette, così come non lo è l'mRNA; sono molecole che hanno una loro continuità: il messaggero è soltanto letto a triplette (è un modo di lettura), tant'è vero che si può aggiungere o togliere un nucleotide (vedi mutazioni) e non si ha nessuna modificazione nella molecola se non poi il suo prodotto, per cui tutta la lettura viene ad essere modificata proprio perché le triplette compaiono solo nel momento della lettura e della traduzione. Questo ci porta a dire che la lettura dell'mRNA avviene "senza virgole e senza punteggiature", cioè la molecola è letta di conseguenza.

Un'altra regola data per il codice genetico è che non è ambiguo: ciò vuol dire che una singola tripletta (o codone) codifica per un solo amminoacido.

Quindi, il codice genetico è degenerato perché più triplette codificano per uno stesso amminoacido, non è ambiguo perché una singola tripletta codifica per un solo amminoacido.

Trovata la correlazione tra amminoacidi e nucleotidi (data dal fatto che 3 nucleotidi insieme, cioè un codone o tripletta, codificano per un amminoacido) il gioco era quasi fatto; occorreva soltanto chiarire i meccanismi molecolari che erano alla base della traduzione.

I meccanismi della traduzione coinvolgono alcune molecole presenti nella cellula e che vanno a costituire l'apparato della traduzione.

Queste molecole sono:

i ribosomi, organelli cellulari costituiti essenzialmente da rRNA e proteine, formati da 2 subunità, una maggiore e una minore;

da tRNA che è una singola molecola di RNA che si ripiega grazie al fatto che esistono delle basi omologhe, complementari.

Nel tRNA la "t" sta per "transfer" (dal latino fero, fers = portare), cioè di trasporto in quanto porta l'amminoacido verso l'mRNA messaggero!

L'RNA di trasporto presenta una struttura "a trifoglio"; in realtà nel momento in cui svolge la sua funzione appare ripiegato in una forma a "n" in modo tale da offrire dei siti di riconoscimento e dei siti di reazione. Visto in una forma piana, non tridimensionale, dà la possibilità di specificare alcune cose: è un'unica molecola che parte dall'estremità 5' per arrivare all'estremità 3' che termina con un OH. La forma particolare è dovuta alla presenza di basi formali che sono quindi complementari, ma anche alla presenza di basi cosiddette "anomale" che portano delle modificazioni rispetto alle normali basi e che quindi non si appaiano tra di loro.

La conseguenza è che nelle zone di appaiamento si formano dei bracci e nelle zone di non appaiamento si formano delle anse: le anse sono 3 delle quali una è particolarmente importante perché è l'ansa dell'anti-codone. In questa zona ci sono 3 basi, sempre diverse per ogni tipo di RNA che sono quelle che andranno a riconoscere la sequenza sull'mRNA. Questo è il motivo per cui è chiamata ansa dell'anti-codone. La tripletta andrà a posizionarsi e a riconoscere per complementarietà il codone che si trova sull'mRNA.

Dalla parte opposta, all'estremità 3', viene legato l'amminoacido corrispondente al codone. E' chiaro che il legame dell'amminoacido con il tRNA deve essere mediato da un enzima (amminoacil-tRNA-sintetasi) che abbia 2 siti di riconoscimento e che riconosca sia l'amminoacido, sia l'ansa dell'anti-codone. Perché avvenga il legame tra l'amminoacido e la molecola di tRNA occorre consumare energia; il legame avviene con la liberazione di una molecola di acqua e alla fine del processo di "caricamento" del tRNA si avrà una molecola di tRNA che porterà legata all'estremità 3' l'amminoacido specifico per quell'anti-codone. Il tRNA così costituito (legato all'amminoacido) si chiama **tRNA attivato o carico** ed è pronto per dar seguito alla traduzione.

Numero dei tRNA

In una cellula ci sono un numero di tRNA compreso tra 20 e 61, ma non si può sapere con sicurezza perché è molto probabile che la terza base non abbia un grande significato nel riconoscimento del codone da parte dell'anti-codone, cioè che il vacillamento della terza base valga anche qui e quindi è probabile che tutte le volte che anticodoni tRNA portino lo stesso amminoacido, sia sufficiente il riconoscimento delle prime due basi perché avvenga il legame tra il rispettivo amminoacido e il rispettivo tRNA. Quindi è sicuramente un numero superiore a 20, ma potrebbe essere anche inferiore a 61. **Certamente non abbiamo tRNA che corrispondano ai tre codoni di non-senso**, cioè non ci sono RNA di trasporto che abbiano come anticodone le basi complementari alle tre triplette non-senso. Perciò si può dire che le triplette non-senso sono triplette che non codificano per nessun aminoacido e che quindi non hanno tRNA corrispondenti (per loro manca il tRNA).

I ribosomi

Sono l'altra struttura necessaria perché avvenga la sintesi delle proteine. Sono costituiti da 2 subunità, una maggiore e una minore; sono essenzialmente costituiti da proteine ed rRNA; le 2 subunità si trovano in genere staccate; **si formano nel nucleolo**. Queste di cui abbiamo parlato sono subunità di tipo strutturale, ma esistono anche due subunità di tipo funzionale, cioè si possono riconoscere nel ribosoma delle zone (compartimenti) che non sono tali per struttura (cioè non sono presenti setti di separazione) ma dal punto di vista funzionale hanno delle funzioni diverse.

Ci si riferisce al **sito A** e al **sito P** che sono **esclusivamente siti funzionali**, cioè non è possibile separare il sito A dal sito P che sono strutturalmente un tutt'uno ma cambiano dal punto di vista funzionale; in particolare il sito A deriva il suo nome dal fatto che è il sito **accettore** (è il sito che accetta il tRNA); per sito P si intende sito **peptidico** o sito **peptididico** (vi avviene il legame peptidico). **Il ribosoma si potrebbe definire come un tavolo di lavoro, un supporto che contiene i siti adatti perché l'mRNA possa essere riconosciuto.**

La sintesi proteica avviene nel citoplasma: va ricordato però che nel citoplasma c'è un'altra struttura in cui avviene sintesi proteica (oltre che nei mitocondri e nei cloroplasti) che è il Reticolo Endoplasmatico Rugoso (la differenza tra le proteine che vengono sintetizzate nei ribosomi liberi e quelle che vengono sintetizzate nel reticolo è che queste ultime sono quelle che poi passano per il Golgi e vengono secrete; quindi, dal punto di vista molecolare la sintesi è identica dappertutto, ma qui c'è un significato diverso per il tipo di proteina che si viene a produrre).

La traduzione vera e propria è un processo molecolare molto complesso ma anche molto ripetitivo: una volta entrati nel meccanismo, le cose si semplificano.

Didatticamente si possono distinguere nella traduzione le seguenti fasi: 1) **fase dell'inizio**, 2) **fase dell'elongazione**, 3) **fase di terminazione**. È chiaro che l'inizio e la terminazione avvengono una volta sola, la fase elongativa è molto più lunga e la sua durata dipende dalla lunghezza della proteina che deve essere codificata; si tratta di aggiungere amminoacidi in modo tale che si possa formare la catena polipeptidica.

1) **Fase d'inizio**: prevede l'unione tra la **subunità minore dei ribosomi** e l'**mRNA**. Il cappuccio che si trova all'estremità 5' dell'mRNA maturo serve proprio per il riconoscimento e per l'unione con la subunità minore del ribosoma; è un'unione molto precisa, corretta, avviene con consumo di energia e soprattutto con l'intervento di un **fattore proteico** detto **IF₃** (fattore di inizio n° 3). Il **secondo momento** (che fa parte sempre della fase di inizio) vede l'arrivo di un **primo tRNA** che va a riconoscere la **prima tripletta**, il **primo codone** (deve essere complementare al primo codone) che si trova già nel sito P. Quindi eccezionalmente per la fase di inizio il primo tRNA va a localizzarsi nel sito P. Anche questo secondo momento è mediato da un fattore detto **IF₂**. Il **terzo momento** che conclude la fase di inizio vede il **ricongiungimento della subunità maggiore** con la **subunità minore del ribosoma**. Anche in questo caso interviene un fattore detto **IF₁**.

Il ribosoma è così completo e la situazione è la seguente: la molecola di mRNA è come intrappolata tra i due ribosomi ed espone le basi; le prime tre basi si trovano nel sito P e sono già state riconosciute dal rispettivo tRNA; rimane esposta, pronta per essere riconosciuta, la seconda tripletta. Da notare che la prima tripletta che viene riconosciuta è **sempre la stessa**: tutti gli mRNA cominciano con la **stessa tripletta AUG**. Questo non è difficile da immaginare perché nella zona in cui comincia la trascrizione, detta **promotore** in cui si lega l'RNA polimerasi (la zona d'inizio della trascrizione), le prime basi che si incontrano dopo il promotore sono sempre **AUG** (che corrisponde alla metionina). **Quindi tutte le proteine degli eucarioti cominciano con l'amminoacido metionina**. Nei procarioti la metionina viene modificata successivamente in **n-formil-metionina**, cioè al gruppo amminico è legato un gruppo formilico. Si è pensato che dal punto di vista evolutivo questo servisse per dare la **giusta direzione di sintesi** delle proteine (sappiamo che le proteine iniziano con un gruppo amminico e terminano con un gruppo carbossilico) e che questa modificazione della metionina si sia perduta in seguito perché il meccanismo era diventato così preciso da non essere più indispensabile questa protezione. In effetti il gruppo formilico legato all'azoto impediva qualunque altro legame e quindi obbligava il secondo amminoacido a legarsi al gruppo carbossilico.

2) **Fase di elongazione**. Nel sito A del ribosoma si ha una tripletta pronta per il riconoscimento, arriva il tRNA complementare (nella cellula si ha un pool di tRNA; quindi ci saranno dei tentativi di legame anche con altri, ma quando ci sarà quello complementare avviene il riconoscimento). **A questo punto entrambi i siti del ribosoma sono occupati dal tRNA e due amminoacidi si trovano uno accanto all'altro**: avviene il legame peptidico. Il primo

N.B. in realtà è il ribosoma
a spostarsi fisicamente,
non è l'mRNA.

amminoacido rimane legato all'amminoacido successivo (si è quindi staccato dal tRNA); il tRNA è "scarico" e lascia il sito P libero. A questo punto avviene una **traslocazione** (o **transpeptidazione**), **processo** che avviene con consumo di energia e con l'intervento di fattori proteici: l'**mRNA si sposta fisicamente**, cioè scivola in modo che il tRNA che stava nel sito A si porta nel sito P e nel sito A si viene a trovare una tripletta che deve essere ancora riconosciuta. Questa tripletta è "esposta" e viene riconosciuta da un altro tRNA; la situazione è la seguente: un amminoacido che è senza tRNA, un amminoacido che è ancora legata al suo tRNA e che si trova vicino ad un altro amminoacido che anche era legato al suo tRNA. Si rompe il legame con il primo tRNA, si forma il legame peptidico tra il secondo amminoacido e il terzo, il tRNA scarico se ne va, l'mRNA scivola e si porta nel sito P, rimane libero il sito A con una tripletta esposta ed il ciclo si ripete. **Quindi tutta la fase di elongazione non è altro che un formarsi del legame peptidico, un andar via del tRNA, una traslocazione dell'mRNA che porta a liberare il sito A, un ulteriore riconoscimento, un ulteriore legame peptidico, un'ulteriore traslocazione e così via a ripetizione.** L'elongazione ha fine quando arriva nel sito A una **tripletta non-senso** a cui non corrisponde nessun amminoacido (non ha nessun tRNA). Per questo motivo le triplette non-senso vengono anche dette **triplette di STOP** (non confondere la causa con l'effetto: l'essere triplette di stop è l'effetto di essere non-senso. La tripletta di per sé è non-senso, questa sua proprietà fa sì che poi si comporti come tripletta di stop). Quando viene esposta la tripletta di stop al sito A, non c'è nessun tRNA che sia in grado di complementare con quella tripletta e quindi automaticamente la sintesi della proteina ha termine con la fuoriuscita dell'ultimo tRNA e poi con l'intervento di **alcuni fattori di rilascio** che prima provvedono a **rilasciare la proteina e poi a separare nuovamente le due subunità.**

Questo è il processo semplificato; in realtà la traduzione avviene con l'intervento di una serie di fattori proteici che servono a rendere il meccanismo molto più corretto, senza grossi rischi di errore. Va aggiunto che l'mRNA che scivola e che viene traslocato può incontrare un altro ribosoma e quindi contemporaneamente si ha la traduzione ripetuta dello stesso mRNA su tanti ribosomi che vanno a costituire quelli che si chiamano **poliribosomi**, cioè una catena di ribosomi (uno accanto all'altro) sulla quale mano mano che l'mRNA cammina viene agganciato da un nuovo ribosoma e quindi comincia una seconda catena. Ciascun ribosoma ha una catena peptidica, ma contemporaneamente possiamo avere la sintesi di più catene peptidiche. Ad un certo momento l'mRNA non si lega più ai ribosomi, viene denaturato (si dice che ha un suo turn-over), cioè dopo un po' invecchia e non viene più utilizzato. Ciò costituisce una sorta di protezione in quanto nella cellula ci sono enzimi endonucleasici e quindi nel tempo aumenta il rischio che si possano perdere dei pezzi; perciò, dopo un certo numero di traduzioni la molecola di mRNA viene avviata nei lisosomi per essere ingerita.

Differenze tra procarioti ed eucarioti nella sintesi proteica

- 1) i **ribosomi** dei procarioti sono più piccoli di quelli degli eucarioti (differenza strutturale);
- 2) la **metionina formilata** (procarioti); AUG



- 3) **mRNA policistronico nei procarioti.** Considerando cistrone=gene, ciò vuol dire che una molecola di mRNA non è la trascrizione di un unico gene ma quella di più geni che sono situati nel DNA uno accanto all'altro. Il DNA degli eucarioti è costituito da sequenze uniche inframezzate da una notevole quantità di DNA che non deve essere trascritto; sarebbe quindi impossibile pensare che più geni siano trascritti insieme. Nei procarioti, invece, i geni sono tendenzialmente uno accanto all'altro, cioè si dice che sono **contigui**. Sono contigui geni tra loro correlati cioè, se servono un certo numero di enzimi per arrivare a costruire una data sostanza, i geni che codificano per gli enzimi che porteranno alla fine della catena metabolica a formare quella sostanza, sono uno accanto all'altro; sono geni contigui perché sono fra loro correlati nella funzione;
- 4) **maturazione dell'mRNA:** negli eucarioti riguarda tutti i geni, negli procarioti solo i geni dell'rRNA. Queste sono molecole che nascono molto lunghe (rRNA nasce di 45S e poi alcuni tratti vengono rimossi);
- 5) trascrizione e traduzione negli eucarioti sono **divise nel tempo e nello spazio**; sono divise nello spazio perché la **trascrizione avviene nel nucleo** mentre la **traduzione avviene nel citoplasma**. Sono quindi necessariamente anche divise nel tempo in quanto si deve fare prima la trascrizione e poi la traduzione. Nei procarioti, invece, non c'è una divisione di spazi (non c'è membrana nucleare) e quindi c'è la possibilità che ci possa essere anche una contemporaneità. In pratica, la **trascrizione e la traduzione possono avvenire nel medesimo tempo**. Infatti il tratto di DNA messaggero che si forma può essere già tradotto; questo è legato al fatto che, essendo l'RNA messaggero dei procarioti policistronico, dopo che un cistrone è stato trascritto, ne inizia la traduzione mentre gli altri continuano ad essere trascritti. Questo fa sì che nei procarioti trascrizione e traduzione si possano considerare contemporanee;
- 6) diverso **numero dei fattori proteici** che intervengono nella trascrizione e nella traduzione.

Cambiamenti del DNA

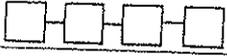
Si è detto più volte che un gene viene identificato attraverso i differenti fenotipi che esprime: se un gene non ha alternative alleliche, difficilmente viene identificato come tale. Alla base del passaggio genotipo/fenotipo c'è il più delle volte una catena metabolica, cioè la possibilità che il prodotto sia il risultato di più trasformazioni e quindi dell'intervento di più geni. Tuttavia se si parte dal presupposto che ci siano delle alternative alleliche si deve anche immaginare che il DNA in qualche modo possa essere modificato: si parte da una condizione di partenza più frequente e che per questo è detta "selvatica" e si arriva a qualcosa che viene modificato perché dia l'alternativa allelica. È perciò interessante studiare in che modo il DNA può cambiare.

Si devono quindi studiare le basi strutturali ed i motivi per cui il DNA può cambiare e se questo cambiamento avviene in maniera spontanea o indotta. Ci occupiamo pertanto di quelle che vengono chiamate mutazioni; in particolare partiamo da quelle geniche, relative alla molecola del DNA. Perciò, cerchiamo di stabilire in che modo il DNA può cambiare, in quale punto e se il cambiamento è spontaneo o no.

Riprendendo brevemente il discorso sulle catene metaboliche, segnaliamo che nell'uomo a volte queste possono anche incrociarsi: l'albinismo è una condizione genetica che può dipendere da più geni perché si parte dall'amminoacido tirosina che viene trasformato poi in melanina. In mezzo ci sono una serie di passaggi che portano alla formazione del prodotto finale melanina. È sufficiente che uno di questi passaggi venga bloccato perché non si abbia la formazione di melanina e quindi si manifesti l'albinismo. Dato che i passaggi sono tanti, tanti possono essere i geni che interrompono questa catena: per esempio si può avere la mancanza di tirosina. Non a caso le persone malate di ipotiroidismo che hanno carenze di tirosina (il loro problema è la carenza dell'ormone tiroideo tiroxina), molto spesso sono persone pallide, con la pelle molto fragile perché il tutto si riflette anche su questa catena metabolica.

Mutazioni geniche

Se si ha una sequenza di basi del seguente tipo,

| | Sequenze di basi | | | | Polipeptide | Fenotipo |
|--------------------------|------------------|--------|----------|---------|--|-----------|
| | ABC | ABC | CBA | BCA ... | | |
| Tipo selvatico | ABC | ABC | CBA | BCA ... |  | Selvatico |
| Sostituzione di una base | ABC | ABC | ABA* | BCA ... |  | Mutato |
| Inserzione di base | ABC | (*)CAB | CCB | ABC ... |  | Mutato |
| Delezione di base | ABC | ABC | CBA C | CA ... |  | Mutato |

i cambiamenti che possono avvenire a carico del DNA sono: MUTAZIONE PUNTIFORME

- sostituzione di una base In questo caso, la C è stata sostituita dalla A*. La conseguenza è una tripletta diversa che potrebbe dare origine ad un amminoacido diverso;

- inserzione di una base Una base viene ad un certo punto inserita nel DNA, cioè la normale sequenza (ABC.. ABC..CBA) viene sconvolta dall'inserzione di una base. La conseguenza è

uno scivolamento della cornice di lettura perché non si avranno più le solite triplette ma, avendo messo una base in più, da quel momento tutta la lettura cambierà. Quindi, un' inserzione di base, così come la perdita di una base, darà sempre origine ad un cambiamento della proteina, cioè darà sempre origine ad un prodotto diverso in quanto non si tratta di sostituire una singola base ma di inserire o togliere una base e quindi modificare la cosiddetta cornice di lettura (è come se in un libro si inserisse o si strappasse una pagina: da quel punto in poi il significato ne è modificato).

Perciò le mutazioni da inserzioni e da delezioni sono sempre "miss-sense", cioè di senso sbagliato (danno un prodotto diverso da quello di partenza).

Tornando alle sostituzioni di una base, il cambiamento della base comporta una tripletta diversa:

- si può avere un amminoacido diverso ed in tale caso si ha una mutazione "miss-sense",
- si può avere una tripletta che codifica per lo stesso precedente amminoacido. Frequentemente, specialmente se la sostituzione avviene nella 3a base, è molto probabile che l'amminoacido non cambi. In questo caso si ha una mutazione "same-sense": la mutazione c'è ma il senso, il prodotto, rimane lo stesso.

"Same-sense" non vuol dire necessariamente che la sequenza amminoacidica sia identica cioè che la mutazione sia tale che non venga a cambiare quel singolo amminoacido. Potrebbe anche comportare che l'amminoacido sia diverso ma in grado di svolgere le stesse identiche funzioni (un amminoacido simile): laddove sia necessario un amminoacido idrofilo se ne ha un altro con le stesse caratteristiche e quindi è probabile che la funzione della proteina non si modifichi (non cambia il fenotipo).

Mutazioni "non-sense"

Avvengono quando la sostituzione di base da origine ad una tripletta non-sense (per esempio UGA). Ciò porta all'arresto della sintesi della proteina e la catena polipeptidica sarà più corta di quella di partenza ed il cambiamento potrebbe essere anche molto drastico.

In generale la sostituzione di base modifica una singola tripletta (sono anche definite mutazioni puntiformi), mentre le inserzioni e le delezioni modificano tutta la lettura successiva, cioè modificano drasticamente la sequenza amminoacidica (non si può più parlare di mutazioni puntiformi).

Origine delle mutazioni. Mutazioni spontanee

Nel DNA abbiamo una sequenza di basi azotate: uno dei meccanismi con cui avvengono le sostituzioni di base è lo shift tautomerico cioè la possibilità che un atomo, in particolare di H, salti dall'atomo al quale è legato ad un atomo che gli sta accanto. Questo fenomeno porta alla trasformazione di una base: per esempio, la timina che normalmente si trova nella sua forma comune, esiste anche in una forma enolica che è il risultato di uno shift tautomerico.

Questo significa che il doppio legame che prima c'era tra l'N e l'O si perde e l'H che prima era legato all'N si lega all'O. La conseguenza immediata è che l'O perde il doppio legame con N; quindi, dalla forma comune che vedeva l'O ossidato con un doppio legame, si arriva ad una forma enolica che vede la presenza di un OH. Ovviamente questo cambia il tipo di legame che la timina

può formare: se normalmente forma due legami con l'adenina (l'O non si lega), in questo caso ha la possibilità di formare 3 legami H e quindi non si lega più con l'adenina (come normalmente avviene), ma si lega con la guanina.

La conseguenza è un appaiamento di basi che non è più quello complementare.

Se lo shift tautomerico avviene nel momento in cui si verifica la duplicazione, la timina non viene più riconosciuta da un'adenina ma da una guanina e da quel momento in poi in quel filamento ci sarà una forma particolare di timina che sarà legata alla guanina. Quindi, da un DNA che era A-T, alla duplicazione ci si attende la separazione dei due filamenti e la formazione di due accoppiamenti A-T e T-A; ma se la timina ha lo shift tautomerico legherà la guanina.

Finita la duplicazione, questa molecola di DNA ha un legame T-G; avviene una seconda duplicazione di DNA: la guanina adesso riconosce la citocina e la timina, dato che lo shift tautomerico è molto labile, con molta probabilità è tornata alla forma comune e legherà normalmente l'adenina. Il risultato è che a questo punto la mutazione si è fissata perché sulla nuova molecola di DNA si è fissata una situazione perfettamente normale, cioè una guanina con una citosina. Perciò si è introdotta una sostituzione di base. Se ciò avviene in una cellula somatica è probabile che la cellula venga persa o che produca una proteina leggermente diversa ma che non porta a cambiamenti visibili sul totale delle cellule. Se invece ciò avviene in una cellula germinale, ci sarà una mutazione che verrà trasmessa e che a lungo andare si fisserà nella popolazione dando una forma diversa di quello che era l'allele di partenza.

Questi meccanismi avvengono con una certa frequenza anche se poi molto spesso interviene il riparo perché nel momento in cui la timina è legata alla guanina la timina potrebbe tornare alla forma comune (la tautomeria è un processo molto rapido e l'H tende a tornare al suo posto) e ciò comporterebbe la mancanza del terzo legame H da formare con la guanina; la molecola è instabile e può intervenire il riparo eliminando la guanina e sostituendola con quella giusta.

Se la timina permane nello stato enolico e quindi il riparo non avviene e avviene una duplicazione del DNA, la mutazione si fissa con la formazione di un nuovo allele che se viene trasmesso nelle generazioni può rimanere un allele raro (bassa frequenza nella popolazione) o diventare un allele frequente se particolarmente utile e viene selezionato nel tempo.

Ciò che è stato descritto per la timina può avvenire anche per le altre basi azotate: per esempio anche la guanina può avere una forma enolica mentre le altre due basi possono avere una forma amminica ed imminica.

Quindi tutte le basi azotate possono subire lo shift tautomerico e dare origine a complementarietà errate che poi possono permanere nel tempo e dare origini a mutazioni.

Si ricorda che la singola sostituzione di una base può dare origine a cambiamenti anche drastici laddove riguardi amminoacidi o proteine di particolare importanza. Per esempio, la falcemia (globulo rosso a forma di falce, data dal non corretto trasporto di O₂ da parte dell'Hb) è dovuta esclusivamente ad una mutazione puntiforme, cioè alla sostituzione di una singola base.

Nel caso in cui la normale tripletta CTC si modifica in CAC nel DNA, l'acido glutammico risulta variato in valina e questo unico cambiamento tra la molecola normale e quella mutata, porta ad

avere un'emoglobina così cambiata da non essere più in grado di trasportare correttamente l'O₂ e dare l'anemia falciforme.

Lezione 32 (22/05/01)

La scorsa lezione si è parlato dei meccanismi spontanei di insorgenza di mutazioni.

Bisogna aggiungere qualcosa sull'INSERZIONE e DELEZIONE di una base:

- delezione: tutte le volte che nel DNA si formano delle piccole anse (loop) si ha la perdita di una base (delezione); a volte durante la duplicazione del DNA (in cui sono coinvolti moltissimi enzimi) lo stesso DNA può formare delle piccolissime anse e può capitare che il DNA non si distenda più e che il materiale capitato all'interno dell'ansa venga perso. In questo modo, quindi, si possono perdere (con una frequenza molto bassa) circa uno o due nucleotidi.
- inserzione: il meccanismo che si ipotizza sia possibile è una sorta di ricombinazione illegittima, cioè un appaiamento (che può accadere eccezionalmente anche in mitosi o in meiosi), che non sia del tutto legittimo (scivolamento di una sola base, un solo nucleotide). Se il DNA non si appaia in maniera perfetta, cioè è scivolato solo di una base, e avviene un crossing-over, inevitabilmente si deve prevedere che ci sarà l'inserzione da una parte e la delezione dall'altra di materiale genetico.

MUTAZIONI SPONTANEE

Per quanto riguarda le mutazioni spontanee bisogna dire che esiste anche la radioattività di base che può sicuramente indurre qualche mutazione, ma questa radioattività di base che esiste nell'atmosfera (raggi cosmici) non è sufficiente a spigare il tasso di mutazioni ($10^{-6} - 10^{-10}$).

Di contro, c'è la possibilità che le mutazioni possano insorgere in conseguenza all'esposizione di un mutageno, che può essere CHIMICO o FISICO.

Mutageni chimici

Per mutageni chimici sono intese tutte quelle sostanze che sono capaci di indurre danni.

Per esempio l'AMALGAMA, usata in campo odontoiatrico, induce ad una serie di quadri clinici molto pesanti e che alcuni di questi casi possono essere spiegati anche con danni al DNA.

I meccanismi dei danni al DNA possono essere causati da un'eventuale rottura della catena e quindi da un'eventuale ricongiungimento che potrebbe ricondurre ad una serie di inserzioni o delezioni.

Esistono delle sostanze che sono note in quanto inducono ad una SOSTITUZIONE DI BASE:

1) analoghi delle basi

è possibile indurre una sostituzione di basi con un meccanismo simile allo shift tautomerico, quando si inserisce nel DNA una base analoga ad una normale ma che ha una caratteristica particolare.

Una di queste sostanze è la 5.bromouracile (BU) che è del tutto simile alla timina, eccetto che per un atomo di bromo che la fa identificare come una sostanza diversa. Perciò, la BU è un analogo di base cioè si comporta in maniera identica alla base cui somiglia, ma va molto più frequentemente incontro allo shift tautomerico e quindi dà origine a mutazioni.

La conseguenza è che molto più frequentemente si appaia in maniera errata con la guanina piuttosto che con l'adenina.

Gli errori di appaiamento possono essere di incorporazione o di replicazione e in entrambi i casi si va incontro ad una sostituzione, cioè un cambiamento nella catena di DNA;

— errore di incorporazione: consiste nel fatto che la BU viene incorporata già allo stato ENOLICO e quindi in una normale catena (che in partenza era G-C), viene incorporata la BU che si lega alla guanina; una catena di DNA continua la sua duplicazione regolarmente (G che

poi si appaierà con C); quando lo shift tautomerico rientra, cioè la BU ritorna al suo stato normale, si appaierà con l'adenina. Da questo momento in poi si è fissata una mutazione e tutte le volte che la catena si duplicherà alla guanina si appaierà la timina e alla BU si appaierà l'adenina (sostituzione di base). Questa sostituzione di base avviene incorporando già una base anomala.

— errore di replicazione: consiste nel fatto che la BU viene incorporata allo stato NORMALE e quindi si appaia regolarmente con l'adenina e soltanto durante la successiva duplicazione del DNA, la BU entra in uno stato enolico e quindi si appaia alla guanina e non più all'adenina. Da questo momento in poi anche qui si avrà la coppia C-G mentre in partenza si aveva una coppia A-T.

Qualcosa di simile avviene con la **2 AMINOPURINA (AP)**, un altro analogo di base, questa volta dell'adenina. La AP si appaia normalmente con la timina, tranne che dopo aver eseguito lo shift tautomerico in quanto riconosce la citossina perché è in grado di effettuare tre legami idrogeno e non più due. Ancora una volta per questo analogo lo shift tautomerico avviene molto più frequentemente di quanto avvenga per le normali basi e quindi la frequenza di mutazione è molto aumentata. Anche in questo caso si può avere un errore di incorporazione o di replicazione che portano ad avere nel 1° caso il passaggio da una coppia G-C ad una coppia A-T e nel secondo caso da una coppia A-T ad una coppia G-C.

Ci sono un'altra serie di sostanze chimiche che sono mutagene, tra cui l'ACIDO NITROSO. L'acido nitroso (HNO_2) è un agente ossidante, capace di DEAMINARE le basi (toglie loro i gruppi amminici); agisce quindi sull'adenina, sulla citossina e sulla guanina (cioè agisce sulle tre basi che hanno gruppi amminici).

La deaminazione trasforma queste basi in altre (per esempio l'adenina viene modificata in ipoxantina: al posto del gruppo amminico c'è un O; la citossina viene modificata in uracile; la guanina viene modificata in xantina).

L'errore avviene in quanto tutte le volte che l'adenina viene trasformata in ipoxantina, non riconosce più la timina ma si lega alla citossina; la citossina, trasformata in uracile, si accoppia con l'adenina (uracile simile alla timina; infatti nell'RNA sostituisce la timina); la deaminazione della guanina, invece, non porta a conseguenze perché la guanina si modifica in xantina che però continua ad appaiarsi con la citossina. Quest'ultimo è l'unico caso in cui non si ha un effetto visibile dell'intervento della sostanza mutagena. /

Un'altra classe di mutageni molto importanti è rappresentata dai cosiddetti agenti alchilanti

Sono sostanze che hanno una struttura che presenta gruppi ALCHILICI, estremamente reattivi. I primi esperimenti (1930-40) che vennero fatti sulle mutazioni indotte del DNA furono effettuati con la mostarda azotata, agente alchilante che modifica in modo particolare le PURINE: vengono aggiunte alle purine i gruppi alchilici reattivi che quindi destabilizzano la catena del DNA.

Un'ultima categoria di sostanze mutagene (molto numerose) è rappresentata dalle ACRIDINE che sono dei coloranti basici.

Sono i cosiddetti intercalanti di basi, cioè si vanno a frapponere tra le basi del DNA formando dei complessi stabili (quindi non portano nessuna modificazione alle basi). Il problema a cui si giunge è che tutte le volte che una molecola di DNA si appaia con una omologa, vengono fuori immediatamente dei crossing-over non bilanciati in quanto le acridine occupano un vero e proprio spazio fisico e quindi l'appaiamento dei cromosomi omologhi diventa non corretto e questo dà origine a inserzioni e delezioni di basi.

A livello di prole, la modificazione avviene a livello delle cellule germinali, mentre se un individuo è molto esposto a questa sostanza, può andare incontro a modificazioni del DNA con perdita di nucleotidi che può sfociare in malattie molto gravi: per esempio ultimamente è stato messo in rilievo l'insorgere del cancro a causa della rottura della molecola di DNA.

AGENTI FISICI che possono indurre a mutazioni del DNA.

Di questa categoria fanno parte:

- raggi ultravioletti agiscono sulle PIRIMIDINE, in modo particolare sulla TIMINA. Provocano la formazione di dimeri di timina. Quando questa base viene colpita dai raggi UV, avviene un legame tra due timine con la formazione del dimero (ovviamente devono esserci due basi vicine). Il fatto che le due timine si leghino tra loro provoca una serie di problemi quanto riguarda l'accoppiamento delle basi.
- radiazioni ionizzanti raggi X, β , γ . Sono le radiazioni che hanno un energia elevata, legata a piccole lunghezze d'onda (hanno un forte potere di penetrazione), quindi arrivano con particolare facilità nelle cellule germinali e in particolar modo nel DNA. La caratteristica delle radiazioni ionizzanti è quella di attraversare gli atomi delle molecole e di staccare elettroni producendo, appunto, ioni. Questi elettroni liberi continuano poi a viaggiare e vanno a colpire altre molecole instaurando così una catena di reazioni chimiche ed il danno al DNA diventa particolarmente importante, in quanto l'energia rilasciata da questi elettroni può colpire il DNA, causandone molto spesso la rottura.

Insieme alla perdita di elettroni (e quindi alla formazione di ioni) si possono formare anche dei radicali liberi (il radicale libero è un atomo elettricamente neutro ma con un elettrone spaiato; quindi l'elettrone è particolarmente reattivo e induce ad una serie di reazioni che sono particolarmente dannose agli organismi in generale e per il DNA in particolare).

L'azione delle radiazioni ionizzanti può essere diretta o indiretta, cioè la radiazione può colpire direttamente il DNA o dare origine ad una serie di reazioni a catena che hanno come bersaglio finale il DNA; rimane il fatto che la molecola di DNA viene rotta e tale rottura può permanere e quindi dare origine a mutazioni di tipo cromosomico, cioè non tanto a livello della sostituzione o perdita di un nucleotide quanto alla modificazione del cromosoma stesso.

Tuttavia, poiché possono intervenire i sistemi di riparo del DNA che tendono a riparare la rottura causata dalle radiazioni o dagli agenti chimici, può succedere che il sistema di riparo possa indurre a sua volta a degli sbagli e quindi dare origine a mutazioni di tipo genico (cioè nel momento in cui il meccanismo di riparo si accinge a sostituire la zona che è stata danneggiata, può accadere che nel fare ciò introduca una base sostituita e quindi possa portare alla perdita del nucleotide).

Lezione 33 (24/05)

Nell'ultima lezione avevamo definito le traslocazioni come lo spostamento di un tratto di DNA da un cromosoma ad un altro o sullo stesso cromosoma; inoltre, quando sono coinvolti due cromosomi la traslocazione può essere reciproca o meno, ovverosia un pezzo di cromosoma 18 si sposta sul 13 e viceversa. L'appaiamento dei cromosomi, che è l'unico momento di difficoltà che presenta un individuo portatore di una traslocazione, avviene con la formazione di una croce che consente ai cromosomi di riconoscere i tratti omologhi e quindi di effettuare un appaiamento corretto.

Tuttavia si è visto che questo appaiamento a croce, proprio per il fatto che i cromosomi rimangono uniti all'estremità e quindi formano una sorta di cerchio, può dare origine ad un orientamento diverso sulle fibre del fuso che risulta in 3 tipi di segregazione:

- due segregazioni "adiacenti" che danno origine a gameti non completi, non bilanciati e che quindi non andranno incontro alla maturazione,
- una segregazione alternata che invece darà origine a 2 gameti bilanciati che andranno incontro alla fecondazione regolarmente. Di questi 2 gameti uno dei due porterà la traslocazione, quindi darà origine a un individuo uguale al genitore.

La traslocazione robertsoniana

Prende il nome dal Ricercatore che l'ha descritta per primo (Roberts).

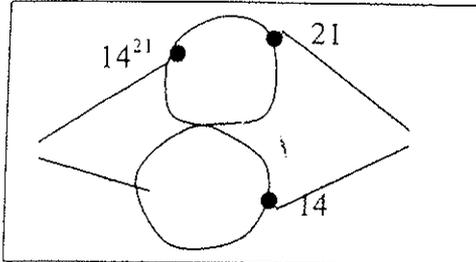
Riguarda i cromosomi acrocentrici, cioè la serie D e G del cariotipo umano (il cariotipo viene, oltre che numerato per coppie di cromosomi, raggruppato per lettere a seconda che i cromosomi siano morfologicamente simili). I cromosomi del gruppo D e G, che sono rispettivamente il 13, 14, 15 (D) e 21, 22 (G), sono appunto i cromosomi acrocentrici.

In un cariotipo di una persona che porta una traslocazione robertsoniana si può vedere una particolarità: contando i cromosomi sembra che ne manchi uno; in realtà il cromosoma è traslocato. Nell'uomo si ha un cariotipo con 45 cromosomi il che inizialmente può dare l'idea di una variazione numerica, mentre è una mutazione di tipo strutturale perché il cromosoma 21 si è spostato sul 14. Perciò si ha la formazione di un cromosoma 14²¹, cioè un cromosoma 14 con un 21 traslocato.

Se le traslocazioni consistono nello spostamento di un tratto di DNA da un cromosoma all'altro, cosa è successo in questo caso dove si ha anche una riduzione del numero? >>

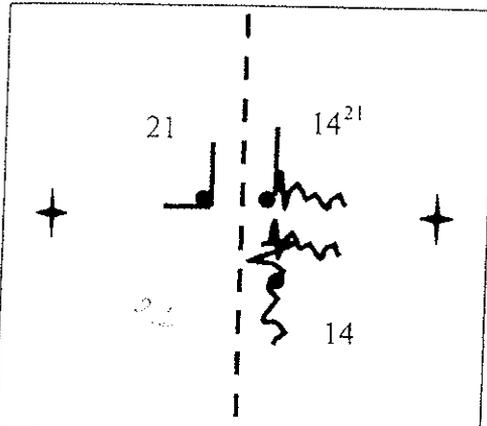
Si è avuta una traslocazione reciproca, cioè la rottura è avvenuta a livello del centromero, sia per un 14 che per un 21, le due braccia lunghe del 21 e del 14 si sono unite e si sono unite anche le due braccia corte. Se questa situazione permanesse così come è iniziata si avrebbero regolarmente 46 cromosomi. Di fatto le due braccia corte che portano pochissimo materiale genetico vengono perse, e questo porta ad un cromosoma in meno, ma senza perdita importante di materiale genetico, per cui un individuo con traslocazione robertsoniana presenta una situazione clinica perfettamente compatibile con quella di un cariotipo normale. Come tutte le traslocazioni, anche questa porta ad infertilità, ma in questo caso c'è una storia familiare che mette sull'avviso: casi ripetuti di aborto in una famiglia o nella coppia in particolare, ipofertilità, o casi di sindrome di Down cosiddetti da "traslocazione", inducono una coppia a fare l'analisi del cariotipo (si è abituati a pensare che la sindrome di Down sia data dalla trisomia 21; in realtà ci può essere anche questo caso particolare). Se si verifica che effettivamente uno dei genitori porta una traslocazione robertsoniana, in particolare una 14²¹, c'è un forte rischio di procreare figli con sindrome di Down.

Infatti, nell'appaiamento dei cromosomi alla meiosi, nella "croce" si vede un cromosoma in meno (perché abbiamo detto che l'altro esito della traslocazione viene a perdersi). Quello che si deve sempre tenere presente è la segregazione che avviene in anafase; nella scorsa lezione abbiamo detto che la segregazione può essere **adiacente o alternata**:

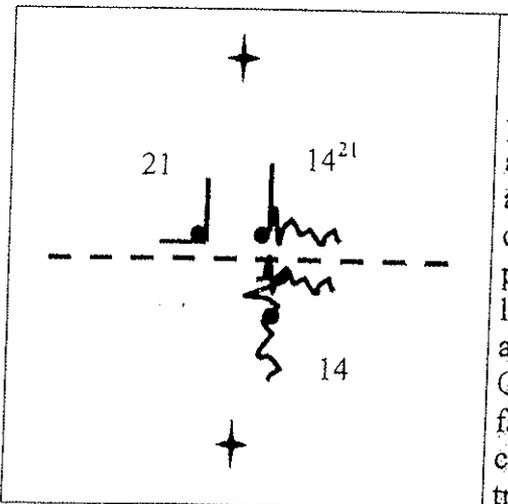


nell'alternata si forma una specie di "8", per cui tutto quello che è da una parte si è ribaltato: si ha un cromosoma 21 e un cromosoma 14 che migrano insieme e il cromosoma traslocato; quindi si avranno 2 gameti perfettamente funzionanti, un gamete che porta la traslocazione e un gamete che porta i due cromosomi perfettamente normali (un 21 e un 14);

- le due adiacenti, cioè una segregazione di tipo verticale o orizzontale, a seconda di come si dispongono i cromosomi nei confronti delle fibre del fuso:



nel primo caso da una parte andrà il cromosoma 21 da solo, dall'altra parte andrà il cromosoma 14 più il cromosoma traslocato 14^{21} . Il gamete con il 21 da solo, ovviamente, darebbe origine ad un individuo con un solo cromosoma 14 (monosomia 14, incompatibile con la vita); perciò questo gamete si perde. L'altro gamete avrà 2 cromosomi 14 ed un cromosoma 21 traslocato; dopo la fecondazione in questo zigote avremmo 3 cromosomi 14. In questo caso si parla di trisomia 14, situazione incompatibile con la vita (abbiamo visto che le segregazioni adiacenti non portano mai gameti maturi);



l'altro tipo di segregazione adiacente (orizzontale), porta invece ad una monosomia del 21, cioè un gamete nullisomo per il 21 (quindi non darà progenie nata viva con casi di aborto). L'altro gamete che, essendo derivato da una adiacente, essendo un gamete sbilanciato (porta due cromosomi 21 e un cromosoma 14), ci aspetteremmo venisse perso, eccezionalmente può andare incontro a fecondazione; lo zigote matura e l'individuo che nascerà da quel gamete avrà 3 cromosomi 21 (uno dei cromosomi 21 è traslocato). Questa è una condizione genetica ereditabile, cioè si possono fare previsioni matematiche molto esatte sul rischio che una coppia in cui un componente sia portatore di questa traslocazione, possa avere figli Down.

Tale probabilità è 1/3 perché sulla prole nata viva si hanno 3 gameti che porteranno a progenie viva, dei quali uno darà un individuo con sindrome di Down. In realtà c'è la possibilità di aborti che però complicano molto la previsione e comunque ad una coppia che va ad un consultorio genetico interessa sapere la probabilità di mettere al mondo un figlio Down (quindi la probabilità sulla prole nata viva e non sui possibili aborti).

Esiste quindi una grande differenza tra questo tipo di sindrome di Down e l'altro tipo di trisomia da non disgiunzione: qui si ha una probabilità matematica calcolabile con esattezza. Infatti, se una

coppia è diagnosticabile come portatrice di una traslocazione robertsoniana 14^{21} , si può calcolare il rischio teorico che questa coppia abbia un bambino affetto da sindrome di Down.

La sindrome di Down, anche chiamata mongolismo, è una sindrome abbastanza complessa, fino a qualche decennio fa ancora infausta perché intorno agli 8-10 anni i bambini Down morivano.

Oggi le terapie a cui vengono sottoposti hanno allungato molto la vita (fino a 40 anni e oltre).

È una sindrome di interesse odontoiatrico perché sono bambini che hanno molte malformazioni dentarie ed è quindi più probabile che possa capitare in uno studio dentistico una persona Down in quanto hanno malformazioni scheletriche e quindi sia la mascella che la mandibola non sono ben allineate e ci sono problemi alle arcate dentarie, allo smalto, oltre che problemi cardiocircolatori e respiratori. In aggiunta a ciò c'è anche un ritardo mentale più o meno grave anche in funzione dell'ambiente che circonda la persona: se è un ambiente stimolante il ritardo mentale sarà più lieve, se è poco stimolante il ritardo sarà più grave. Questo ovviamente pone l'odontoiatra anche di fronte al problema psicologico che non può essere trascurato: una persona Down, pur avendo un'età adulta, va trattata con molti riguardi dal punto di vista psicologico perché potrebbe avere difficoltà ad accettare una terapia odontoiatrica.

La traslocazione robertsoniana riguarda anche gli altri cromosomi, solo che negli altri casi molto spesso ci sono delle complicazioni che riguardano le monosomie degli altri cromosomi.

Per esempio sono stati descritti molti casi di aborto per zigoti portatori di traslocazione $13^{21}, 21$; sembrerebbe che il problema sia relativo al punto nel quale avviene la rottura perché si dice che nell'adiacente vengono recuperati i gameti che non portano i centromeri omologhi. Di fatto fino ad oggi i bambini nati vivi da traslocazione sono tutti 14^{21} , quindi probabilmente con gli altri cromosomi ci sono problemi in più che non fanno recuperare i gameti.

Per questo motivo si è portato questo esempio in quanto, al di là della caratteristica di essere una traslocazione che dà anche una variazione di numero nel cariotipo di chi la porta, possono nascere bambini Down (che sono stati osservati nascere solo da questo tipo di traslocazione).

Mutazioni cromosomiche di tipo numerico

Sono mutazioni a carico dei cromosomi che si traducono non in un cambio di struttura, ma nella **modificazione del n° dei cromosomi**. Si distinguono delle

- **monosomie** quando si ha nello zigote un solo cromosoma di un certo tipo;
- **trisomie** quando invece della normale coppia di cromosomi, se ne hanno 3 di quel tipo (per es. trisomia $21 \rightarrow 3$ cromosomi 21, trisomia $18 \rightarrow 3$ cromosomi 18, e così via).

Le trisomie libere in cui i 3 cromosomi sono uno separato dall'altro (non sono traslocati) hanno come origine la **non-disgiunzione**.

La non-disgiunzione è un fenomeno che può accadere sia in 1° che in 2° divisione meiotica: nel primo caso vede andare insieme nella stessa cellula i due cromosomi omologhi, nell'altro caso i due cromatidi fratelli; il risultato finale è comunque un gamete che ha 2 cromosomi omologhi invece che uno solo.

Se la non-disgiunzione avviene in **prima divisione meiotica** e quindi vanno insieme i 2 cromosomi omologhi, questi possono essere **diversi tra loro** per contenuto genico (Aa, AA, Bb, CC ecc.) ma non per funzione; se la non disgiunzione avviene in **2° divisione meiotica**, invece, i due cromatidi fratelli **dovrebbero** essere identici a meno che non ci sia stato crossing-over (negli esercizi questo permetterà di stabilire, dove possibile, se la non-disgiunzione è avvenuta in 1° o in 2° divisione meiotica).

Teoricamente le trisomie si trovano a carico di tutti i cromosomi autosomici e sessuali; tuttavia alcune trisomie non sono compatibili con la vita. Molti casi di aborto spontaneo, laddove è stato possibile fare un'analisi del feto (a volte l'aborto è talmente precoce da non consentirne l'analisi), hanno permesso di vedere che in molti casi la trisomia non è compatibile con la vita.

Queste sono previsioni fatte a posteriori, cioè sui dati raccolti negli anni e quindi è noto che alcune trisomie sono più frequenti, altre molto rare, altre mai osservate. Ciò vuol dire che non si può dire che, per esempio, la trisomia dell'11 non avviene, ma che non si è mai osservata; né ci permette di stabilire con esattezza se il gamete non diventa maturo, se non avviene la fecondazione, se si ha un aborto ai primissimi stadi (molti aborti ai primi stadi o non vengono rilevati o non consentono un'analisi del feto).

Tra le sindromi che citiamo perché più frequenti c'è la **trisomia del cromosoma 13, del 18, del 21**. Quindi, la sindrome di Down non ha come unica origine la traslocazione robertsoniana, ma può derivare anche da una **trisomia cosiddetta "libera"**, da **non disgiunzione del cromosoma 21**: un bambino Down con questa trisomia presenterà 47 cromosomi, un bambino Down da traslocazione presenta 46 cromosomi.

La trisomia del cromosoma 13 è detta anche **sindrome di Patau** e la trisomia del 18 è detta anche **sindrome di Edwards**. Sono trisomie che presentano cariotipi con 3 cromosomi liberi l'uno dall'altro (in una traslocazione si hanno due cromosomi liberi e un terzo cromosoma è traslocato, per un totale di 46 cromosomi).

- **TRISOMIA 13** è l'unico caso conosciuto di duplicato

- **TRISOMIA 18** è l'unico caso conosciuto di triplicato
che causa la morte o la gravissima disabilità
in un periodo molto breve di vita.

TRISOMIA 21 è il più frequente caso di triplicato

TRISOMIA 21 è l'unico caso conosciuto di triplicato

- grave ritardo mentale
- pianta simile ad un anatroccolo

• gli individui affetti muoiono nell'infanzia
e alle famiglie.

INVERSIONE: un frammento si stacca da un cromosoma
e si riunisce ad esso capovolto

TRASLOCAZIONE: scambio di tratti di DNA tra
cromosomi.

DUPPLICAZIONE - è presente copie multiple di geni

DELEZIONE - è mancanza di alcuni geni (4 per lo zero)

Lezione 34 (29/05)

Sindrome di Edwards

È una trisomia del **cromosoma 18**. Un bambino nato con questa trisomia presenta una "facies" caratteristica: infatti il volto presenta forma delle orecchie molto particolare e, soprattutto la mandibola prominente ed un allungamento dell'occipite. È una sindrome che porta ad un grave ritardo mentale e la sopravvivenza è molto ridotta in quanto non viene mai raggiunta l'età adulta.

Sindrome di Patau

È una trisomia del **cromosoma 13**. Anch'essa presenta una "facies" caratteristica con una serie di malformazioni fenotipiche tra le quali il labbro leporino (anche assente), un caratteristico taglio degli occhi, una caratteristica forma del naso, alterazioni del cuoio capelluto, micrognazia (apparato masticatorio ridotto) ecc. È associato un grave ritardo mentale e la sopravvivenza è fortemente ridotta e limitata al periodo perinatale.

Sindrome di Down

Oltre a quanto già detto sull'aspetto clinico di questi pazienti, si sottolinea che è presente in tutte le razze. La sindrome da non disgiunzione è stata correlata all'età materna, cioè all'aumentare dell'età materna aumenta la frequenza della sindrome. Nella fascia di età materna compresa tra i 20 ed i 34 anni la frequenza dei bambini Down è relativamente bassa con un massimo del 2-3 %. Dopo i 35 anni la frequenza si innalza rapidamente arrivando quasi al raddoppio in un periodo di 4 anni (35-39 anni) e l'aumento è sempre più marcato nel tempo. Si è pensato che questa correlazione sia dovuta al fatto che i **cromosomi rimangono appaiati** per tanto tempo (la gametogenesi femminile comincia durante la vita intrauterina ed i cromosomi rimangono appaiati in profase I fino a che non ci sarà la fecondazione), con perdita della capacità di disgiungere.

Tale teoria resta la più accettata anche se in un lavoro di circa 15 anni fa era stata riscontrata una frequenza altissima rispetto all'età anche in mamme di circa 20 anni; fu ipotizzato che il difetto nella disgiunzione fosse comunque dovuto al periodo dell'appaiamento e che cellule troppo giovani non avessero ancora acquisito la capacità di disgiungere correttamente.

Comunque, l'attenzione rimane sulle **madri con più di 35 anni** che sono soggetti a più alto rischio (ciò non significa che non possano nascere Down anche da madri di 30 anni, anche se il rischio è più basso). Quello che fa diventare la sindrome di Down un problema sociale a tal punto che l'amniocentesi diviene a carico del Servizio Sanitario Nazionale è il raddoppio della frequenza dopo i 35 anni e il successivo raddoppio ancora più rapido. La sindrome di Down viene considerata una malattia sociale perché, dato l'aumento dell'aspettativa di vita e la possibilità di far raggiungere una certa autonomia a questi malati, questi presentano tuttavia un quadro clinico complesso che deve essere trattato. Oggi sono meglio trattati, da cui l'aumento dell'aspettativa di vita ma anche l'aumento del carico per il SSN. Da qui l'incoraggiamento a fare diagnosi prenatale per affrontare una decisione autonoma e consapevole sul proseguimento della gravidanza.

Queste sindromi non sono le uniche che si ritrovano tra i nati vivi: si riscontrano anche la trisomia del **cromosoma 8 e del 22**. Come già detto, si può soltanto parlare di ciò che si osserva; non si conoscono i motivi per cui si riscontrano alcune trisomie degli autosomi ed altre no, ma di fatto

alcune trisomie non sono mai state rilevate alla nascita, sono evidentemente trisomie che non portano alla maturazione dello zigote o del feto.

Tutte le sindromi di cui abbiamo parlato portano ad una modificazione del numero dei cromosomi, con il riscontro di un cromosoma in più.

Monosomie

Ad un evento di non disgiunzione segue un risultato reciproco: da una parte si ha un gamete con i due cromosomi che sono andati insieme e dall'altra necessariamente si ha un gamete nullisomo (cioè vuoto). Teoricamente, quindi, a seconda del gamete che viene fecondato si potrebbe avere una trisomia o una monosomia, cioè un gamete privo di un certo cromosoma. In realtà **tra i nati vivi non sono mai state riscontrate monosomie a carico degli autosomi** (si verificano aborti più o meno precoci, in qualche caso probabilmente i gameti potrebbero essere non fecondabili o in grado di fecondare).

Cromosomi sessuali

A loro carico si riscontrano sia mono- che trisomie. Le sindromi più frequenti sono: **sindrome di Turner** con genotipo XO (mancanza di un cromosoma X).

L'individuo è femmina con un quadro clinico abbastanza importante anche se non invalidante: sono persone che si presentano piuttosto basse e tozze, con un lieve ritardo mentale, con problemi all'apparato riproduttivo. Tuttavia la sindrome è compatibile con la vita; in passato alcuni soggetti se ne accorgevano in età adulta per esempio con la comparsa di amenorrea (mancanza del ciclo mestruale) o a causa di un'infertilità. Oggi sempre più frequentemente alla nascita viene fatto il cariotipo del bambino o il medico sospetta con più facilità, grazie ai maggiori controlli, la presenza di tale alterazione.

Il motivo per cui tale **monosomia dei cromosomi sessuali** è compatibile con la vita si spiega in quanto già **normalmente** un cromosoma X nella donna è **eterocromatinizzato** (non funziona). Rimane da sottolineare, però che le due X nella donna funzionano entrambe nella determinazione del sesso e dei caratteri sessuali secondari: è vero che è sufficiente l'assenza dell'Y per determinare il sesso femminile ma è anche vero che il corretto funzionamento di entrambe le X, pur non essendo necessario a determinare il sesso, è necessario per un corretto sviluppo dell'apparato riproduttivo e dei caratteri sessuali secondari. A livello fenotipico si osserva anche un ridotto sviluppo dei genitali esterni. I problemi più importanti cominciano quindi nel periodo dello sviluppo con l'inizio della manifestazione dei caratteri sessuali secondari tipica della pubertà.

Non è conosciuta una **monosomia della Y** perché mancherebbe comunque una X funzionante (il cromosoma Y è quasi vuoto se non per i geni che determinano i caratteri sessuali secondari).

È invece conosciuta una **trisomia dei cromosomi sessuali** che può essere:

- **XXX** (piuttosto raro), individuo di sesso femminile con lieve ritardo mentale e problemi all'apparato riproduttivo,
- **XXY o sindrome di Klinefelter**. Il soggetto è maschio con fenotipo particolare caratterizzato da altezza particolarmente elevata, fianchi larghi, seno leggermente sviluppato (un maschio con alcuni tratti femminei). I genitali esterni sono piuttosto ridotti e l'apparato riproduttivo ha seri

problemi (sterili). È associato ritardo mentale. Alcuni lavori risalenti a circa 20 anni fa avevano associato a questi soggetti una maggiore frequenza di casi di delinquenza o di follia ma questi risultati erano dovuti ad un errore di campionamento.

Nella sindrome di **Turner** (X0), è difficile stabilire in quale **divisione meiotica** è avvenuta la non disgiunzione perché essendo un gamete nullisomo non abbiamo nessuna indicazione di marcatori genetici che ci possano aiutare a stabilire quando è avvenuta. Tuttavia si può stabilire in quale genitore è avvenuta perché andremo a guardare il marcatore genetico della X presente.

Nel caso della sindrome di **Klinefelter** le cose sono più complesse e bisogna vedere gli alberi genealogici per stabilire in quale genitore è avvenuta perché si possono prendere le due **XX** dalla **mamma** e normalmente la Y dal **padre** oppure è possibile prendere una **X** normalmente dalla **madre** e **XY** dal **padre**. Nel caso sia possibile stabilire che la non disgiunzione è avvenuta nel padre e perciò il bambino ha ereditato **XY** dal **padre**, automaticamente sappiamo che la non disgiunzione è avvenuta in **prima divisione meiotica** perché i due cromosomi omologhi sono rimasti insieme; se fosse avvenuta nella **seconda divisione meiotica** non si sarebbero separati i **cromatidi fratelli** e quindi si sarebbero avute **due X** o **due Y** che, insieme alla X della madre non avrebbero mai potuto dare una sindrome di Klinefelter.

REGOLAZIONE GENICA

Si distingue una regolazione genica:

- di tipo **quantitativo**, cioè un gene si esprime solo quando una proteina occorre (quindi nella cellula la quantità di proteina viene regolata regolando la funzione del gene). È un meccanismo che si verifica in tutti gli organismi;
- di tipo **qualitativo**, che si ritrova solo negli organismi pluricellulari ed è correlata al differenziamento.

La specializzazione cellulare, cioè il fatto che un individuo pluricellulare abbia le varie tipologie cellulari (epitelio, cellule muscolari, cellule endocrine ecc.), è dovuto esclusivamente alla regolazione dell'espressione del DNA. Infatti tutte le cellule di un individuo pluricellulare hanno la stessa identica qualità e quantità di DNA; un individuo pluricellulare deriva dalla fusione di un gamete maschile con uno femminile e quindi tutte le cellule derivano da un'unica cellula che ha un unico patrimonio genetico. Questo patrimonio genetico viene mantenuto in tutte le linee cellulari (la cellula muscolare o ossea o epiteliale hanno lo stesso patrimonio genetico); **l'espressione** di questo materiale genetico è regolata a seconda della **funzione** di **quella cellula** per cui si avranno dei geni che si esprimono (codificano per un prodotto) in tutte le cellule perché sono delle funzioni di base e geni che si esprimono solo in alcune cellule; in questo modo si avrà la specializzazione di quella linea cellulare.

Questa regolazione di tipo qualitativo interviene durante lo sviluppo dell'organismo pluricellulare (dalla drosofila al mammifero) e l'attività specifica viene mantenuta anche durante la vita adulta dove interviene anche una regolazione di tipo quantitativo; per es., supponendo che la cellula si sia specializzata per produrre il prodotto X, tale prodotto viene prodotto soltanto quando serve.

Ciò costituisce una differenza tra organismi unicellulari e pluricellulari ma anche una distinzione tra procarioti ed eucarioti. Tale distinzione non riguarda il numero delle cellule in quanto ci sono organismi unicellulari anche tra gli eucarioti ma riguarda più che altro il tipo di regolazione legato al tipo di DNA presente.

Ricordiamo che:

- il DNA dei procarioti è contiguo cioè i geni sono uno accanto all'altro e c'è pochissimo materiale genetico interposto tra un gene e l'altro;
- il DNA dei procarioti non è discontinuo: un singolo gene non contiene zone introniche, cosa che invece accade nel DNA degli eucarioti;
- per questi motivi l'RNA messaggero dei procarioti è policistronico cioè sono trascritti più geni contemporaneamente uno accanto all'altro (un'unica molecola di mRNA porta l'informazione per più geni); i geni trascritti insieme sono correlati tra loro cioè riguardano una stessa funzione;
- la quantità di DNA negli eucarioti è decisamente maggiore che negli eucarioti;
- la complessità della molecola del DNA, intesa come unione con le proteine istoniche e non istoniche, è decisamente più complessa negli eucarioti che nei procarioti.

Tutte queste differenze, a prescindere dall'essere uni- o pluricellulari, fa sì che si debba distinguere la regolazione genica tra procarioti ed eucarioti.

Regolazione genica nei procarioti

Si distinguono due tipi di controllo: negativo e positivo.

- **Controllo negativo:** un DNA normalmente funzionante può essere zittito. In pratica è un meccanismo di controllo che fa arrivare al DNA un messaggio che indica che il prodotto non serve più;
- **controllo positivo:** al contrario, il messaggio che arriva al DNA è che il prodotto serve in abbondanza e quindi si deve attivare la trascrizione.

Nel controllo negativo si ha il prodotto di un gene chiamato ^{repressore} regolatore che va a bloccare il gene attivo.

Nel controllo positivo si ha la presenza di un composto che invece va ad attivare il gene.

Nei procarioti il sistema leader è il controllo negativo; il controllo positivo interviene solo quando c'è stato l'input da parte del controllo negativo di attivare il gene (se un gene è bloccato non ci può essere nessun composto che lo fa funzionare di più: deve essere prima sbloccato e poi eventualmente potrà lavorare di più).

Prima di descrivere più nel dettaglio il controllo negativo distinguiamo i geni strutturali che sono quelli che daranno un prodotto proteico, dai geni regolatori che sono tutti i geni coinvolti nella regolazione dell'espressione genica.

Nell'ambito del controllo negativo, il prodotto di un gene regolatore (gene specifico, detto anche induttore) può funzionare in maniera diversa; si possono avere due sistemi, uno induttivo ed uno repressibile:

- si ha controllo ^{inducibile} induttivo quando la presenza di un substrato attiva il gene (sblocca il controllo negativo);

nel sistema repressibile la presenza di un substrato (che è un prodotto finale), zittisce l'espressione del gene.

In generale nel primo caso siamo di fronte a sistemi più di tipo catabolico cioè di enzimi che servono per demolire delle sostanze, per cui è chiaro che se la sostanza è presente (il substrato), devono essere attivate le proteine che la elaborano, mentre se la sostanza non è presente, è inutile che le proteine vengano attivate.

Nel secondo caso sono coinvolti processi anabolici cioè di costruzione; quindi il sistema funzionerà fino a quando il prodotto finale non sarà tanto abbondante che non sarà più necessario produrlo.

Gli operoni

Jacob e Monod sono gli scienziati che hanno chiarito la regolazione genica nei procarioti, introducendo il concetto di operone.

Per i due scienziati l'operone è un'unità funzionale in grado di regolare l'espressione dei geni e rappresenta un sistema in cui ci sono:

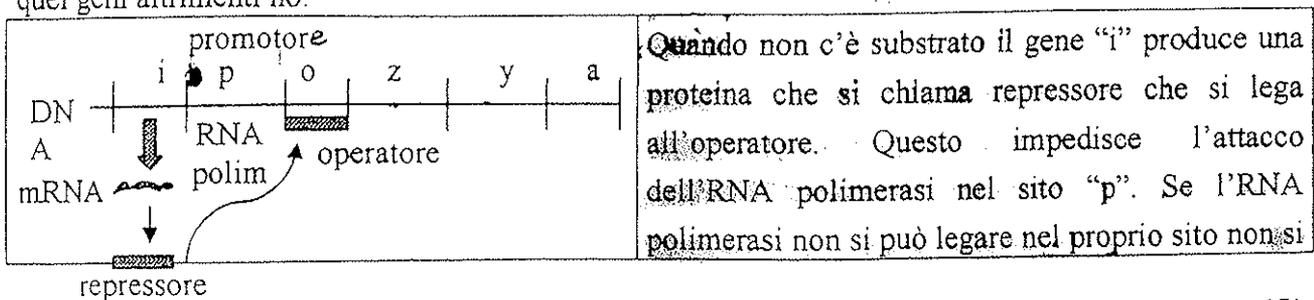
- geni strutturali (che quindi daranno delle proteine), in quantità diversa a seconda della funzione che devono svolgere, tutti correlati per funzione (servono per la stessa funzione);
- un gene operatore che non dà un prodotto proteico;
- un gene promotore specifico per quell'operone;
- un gene regolatore.

L'operone è considerato come una serie di tratti di DNA uno accanto all'altro (che è in accordo con il modello del DNA dei procarioti), tenendo conto che il gene repressore può essere anche lontano dagli altri; questo perché il gene regolatore è l'unico che dà un prodotto diffusibile cioè che si diffonde e perciò anche fosse lontano dai geni sui quali svolge la propria funzione, può raggiungerli.

I ruoli dei geni appena citati sono i seguenti:

- geni strutturali, danno il prodotto proteico che deve essere regolato;
- gene operatore, interviene nel regolare fisicamente la funzione degli altri;
- gene promotore, è il sito al quale si lega l'RNA polimerasi per dare inizio alla trascrizione. È ovvio che il sito promotore e quello operatore devono essere contigui con i geni strutturali perché devono proprio agire su quei geni, essendo l'RNA polimerasi di quei geni che si deve legare, è la regolazione di quei geni che si deve effettuare e quindi fisicamente devono essere vicini.

Prendiamo in esame un sistema inducibile del tipo "substrato attiva la sintesi"; si è detto che gli operoni di questo tipo in genere sono di tipo catabolico, cioè se c'è substrato serve il prodotto di quei geni altrimenti no.



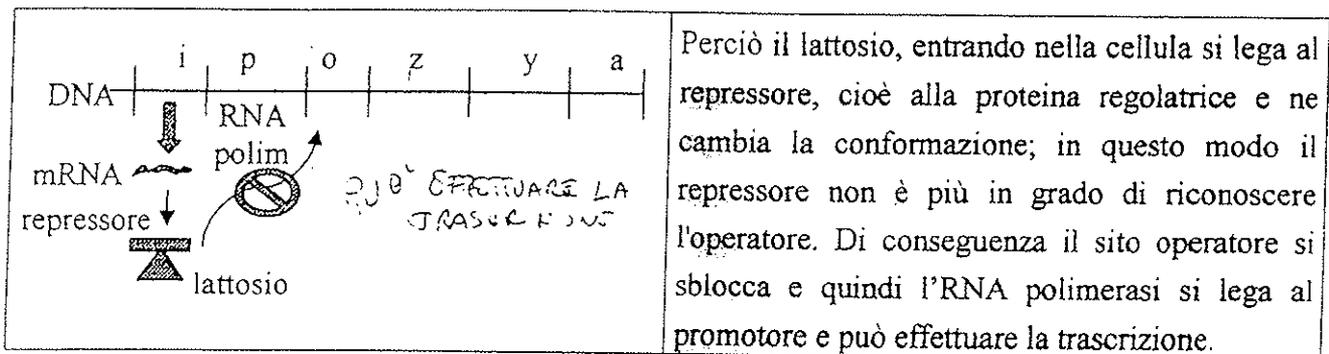
ha sintesi proteica.

Tuttavia, se nella cellula entra il substrato a cui si riferiscono i tre geni, l'operone deve attivarsi. Prendiamo ad esempio l'operone lattosio: se c'è lattosio nella cellula (il lattosio è un disaccaride formato da glucosio e galattosio), per essere utilizzato dalla cellula stessa deve essere scisso.

Pertanto ci sono degli enzimi necessari per il metabolismo del lattosio che sono:

- una permeasi, che regola l'entrata del lattosio nella cellula;
- la β -galattosidasi, che rompe il legame β -galattosidico del disaccaride;
- una trans-acetilasi la cui funzione, non del tutto chiarita, è quella di acetilare il substrato e contribuire alla sua scissione.

È chiaro che questi 3 enzimi servono tutte le volte che c'è il lattosio, altrimenti non servono.



Quando il lattosio comincia a diminuire, inevitabilmente anche l'ultima molecola di lattosio viene utilizzata dalla cellula, e quindi il lattosio si stacca dal repressore che torna a riconoscere l'operatore e si torna ad una regolazione genica in cui la presenza del substrato induce la sintesi proteica, mentre l'assenza del substrato la deprime.

È bene insistere che operatore e promotore devono essere contigui ai geni strutturali e quindi qualsiasi modificazione di questi due siti può portare ad una diversa espressione di quanto descritto. Il repressore è un fattore diffusibile, sia proteico che non (per es. un mRNA) che ha solo fini regolatori, che non entra nelle altre funzioni della cellula.

*Puo' effettuare la trascrizione quando il sito "o" è libero
Cervia Costi*

Lezione 35 (30/05/01)

Sistemi repressibili

Riguardano gli operoni anabolici (di costruzione). Il prodotto finale va a reprimere la trascrizione.

Prendiamo ad esempio l'**operone del triptofano**, deputato all'anabolismo di questo aminoacido:

- ci sono **5 geni strutturali** che codificano per gli enzimi coinvolti nella sua costruzione;
- l'operatore ed il promotore sono contigui ai geni strutturali;
- il **gene regolatore** è **distante** dall'operone che deve regolare (il suo prodotto è diffusibile).

In questo caso, il repressore prodotto dal gene regolatore è un **inattivo**. Ciò significa che il repressore così come viene prodotto non è in grado di legarsi all'operatore e quindi la trascrizione prosegue regolarmente.

Quando si arriva ad un livello di aminoacido sufficiente per la cellula (non ne occorre altro), le **molecole inutilizzate** di triptofano si legano al **repressore**; quest'ultimo cambia la sua conformazione assumendone una che è in grado di riconoscere l'operatore che viene attivato, reprimendo la trascrizione (questa regolazione è di tipo quantitativo e quindi serve al risparmio energetico della cellula, per evitare che si accumulino un eccesso di sostanza quando non occorre).

È lo stesso criterio visto per i sistemi inducibili, cioè un repressore che si lega all'operatore impedendo così l'attacco ed il "viaggio" dell'RNA polimerasi lungo il DNA perché avvenga la trascrizione. Entrambi i sistemi hanno la loro logica:

- nel sistema **inducibile** si hanno operoni **catabolici** in cui la presenza del substrato deve portare alla **sintesi** perché gli **enzimi** servono per il catabolismo di quella sostanza,
- nel sistema **repressibile** si hanno operoni **anabolici** in cui la sostanza finale, per la produzione della quale sono coinvolti gli enzimi dell'operone, può bloccare la trascrizione.

Questa regolazione riguarda tutti i batteri, sia autotrofi che eterotrofi, sia aerobi che anaerobi.

È comunque un controllo negativo perché si va ad agire reprimendo la trascrizione, reprimendo l'attività del gene.

Controllo positivo

È soltanto di supporto a quello negativo. Serve a rendere più efficiente una trascrizione che comunque avverrebbe. Inizialmente, quindi, ci sarà il controllo negativo che consente la trascrizione che viene avviata perché in quel momento necessita quel prodotto; quindi può intervenire (non è detto che intervenga) un controllo positivo che **velocizza** la trascrizione, la rende più **efficiente**, ed interviene quando quel prodotto è particolarmente necessario dal punto di vista quantitativo (ne occorre tanto).

Il controllo positivo agisce a livello del **promotore** (zona a monte di quella che deve essere trascritta; è il tratto di DNA a cui si lega la RNA polimerasi), dove esistono **due siti**:

- un sito **specifico** per il legame con l'**RNA polimerasi**;
- un sito nel quale si lega una "**proteina regolatrice del catabolita**" **CRP** (o CAP).

La CRP per potersi legare al promotore e quindi rendere più efficiente la trascrizione (aumenta l'affinità di legame con l'RNA polimerasi), deve essere attivata. La **CRP** è **attivata dall'cAMP**.

Nel caso dell'operone del lattosio, se c'è tanto lattosio nella cellula e poco glucosio, la scarsità di glucosio fa legare il cAMP alla CRP che si attiva e ciò comporta un più efficiente legame dell'RNA polimerasi con il DNA e quindi una trascrizione più efficiente. Quando il rapporto glucosio/lattosio è a favore del glucosio (non c'è bisogno di rompere la molecola di lattosio per ottenere il glucosio), la **CRP non viene attivata** perché c'è poco cAMP. Quindi, l'RNA polimerasi si lega comunque al sito promotore ma il suo legame è meno efficiente, la sintesi c'è perché il lattosio è presente nella cellula e quindi il repressore è inattivato, ma la sintesi è ridotta al fine di utilizzare quel poco lattosio presente ma non è particolarmente utile data la massiccia presenza di glucosio.

Il controllo positivo è **meno specifico**: infatti non vi è nulla di particolare che faccia riconoscere alla CRP quel promotore particolare.

Quella di cui si è parlato è una regolazione che avviene a livello **trascrizionale** ed è la vera e propria regolazione genica dato che si agisce direttamente sul DNA regolando la sua funzionalità (viene trascritto/non viene trascritto). Esiste anche un controllo che non avviene a livello del gene ma avviene a valle, cioè avviene tutte le volte in cui il controllo trascrizionale è arrivato in ritardo (il DNA è già stato trascritto) e si è dato l'avvio ad un processo metabolico che però non serve e quindi è opportuno che venga bloccato.

Controllo postrascrizionale: retroazione (feedback)

Riprendendo in esame l'operone del triptofano, si è detto che presenta 5 geni strutturali che danno 5 enzimi che entrano in una catena metabolica che parte dal **corismato** e, attraverso 5 reazioni, arriva al triptofano. Ogni reazione necessita di 1 a volte 2 enzimi contemporaneamente (1a reazione che porta da corismato ad antranilato) e a volte uno stesso enzima può intervenire su due reazioni.

In questo caso la trascrizione è avvenuta: tuttavia può accadere che, nonostante il DNA sia stato già trascritto (e magari già tradotto come può avvenire nei procarioti), il prodotto sia in eccesso e quindi ci sia bisogno di bloccare la catena che porta dispendio energetico alla cellula.

Perciò il triptofano, dopo essersi legato al repressore, aver attivato il repressore ed aver zittito la trascrizione (a monte), sia ancora **tanto in eccesso** da legarsi al **primo enzima** della catena metabolica. Ne risulta un cambiamento della conformazione dell'enzima (antranilato sintetasi) che non riconosce più il corismato; ne consegue il blocco della catena metabolica.

Ci saranno ancora degli enzimi della catena metabolica presenti nella cellula ma non si avrà più dispendio energetico per mandare avanti la catena. Quindi questa regolazione avviene a livello della catena metabolica e, a rigore, non si dovrebbe più parlare di regolazione genica.

In sintesi, la **retroazione** si riferisce quasi esclusivamente agli operoni anabolici e si attua quando il prodotto finale, ^(in eccesso) dopo aver comunque attivato un controllo negativo sul DNA, si lega al primo enzima della catena metabolica, bloccandola (la produzione in eccesso del prodotto può avvenire per motivi semplicemente temporali in quanto la sintesi dell'mRNA è avvenuta poco prima che il prodotto divenisse in eccesso e dato che l'mRNA ha una sua vita (turn-over), continua ad essere tradotto).

Negli eucarioti

La situazione è molto più complessa: ci troviamo di fronte ad organismi pluricellulari che presentano anche un problema di differenziamento.

Negli eucarioti il DNA è normalmente represso ed è attivato quando occorre; non esiste un controllo di tipo negativo per i seguenti limiti:

- la **quantità di DNA** è molto maggiore rispetto a quella dei procarioti (in E. Coli si ha 4×10^6 basi e nell'uomo 45×10^6 basi). Tenere tutto questo DNA attivo e zittirlo quando non occorre sarebbe troppo dispendioso; oltre ai geni house-keeping (trascritti in tutte le cellule), molte cellule non dovranno mai produrre nella loro vita alcune proteine e quindi sarebbe davvero inutile lavorare per zittire un DNA che già in partenza sappiamo non dovrà mai funzionare. Perciò si pensa che il controllo sia esclusivamente di tipo **positivo**, cioè il DNA è normalmente mantenuto in uno stato silente per poi essere attivato;
- i **geni NON sono contigui**, quindi un "modello" operone con i geni uno di seguito all'altro è impensabile;
- **trascrizione e traduzione avvengono in momenti completamente diversi**;
- l'**mRNA è monocistronico** il che renderebbe difficile la regolazione vista nei batteri;
- l'**mRNA degli eucarioti è a lento turn-over**, cioè è piuttosto stabile e quindi ci si verrebbe a trovare troppe volte con un RNA già trascritto che continuerebbe ad essere tradotto (v. retroazione).

Quindi l'unico modello possibile è quello di un controllo positivo che parta dal presupposto che il DNA sia normalmente represso e che poi debba essere attivato.

L'attenzione si è rivolta inizialmente alla costituzione della cromatina, cioè al ruolo degli **istoni** e delle **proteine NON istoniche**.

Istoni

È ovvio immaginare che gli istoni possano essere coinvolti nel reprimere il DNA; già sappiamo che l'eterocromatina, quando il DNA è fortemente complessato con gli istoni, non è attiva e questo poteva far supporre che fossero coinvolti nel mantenere in uno stato di non trascrittibilità il DNA.

L'intervento degli istoni nel reprimere ulteriormente il DNA attraverso una maggiore o minore condensazione della cromatina, avviene:

- quando l'**istone H₁** viene fosforilato, la cromatina si condensa maggiormente;
- l'**acetilazione** degli istoni (aggiunta di un gruppo acetile), in particolare **all'istone H₄**, porta ad un'attivazione della cromatina: in vari esperimenti si è evidenziato che l'acetilazione dell'istone H₄ è presente tutte le volte che ci sono **regioni attivamente trascritte**, mentre non si ritrova mai acetilazione di questo istone quando si hanno zone che non devono essere trascritte. Infatti, nelle zone di eterocromatina costitutiva non si trova mai acetilazione dell'istone H₄, compreso il corpo di Bar.

Proteine NON istoniche

Nel '75 è stato fatto dalla Stein un esperimento di ricostituzione della cromatina: sapendo che negli organismi pluricellulari c'è una specializzazione cellulare, era altresì noto che le cellule del midollo osseo dovessero produrre un **RNA messaggero diverso** di quello, per esempio, del timo.

La diversa produzione di mRNA doveva essere in qualche modo dovuta ad una regolazione genica; si è scissa la cromatina nei suoi vari componenti (DNA, istoni, proteine NON istoniche) e la si è poi ricostituita mescolando le varie componenti.

Si è visto che la specificità dell'mRNA dipendeva dal tipo di proteina NON istonica:

- se si prende il DNA di una qualsiasi cellula, qualsiasi tipo di istone si prenda (midollo osseo o timo), non si ha modificazione nella produzione di mRNA meno che non si aggiunga un tipo specifico di proteina NON istonica.

In pratica, DNA e istoni del midollo osseo + proteine NON istoniche del timo danno "in vitro" un mRNA tipico delle cellule del timo (e viceversa).

Quindi, l'RNA messaggero è tipico delle cellule da cui provengono le proteine NON istoniche.

La regolazione avviene attraverso la fosforilazione delle proteine NON istoniche operata dalle **chinasi**, enzimi che aggiungono un gruppo fosfato. Le chinasi sono attivate dall'cAMP, anche in questo caso coinvolto in un tipo di controllo positivo. Per molto tempo si è pensato che le proteine NON istoniche fosforilate diventassero **negative** e quindi riuscissero ad attirare gli istoni che sono proteine basiche e quindi maggiormente positive; in questo modo avrebbero **strappato** gli istoni dal DNA rendendolo pronto per la trascrizione. In realtà si è visto che gli **istoni**, più che essere staccati dal DNA, vengono **modificati**, per esempio attraverso l'**acetilazione** dell'istone H₄; quindi, la modificazione degli istoni sembrerebbe attivata dalla fosforilazione delle proteine acide.

Eterocromatina facoltativa

Abbiamo già parlato del cromosoma X delle femmine di mammifero e di interi corredi cromosomici che provengono da uno dei due genitori come nel tenebrio volitor (?) in cui il corredo genomico paterno viene completamente represso o ancora il fenomeno dell'imprinting in cui si è visto che nei mammiferi ci sono alcuni geni di origine paterna (molto spesso) che vengono repressi e quindi non vengono trascritti, per cui si dice che c'è un "imprinting" dell'altro genitore.

Perciò l'eterocromatinizzazione è un meccanismo di regolazione usato abbastanza frequentemente e che tende a reprimere ulteriormente un DNA che normalmente sarebbe attivabile (lo si condensa ancora di più per renderlo del tutto inattivabile).

Amplificazione genica

Riguarda geni il cui prodotto è particolarmente necessario. Sono sequenze ripetute, mediamente ripetute, in cui il segmento genico viene ripetuto più volte per permettere una trascrizione e quindi un prodotto più abbondante.

Modificazione del DNA

Per disattivare un DNA particolarmente attivo si ricorre all'**aggiunta di gruppi metilici** (metilazione) alle basi. La citosina è l'unica base che può essere metilata; la coppia C-G si trova in "isole" (isole C-G), più abbondanti all'estremità 5' del gene (dall'altra parte avviene la trascrizione dell'mRNA).

La metilazione della citosina è una prassi normale nei batteri e serve soltanto per proteggere il DNA dagli attacchi delle endonucleasi; nei mammiferi è stato trovato un enzima che metila e demetila la citosina e tale aggiunta o rimozione dei gruppi metilici si correla con l'attivazione dei geni.

Per esempio, negli spermatozoi, dove non c'è trascrizione perché prima della fecondazione è bloccata, si trovano le doppiette C-G particolarmente ipermetilate e tale ipermetilazione finisce quando si attiva la trascrizione. La **X inattiva** (il corpo di Bar) ha le isole C-G ipermetilate a riprova che la metilazione della citosina coincide con l'inattivazione. Infine, è stato fatto uno studio sui geni della globina negli spermatozoi di pollo. L'emoglobina esiste in varie forme, embrionale, fetale (HbF), normale (HbA₁ e HbA₂), che derivano dall'accensione e spegnimento dei geni della globina che si attivano in diversi momenti della vita embrionale, fetale, adulta (l'emoglobina embrionale e fetale è diversa da quella adulta, con catene proteiche diverse).

Negli spermatozoi di pollo si è visto che i geni per la globina (parte proteica dell'emoglobina), sono ipermetilati; subito dopo la fecondazione soltanto i geni globinici della emoglobina embrionale (la prima) vengono demetilati e quindi attivati, a dimostrazione che vengono attivati solo i geni che servono in quel momento. La demetilazione del DNA non corrisponde all'inizio della trascrizione, cioè non è una regolazione vera e propria ma in realtà è una preparazione alla trascrizione che poi verrà regolata in modo più specifico, come ora diremo.

REGOLAZIONE GENICA NEGLI EUCARIOTI

Non è stata ancora chiarita fino in fondo; certamente, però, il controllo negli eucarioti dipende:

- dalla presenza di **proteine regolatrici** che vanno ad attivare specificamente un singolo gene,
- dalla presenza di alcuni **tratti di DNA** che intervengono nella regolazione e che si è dimostrato essere molto importanti per una corretta trascrizione.

Tratti presenti sul DNA:

- 1) Si è più volte detto che il promotore è il sito di legame dell'RNA polimerasi (sito ovviamente importante per la trascrizione); esiste un sito chiamato "**TATA box**" che si trova circa una trentina di basi a monte del sito di inizio della trascrizione, ricco di timine/adenine, molto importante perché avvenga una corretta trascrizione.
- 2) **UPE** (Upsit Promotor Element), cioè "elementi a monte del promotore". La quantità di UPE serve a rendere un gene più o meno attivamente trascrivibile e la loro quantità è stata senza dubbio correlata con l'efficienza della trascrizione. Se gli elementi sono **pochi** si avrà comunque una trascrizione ma sarà una trascrizione piuttosto debole. Se gli **UPE** sono più **numerosi**, fino a 5-6 tratti ripetuti, il gene sarà **trascritto** con molta **efficienza**, con una maggiore quantità di mRNA.
- 3) **Enhancer**: sono degli **intensificatori** che possono trovarsi a monte, anche molto distanti dal gene che devono far trascrivere in maniera più abbondante. In questo caso l'intervento della proteina regolatrice sarà di **avvicinare** il tratto **enhancer** al gene che deve essere trascritto. Quando la proteina ravvicina l'enhancer al gene, la trascrizione è molto più intensa. Quindi questi tratti di DNA sono molto importanti ma hanno comunque bisogno della mediazione delle proteine regolatrici.

4) **Siti di inizio:** rappresentano un controllo che avviene a livello della trascrizione ed è un meccanismo anche di differenziamento genico più che di quantità. I siti di inizio sono importanti perché danno l'inizio corretto della trascrizione; si hanno tutte le volte che all'interno di un gene ci sono due siti di inizio, **uno a monte e l'altro all'interno**. È chiaro che se la trascrizione inizia al primo sito di inizio (l'RNA polimerasi si lega al primo promotore), si avrà un mRNA molto più lungo che non se la trascrizione inizia dal secondo sito; questo è un modo per avere **due prodotti diversi** dallo stesso gene. Per esempio l'enzima **invertasi** del lievito che serve per il metabolismo del saccarosio, ha due forme: una **usata** dalla **cellula** ed una che viene secreta. Il gene è lo stesso ma l'mRNA della forma che viene secreta è un po' più lungo e (perché il gene ha due siti di inizio e due promotori). L'mRNA messaggero più lungo contiene, nel pezzo in più, delle sequenze di **segnale** che verranno riconosciute dai ribosomi del reticolo endoplasmatico rugoso (proteina di secrezione). La proteina che viene tradotta dall'mRNA più corto, che ha inizio ha gene inoltrato, resterà nella cellula. Quindi, stesso prodotto e stesso gene ma dato che la proteina ha funzione diversa ha un pezzetto in più di trascritto che le serve a farsi riconoscere dal REG. **L'amilasi** delle ghiandole salivari del topo (differenziamento tessuto specifico) ha in partenza un mRNA molto più lungo di quello che si ritrova nelle altre cellule; il prodotto alla fine è lo stesso perché l'mRNA più lungo viene maturato ma resta il fatto che la trascrizione nelle ghiandole salivari è molto più attiva. Quindi, il primo sito di inizio nelle ghiandole salivari è più attivo e porta un più efficiente legame con la polimerasi e perciò si ha una maggiore produzione rispetto alle altre cellule in cui il sito di inizio che viene riconosciuto è il secondo.

Proteine regolatrici

Hanno un ruolo decisivo nella regolazione perché nonostante l'importanza dei tratti di DNA appena citati, tutto deve essere poi mediato dalle proteine regolatrici che consentono all'RNA polimerasi di legarsi in maniera più efficiente. Prendiamo in esame solo gli "attivatori" dato che negli eucarioti si ha solo il controllo positivo: ogni proteina regolatrice deve avere più domini funzionali cioè più tratti con diverse funzioni. Sicuramente ci deve essere una regione che riconosce il **DNA specifico del gene** che deve essere attivato (praticamente la zona promotore) e deve anche avere un altro dominio funzionale che riconosca altri tratti di DNA che abbiamo visto possono servire a rendere più efficiente la trascrizione (UPE ed enhancer).

Proteine ad α -elica

Queste proteine hanno quasi sempre una zona ad α elica che si interpone con il DNA, inserendosi in regioni specifiche del DNA (spesso nel solco maggiore o a volte nel solco minore).

Proteine a dita di zinco

Sono un altro gruppo di attivatori particolarmente importanti; formano delle anse tenute insieme da atomi di zinco (si forma una figura a forma di dito). Le anse hanno la caratteristica di inserirsi nel DNA riconoscendone zone specifiche. Ovviamente saranno i radicali di specifici amminoacidi presenti nelle anse (diversi) e a seconda del tipo di radicale che si trova nell'amminoacido presente nell'ansa si avrà il legame con un tratto di DNA o con un altro. Avendo anche altre zone che

riconoscono siti attivatori, la zona del promotore del gene che deve essere attivato, viene appunto attivata.

Proteine che formano dimeri

Questo tipo di proteine per poter regolare il DNA devono formare un dimero (omodimero o eterodimero a seconda che la catena proteica sia uguale o diversa). La caratteristica è che hanno una forma ad Y che da una parte riconosce zone regolative del DNA e dall'altra si inerisce in zone specifiche del gene che deve essere attivato.

Alcune proteine regolatrice possono mediare la risposta agli ormoni steroidei e quindi dare luogo ad una serie di regolazioni geniche di tipo ormonale molto studiata negli insetti.

Regolazione post-trascrizionale

Negli eucarioti ci sono altri controlli che non sono a livello del DNA (trascrizionali), più numerosi rispetto a quanto visto nei procarioti. Accenniamo ad un tipo di controllo post-trascrizionale, legato alla maturazione dell'mRNA. Sappiamo che dopo la trascrizione l'mRNA deve essere maturato e che uno dei meccanismi è lo "splicing" (eliminazione degli introni).

Esiste la possibilità di uno **splicing alternativo**, cioè uno stesso gene che dà uno stesso trascritto può avere una **maturazione diversa di quel trascritto** e quindi alla fine dare proteine totalmente diverse tra loro. Ciò accade per esempio per la **calcitonina**, proteina prodotta nella tiroide, ed una proteina correlata alla calcitonina che si chiama **CGRP**, prodotta dall'ipofisi. È stato dimostrato che la sequenza genica è identica nei due organi così come è identico l'mRNA trascritto primario; tuttavia dopo lo splicing l'mRNA maturo, quello che poi viene tradotto, è **diverso**.

Si è visto che le **zone che vengono rimosse** sono diverse a seconda del tessuto (regolazione tessuto specifico); si osserva quindi un modo diverso, alternativo, di maturare l'mRNA.

Una volta che l'mRNA è stato maturato ed ha raggiunto il citoplasma può esserci un ulteriore livello di controllo: abbiamo detto che l'mRNA è piuttosto stabile, ha un turn-over lento e perciò ci può essere un tipo di regolazione anche a livello della traduzione, per esempio:

- **destabilizzando** l'mRNA in modo tale che non venga più tradotto,
- **aumentando** l'affinità dell'mRNA con i ribosomi. Un mRNA che si lega in maniera poco efficiente con i ribosomi è un mRNA che non viene tradotto e quindi nel caso in cui serva più prodotto o meno prodotto di un trascritto che è già pronto per la traduzione si può agire ancora regolando l'efficienza della traduzione. Può capitare ancora che i ribosomi non si associno (subunità maggiore con minore) e quindi la traduzione venga bloccata (l'associazione delle due subunità è legata a fattori proteici e di ioni e quindi è abbastanza semplice agire su questi).

Controllo post-traduzionale

Interviene sulla modificazione delle catene **peptidiche** (si può parlare di proteina solo quando la catena peptidica ha subito alcune trasformazioni) che possono consistere nell'impedire l'**associazione** delle catene a formare la struttura **quaternaria**. Inoltre, tutte le proteine che devono essere modificate per poter funzionare (**glicosilate**, per esempio), le proteine **coniugate** (aggiunta di un gruppo prostetico per funzionare), costituiscono livelli ai quali la cellula può agire per impedire

la formazione di una proteina attiva e quindi impedire che si formi altro prodotto quando ne è già presente abbastanza.

Peak 1