

**ORGANIZZAZIONE
FISICA ED
IMPACCHETTAMENTO
del DNA
EUCARIOTICO**

Aspetti fondamentali di un genoma EUCARIOTICO

- E' **LINEARE**
- E' fisicamente organizzato in una struttura:
NUCLEOSOMA (DNA+istoni)
- che forma altre strutture più complesse:
CROMOSOMA e CROMATINA

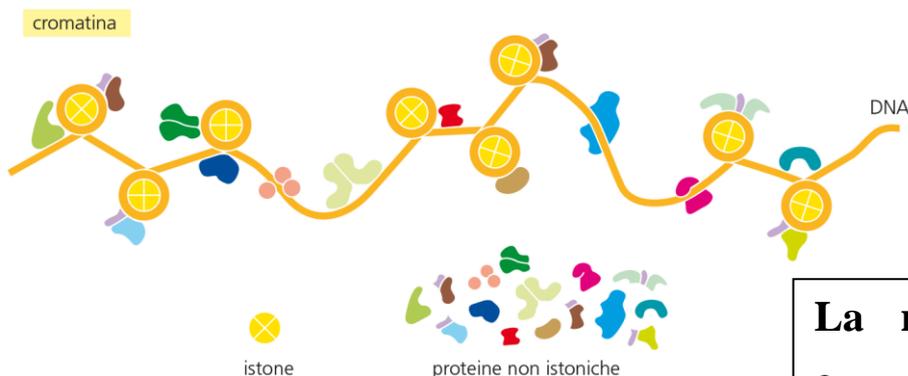
CROMATINA



Proteine + DNA

Proteine Basiche = ISTONI

Proteine non istoniche = regolatrici



La massa del DNA è formata per circa un terzo da DNA e due terzi di proteine

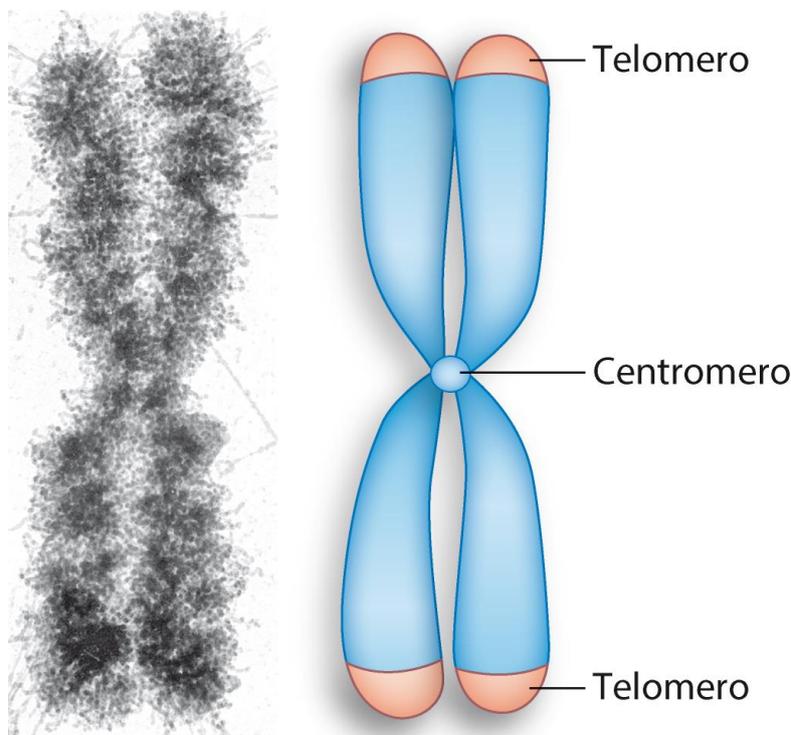
ETEROCROMATINA = stato condensato, non trascritto

- **Costitutiva**
- **Facoltativa**

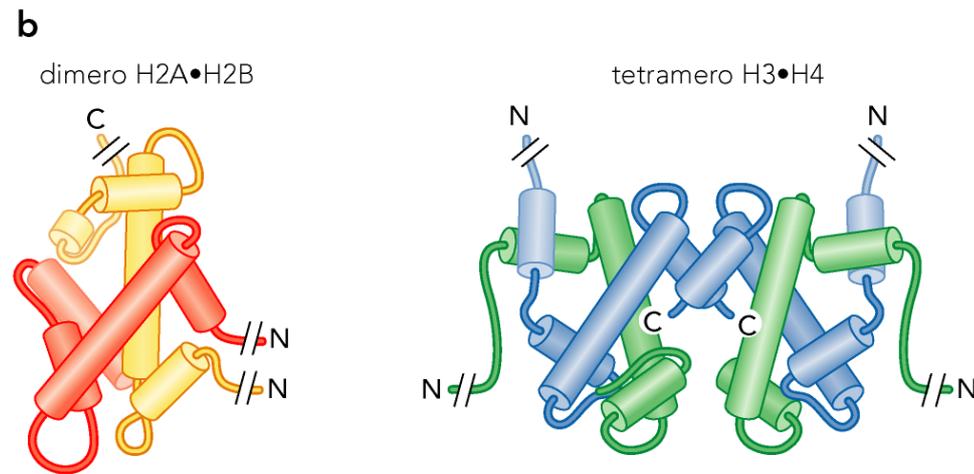
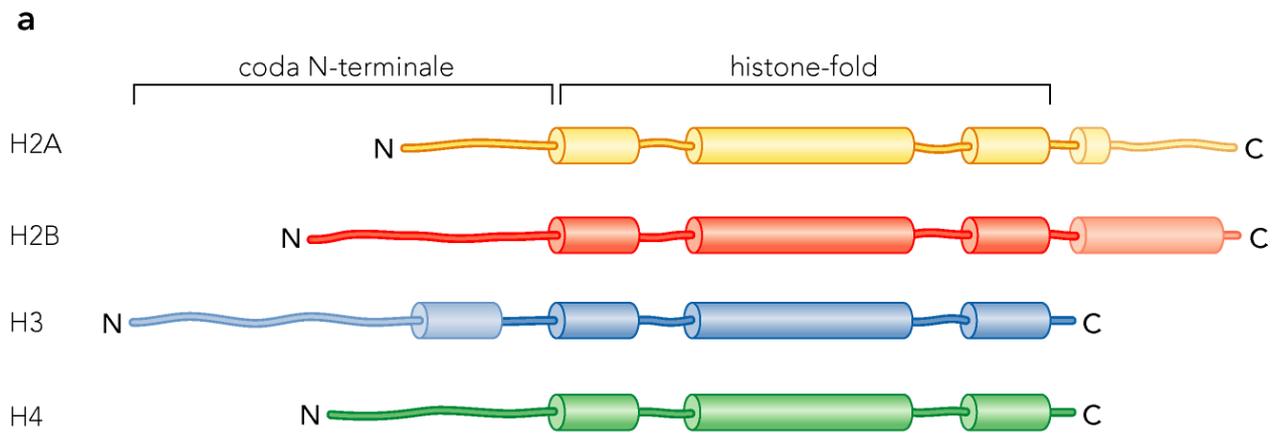
EUCROMATINA = stato disperso, trascritto, replicato

La cromatina è soggetta a cambiamenti nel corso del ciclo cellulare.

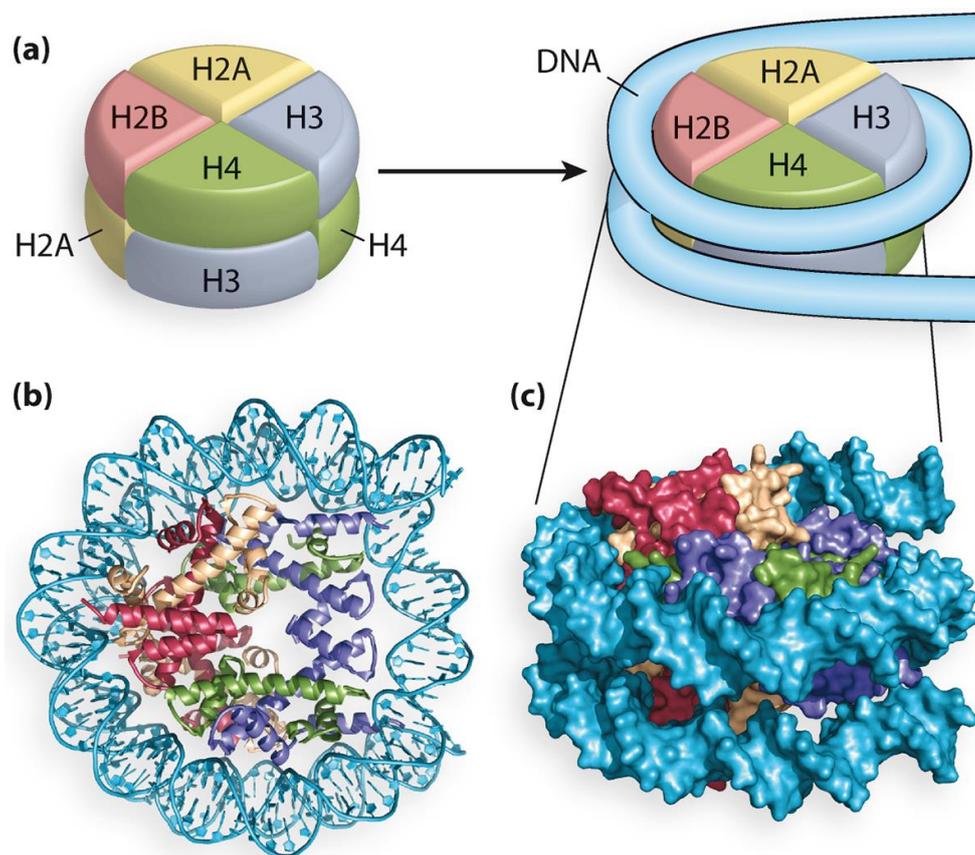
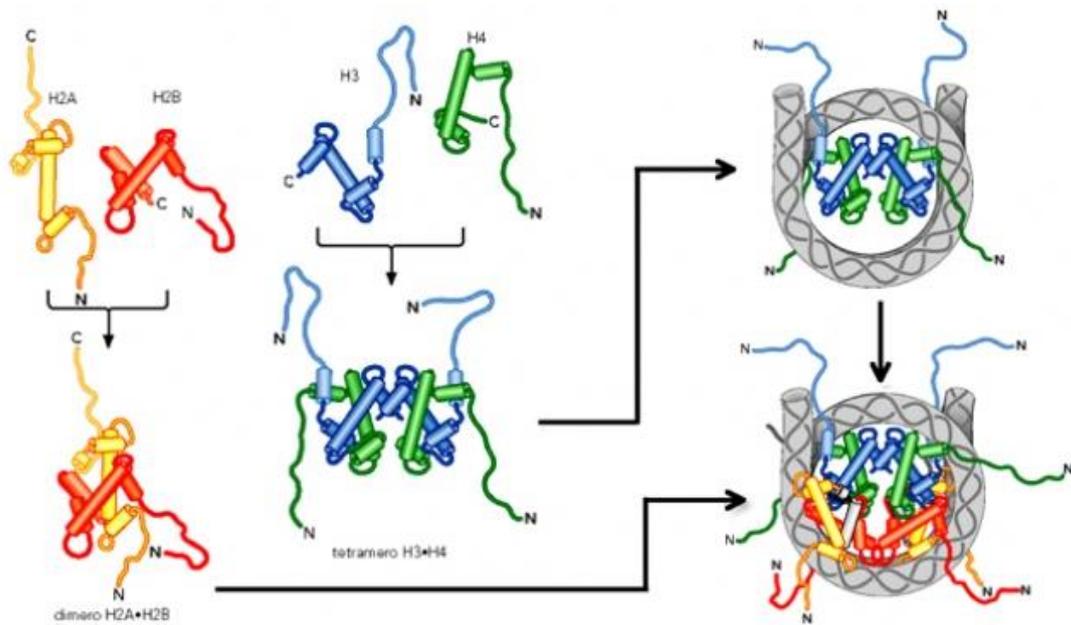
Cromosoma metafasico



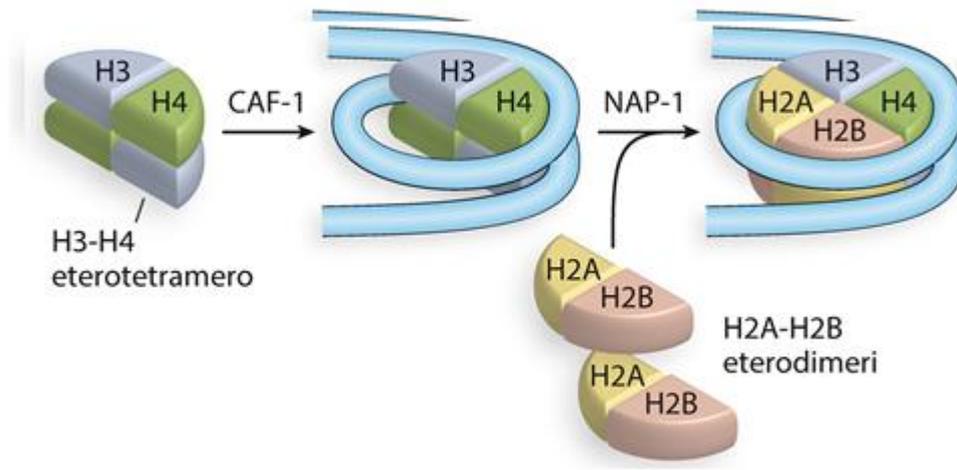
Gli **istoni** sono formati da regioni **globulari** e da regioni **basiche** ricche di **arginine** e **lisine**



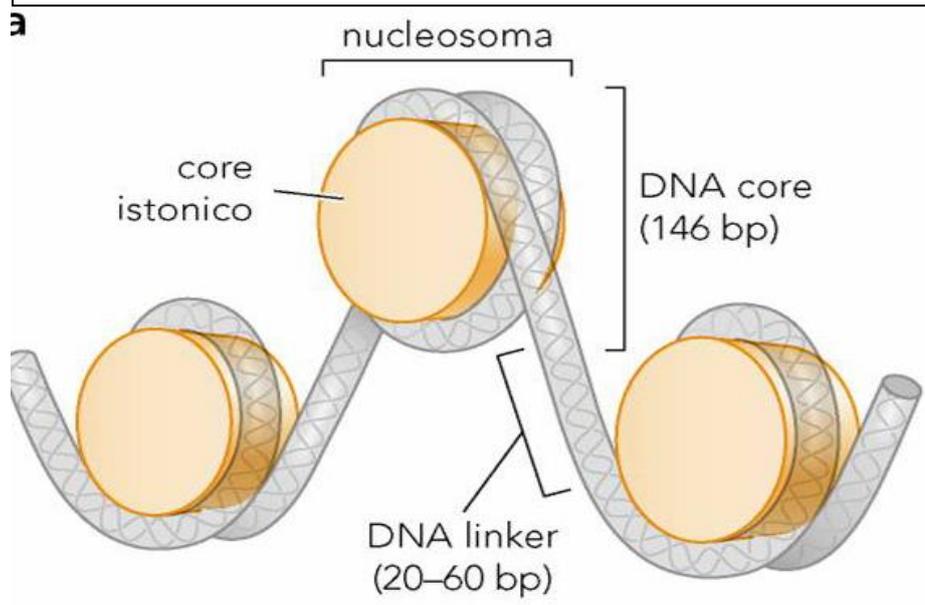
Assemblaggi nucleosoma

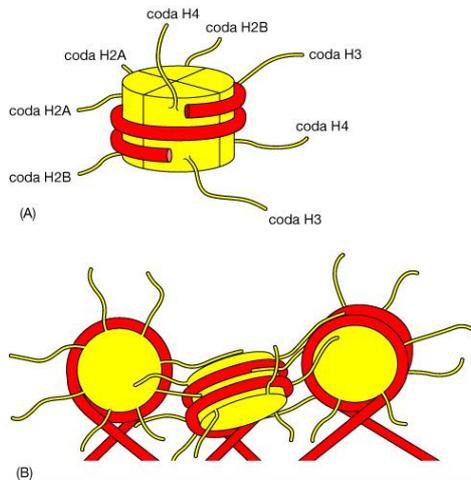


Cox

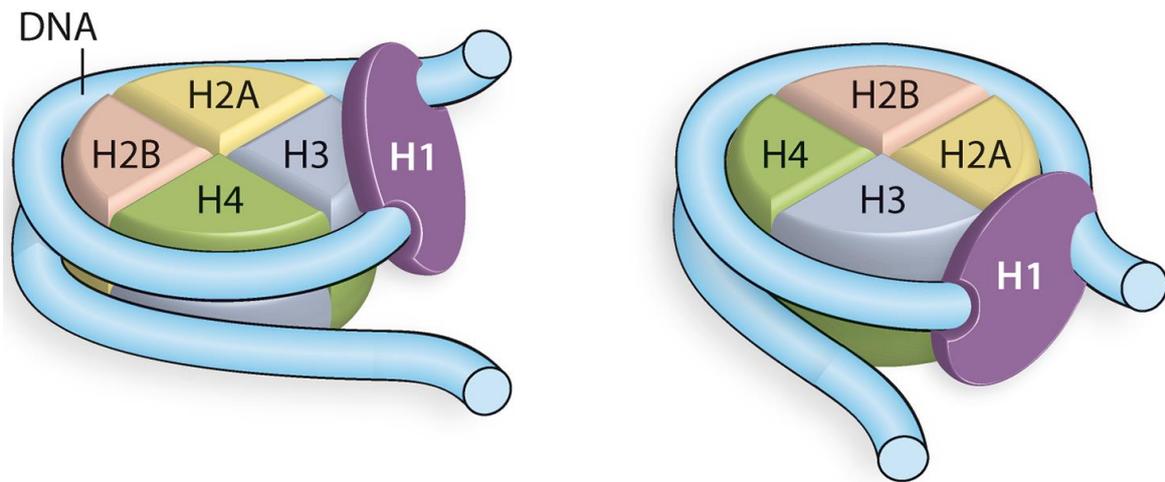


Assemblaggio dei nucleosomi mediato dalle **chaperonine istoniche (proteine acide)**

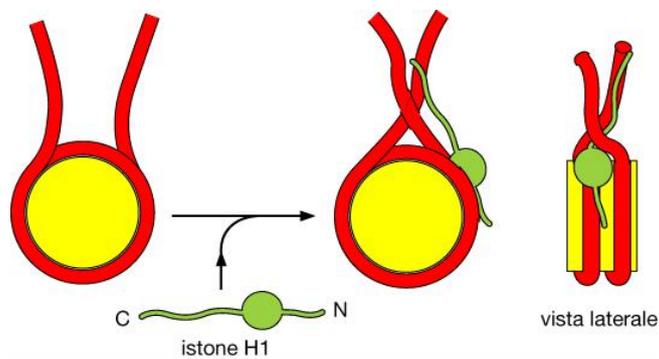


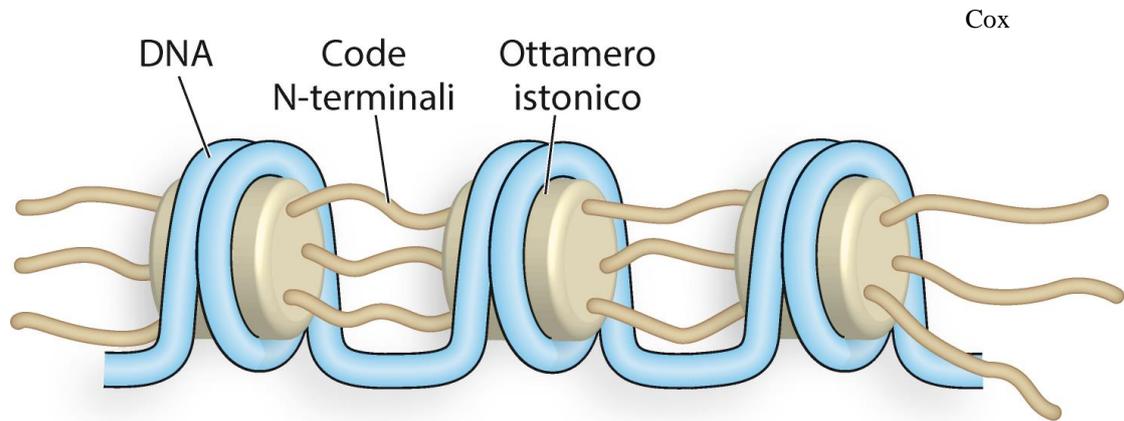
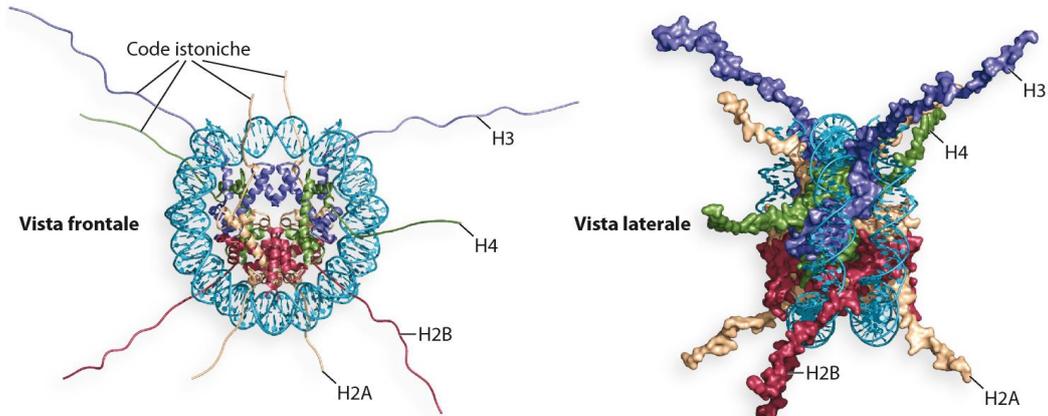


Estremità aminoterminali e compattamento



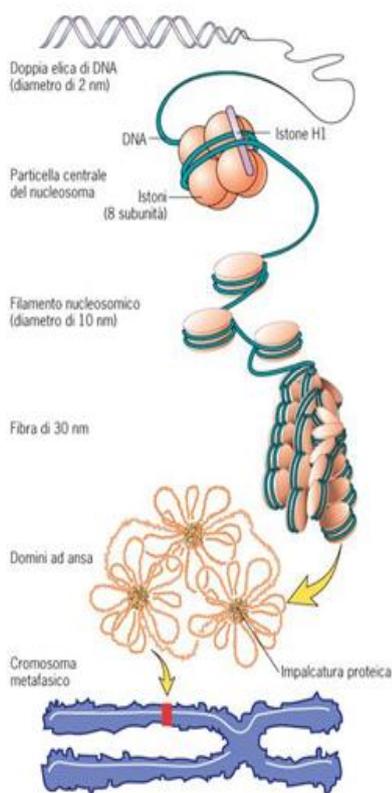
Cox





Le code protrudono e interagiscono con nucleosomi adiacenti, generando un più alto grado di impacchettamento del DNA, regolando l'accessibilità del DNA

Compattamento del DNA nel cromosoma



Diversi livelli organizzazione cromatina

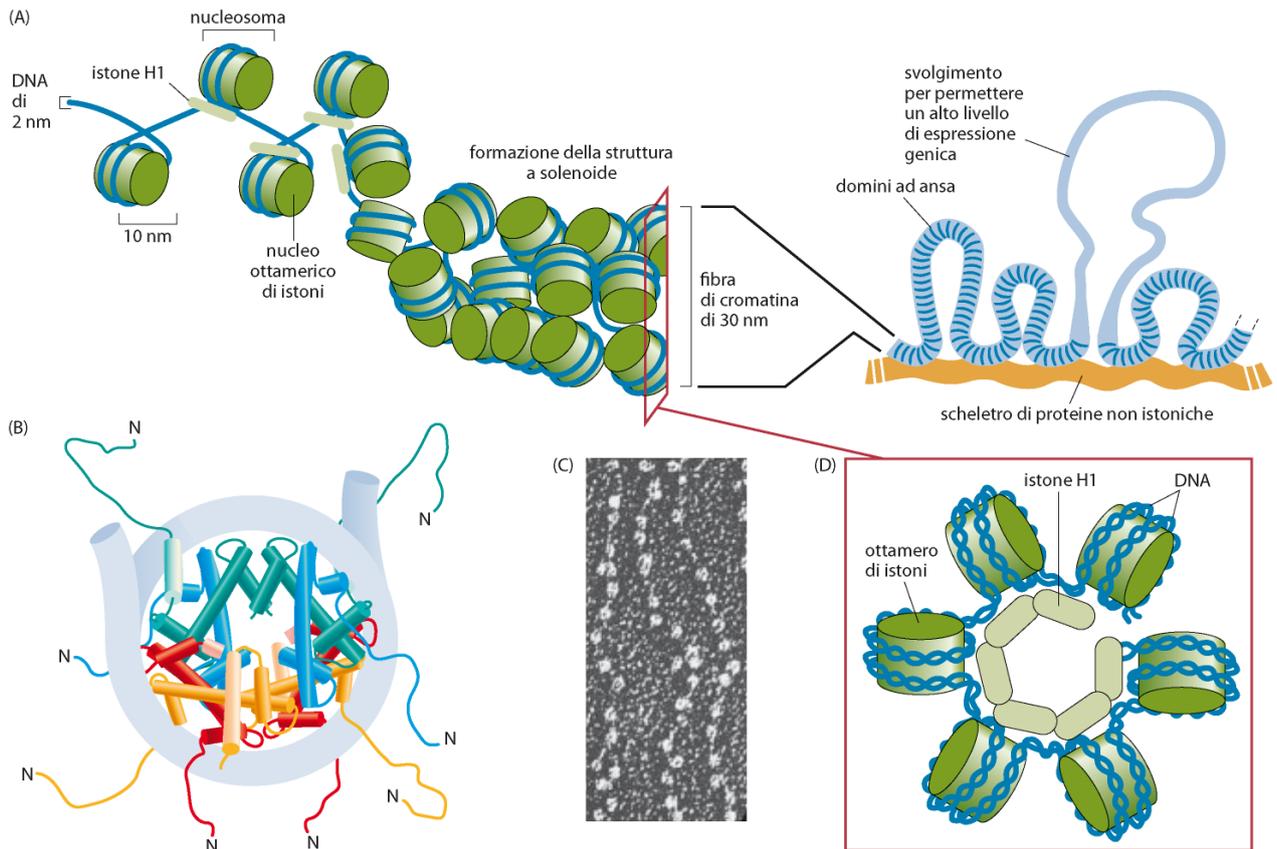
nucleosomi

fibre da 30nm (solenoid)

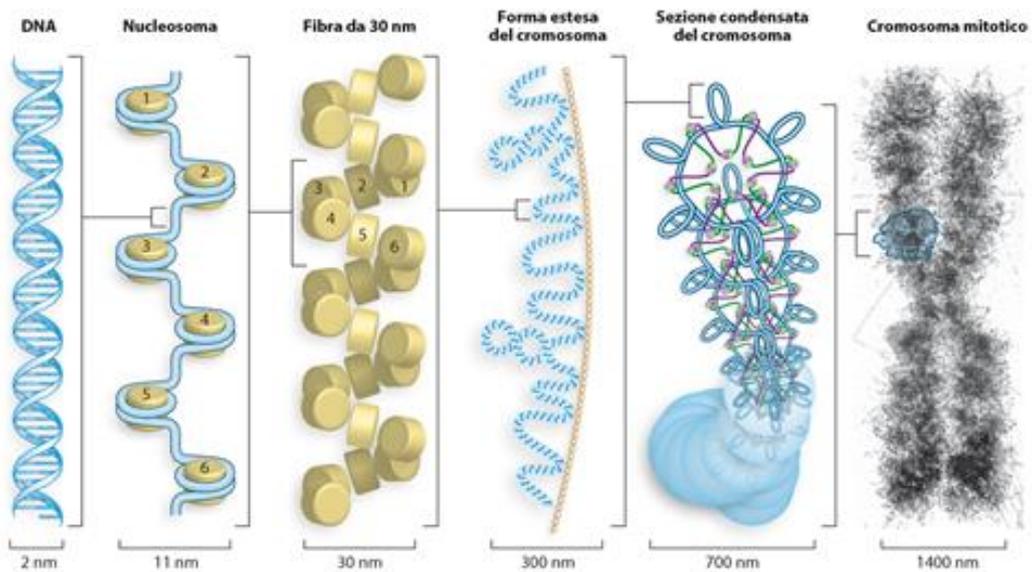
domini ad anse

rosette

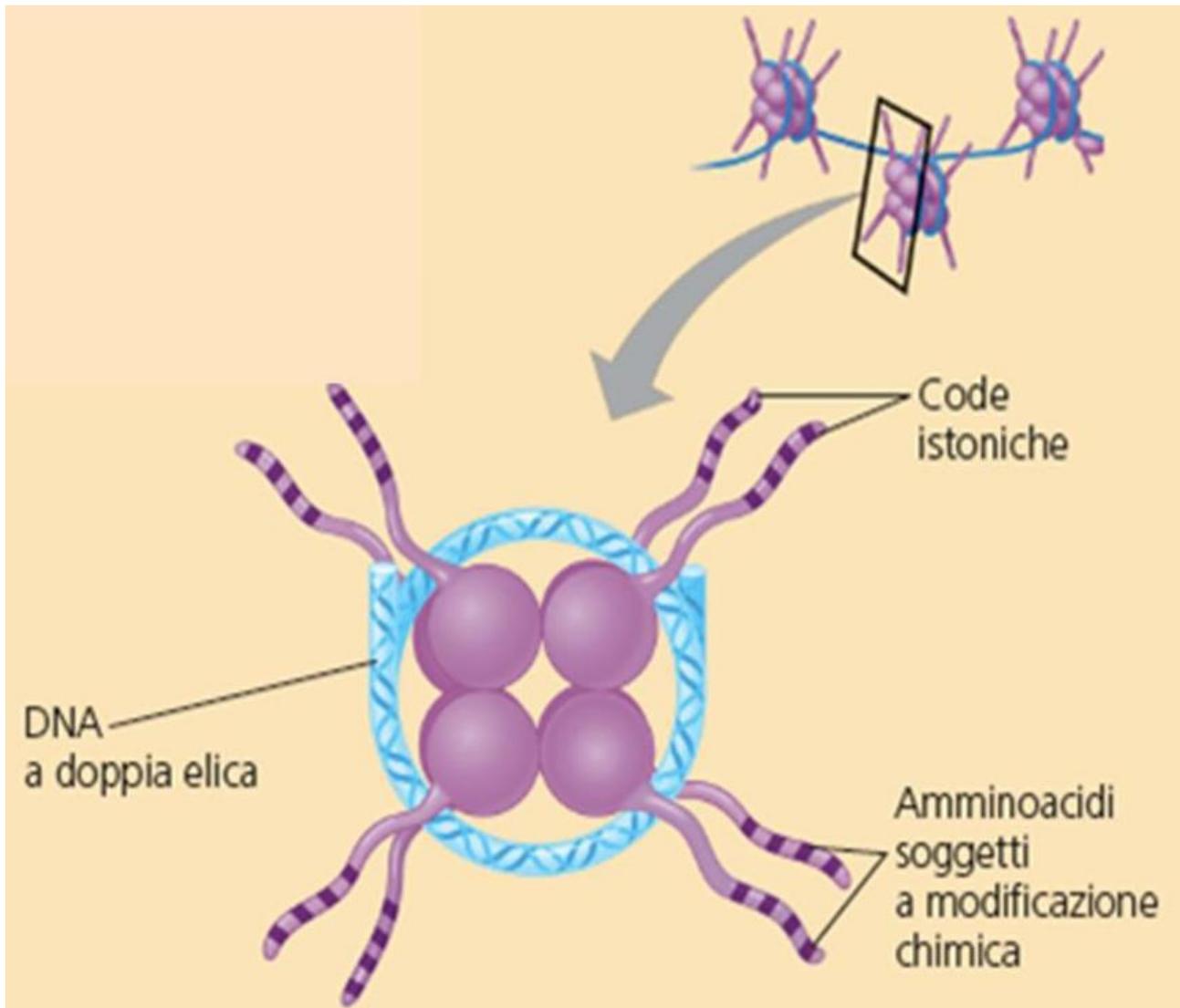
I cromosomi mitotici sono formati da due cromatidi fratelli tenuti insieme da un centromero



Genetica molecolare



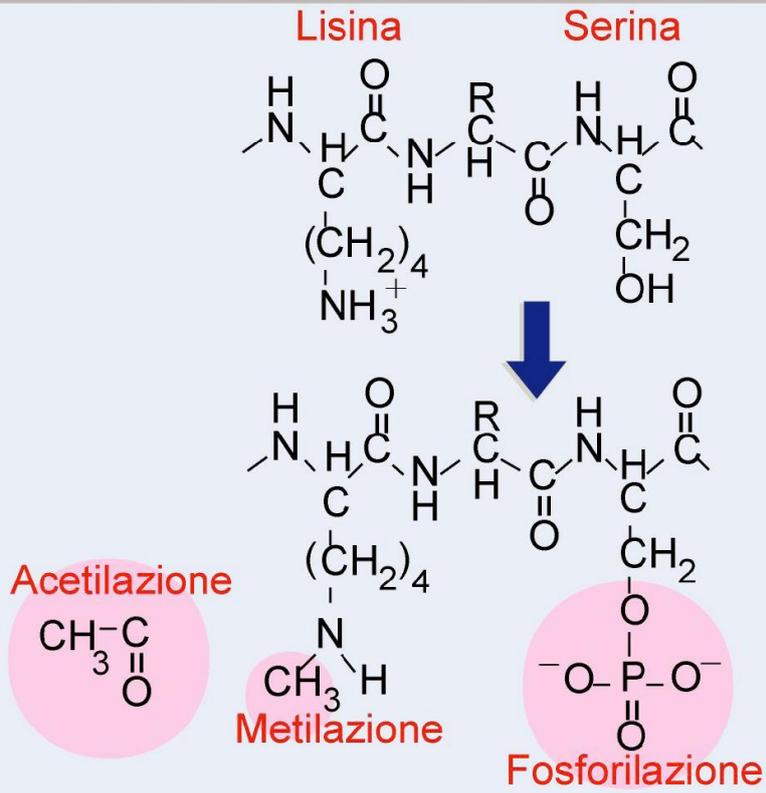
modificazione chimica reversibile delle code degli istoni



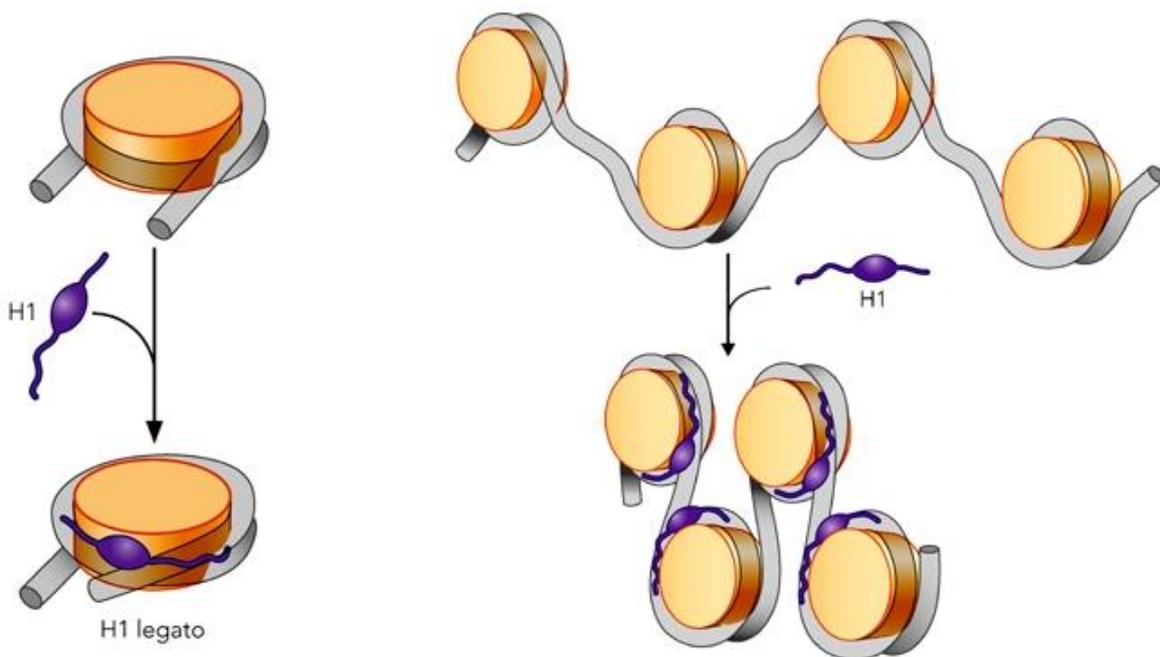
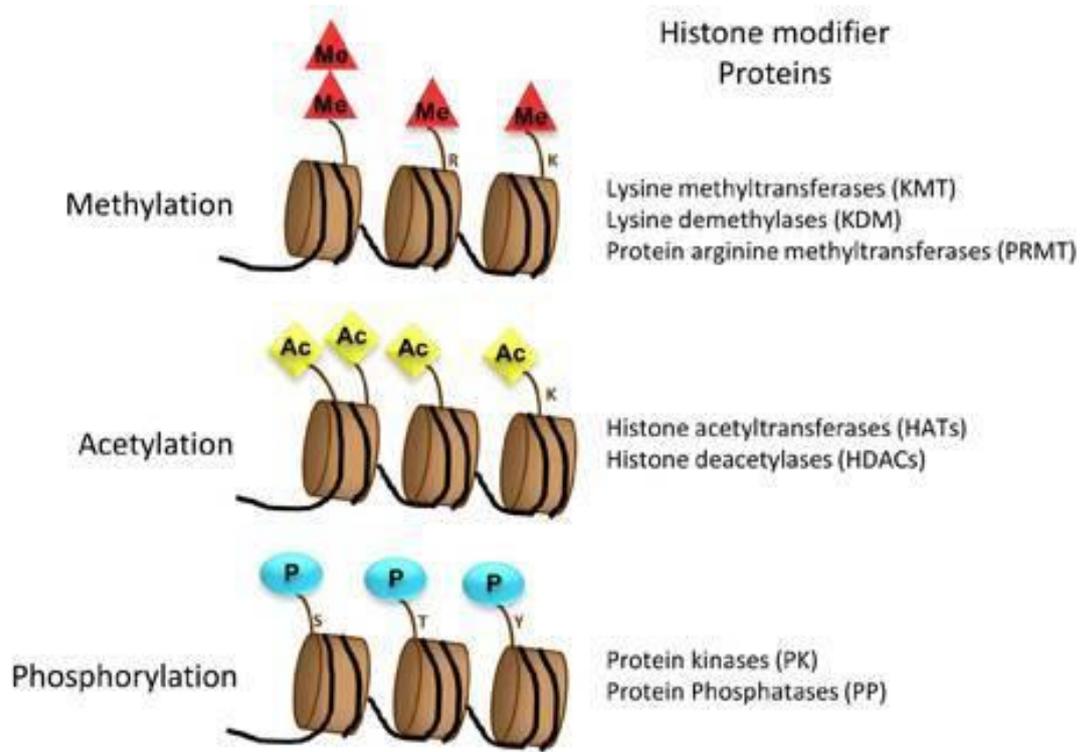
- **ACETILAZIONE E METILAZIONE DELLA LISINA**
- **FOSFORILAZIONE DELLA SERINA**

REGOLANDO così L'ESPRESSIONE DEL GENE

La lisina e la serina sono bersagli di modificazione



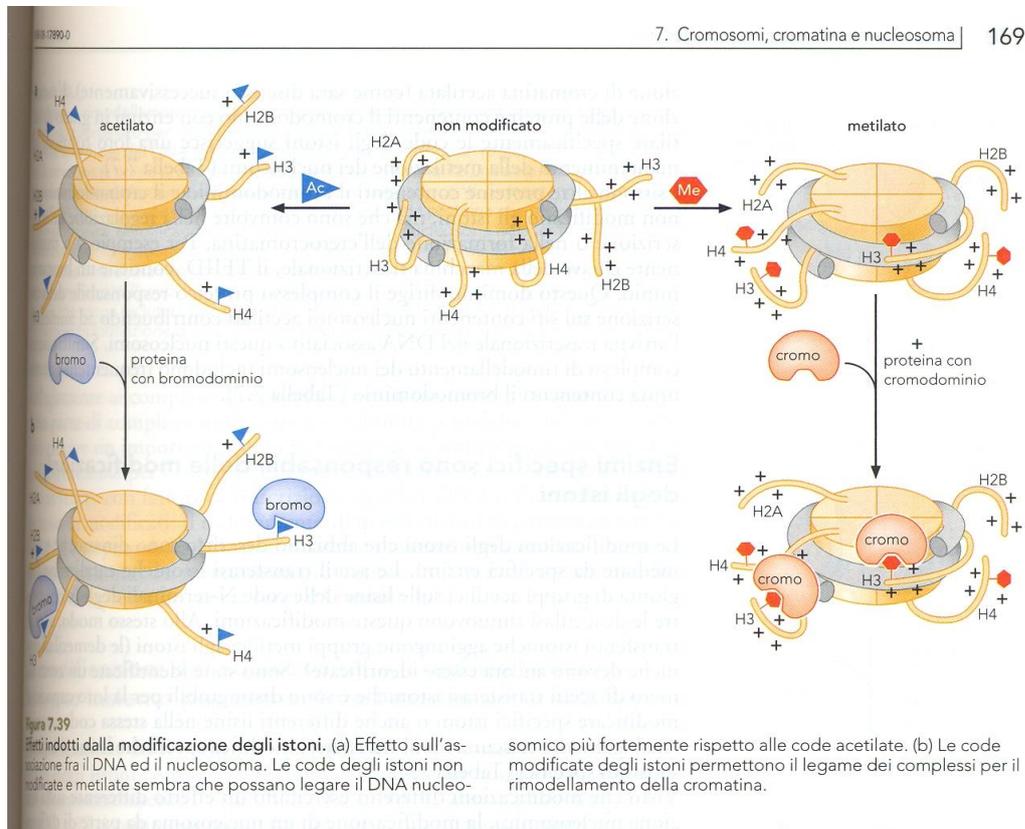
Enzimi modificatori degli istoni



H1 viene fosforilato e compatta cromatina

EFFETTI INDOTTI DALLA MODIFICAZIONE DEL CORE ISTONICO

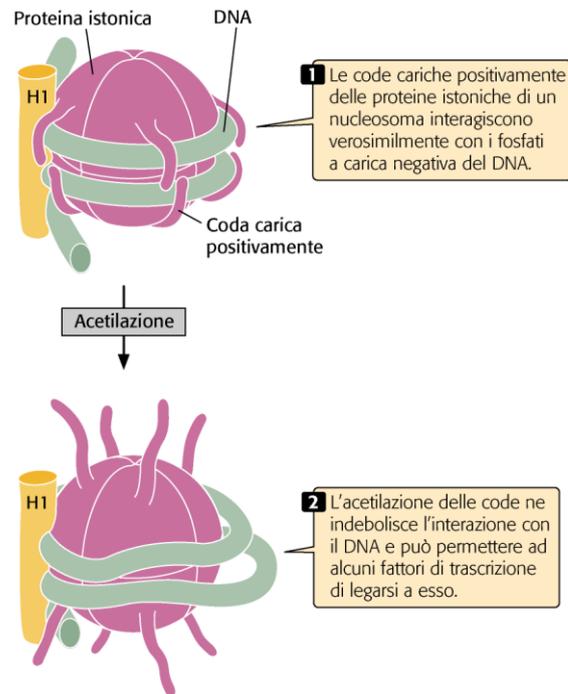
l'effetto di queste modificazioni è funzione sia del tipo di modificazione sia della loro posizione



acetilazione e metilazione determinano la riduzione delle cariche positive delle code istoniche e questo riduce l'affinità delle code per l'impalcatura del DNA

Le code modificate diventano capaci di legarsi con alta affinità a proteine che contengono domini strutturali chiamati bromo/cromodomini. Ad es. proteine che contengono il bromodominio posseggono attività acetiltransferasica e agiscono proprio sulle code istoniche, facilitando così il mantenimento e la creazione di cromatina acetilata.

L'acetilazione degli istoni è associato alla decondensazione della cromatina



Enzimi responsabili delle modificazioni degli istoni

Acetil transferasi (HAT): WRITERS

Deacetilasi (HDAC): ERASERS

Metil transferasi: WRITERS

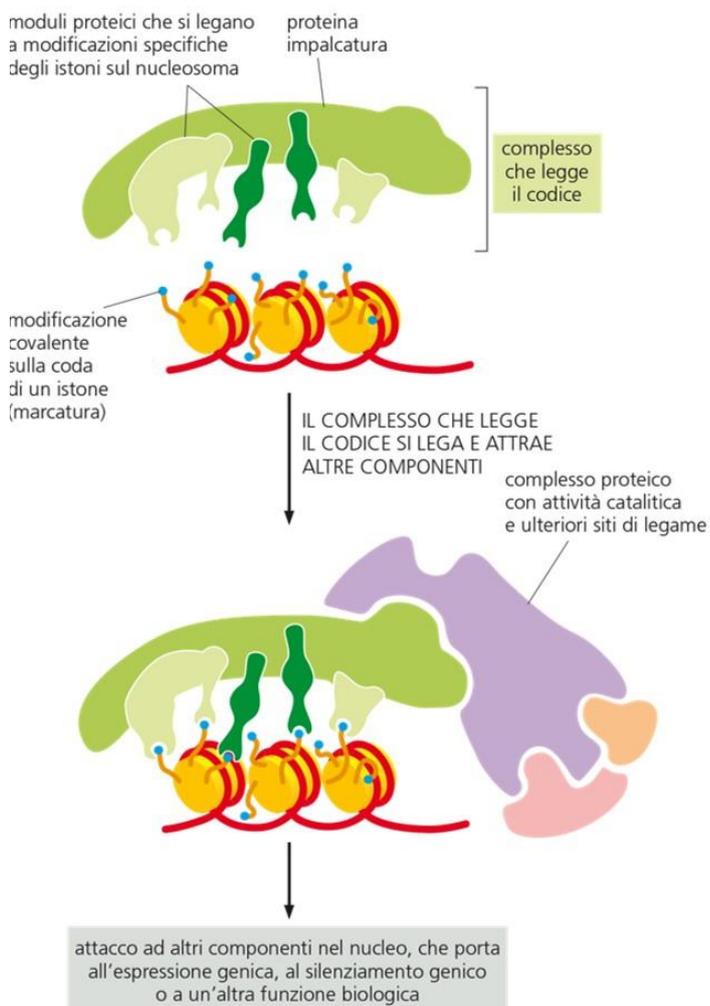
Demetilasi: ERASERS

Fosforilazione istone H1 (su serina/treonina): WRITERS

Codice istonico

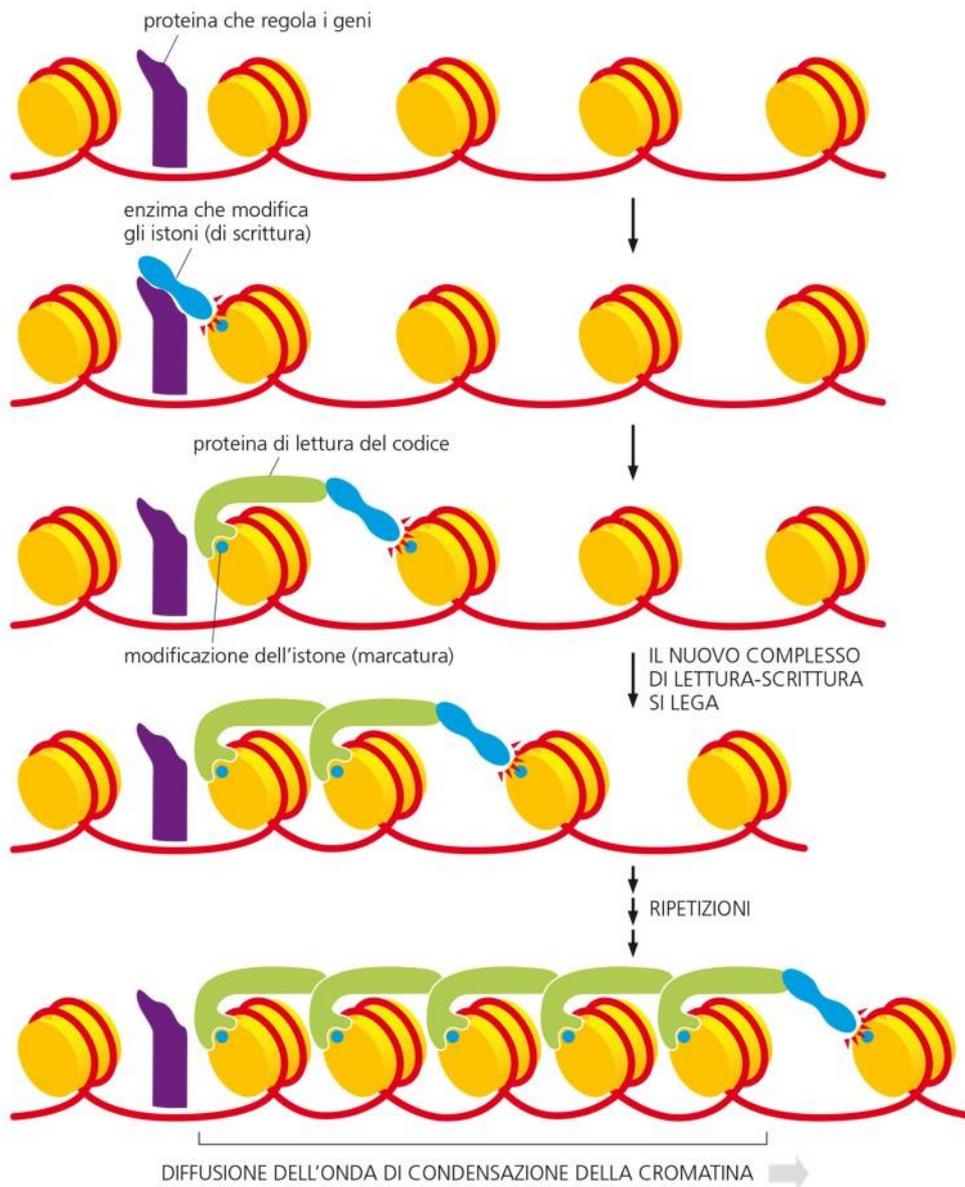
Per **codice istonico** si intende l'insieme delle modificazioni che subisce il nucleosoma sugli istoni (acetilazioni, metilazioni, fosforilazioni) che vengono "lette" dal **complesso lettore-scrittore** per:

- poter regolare lo stato della cromatina quindi regolazione genica
- necessità della cellula di entrare in meiosi o mitosi
- andare incontro ad apoptosi



Una particolare combinazione di modifiche istoniche, **scrittura**, può essere riconosciuta da un complesso che **legge il codice** (o di **lettura**). Il complesso che elimina la modifica chimica sono i **cancellatori**

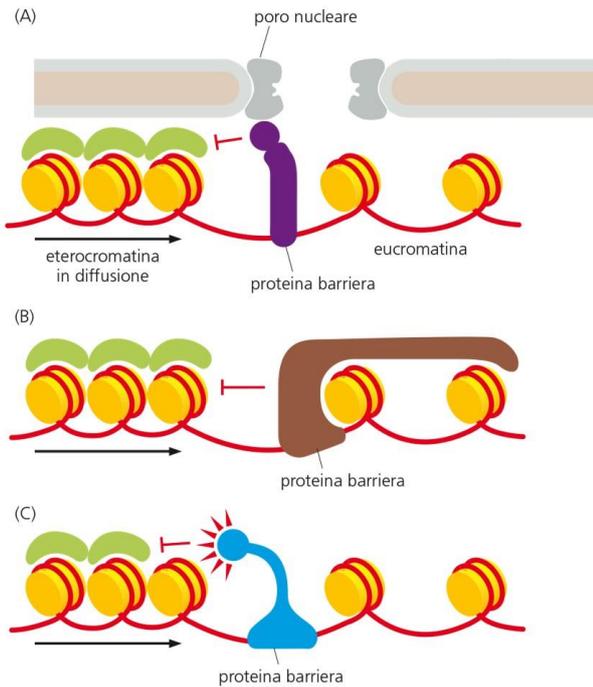
Reclutamento di un complesso di lettura-scrittura può diffondere cambiamenti della cromatina lungo il cromosoma



Alberts

I processi di "scrittura" e "lettura" consumano ATP.

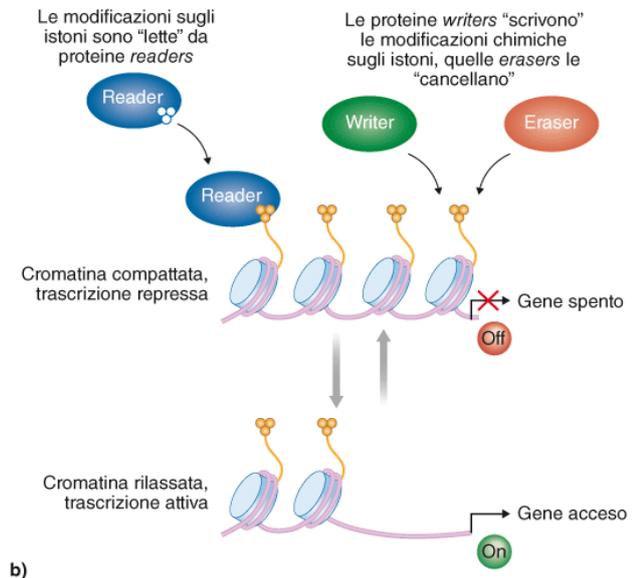
Meccanismi dell'azione di barriera



- A) Effetto barriera di un isolatore (insulators)
- B) Complesso proteina barriera e gruppo di nucleosomi che impediscono la propagazione
- C) Proteine barriera cancellano la modifica chimica necessaria per la diffusione

Alberts

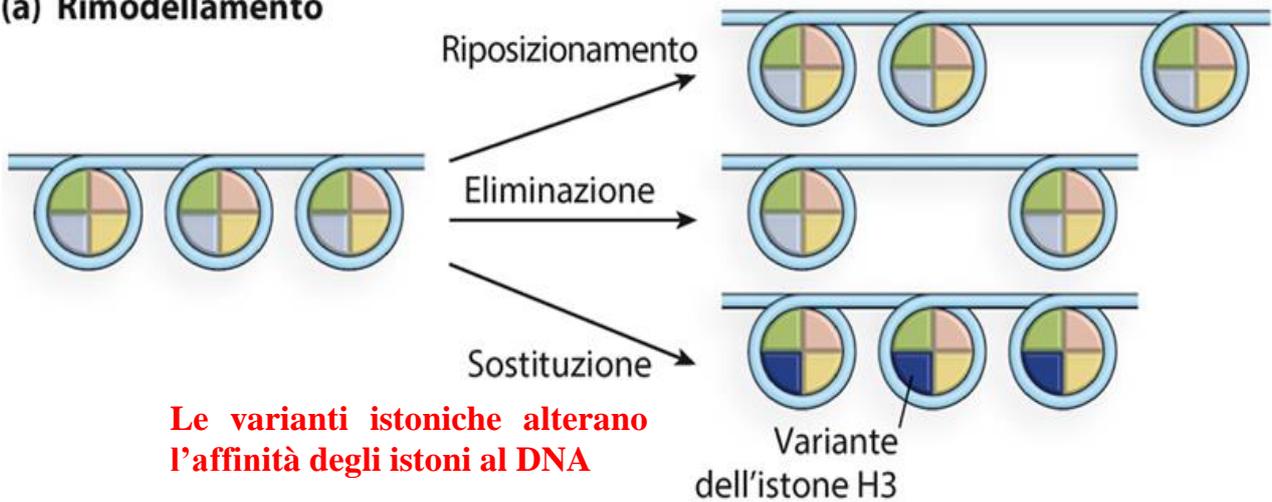
Il codice istonico. **a)** Le modificazioni chimiche di specifici residui amminoacidici sulle code N-terminali degli istoni del *core* possono combinarsi a formare un numero enorme di stati diversi. La figura mostra una possibile combinazione, e mette in evidenza il fatto che le modificazioni post-traduzionali possono riguardare, anche se in misura minore, anche la coda C-terminale e il dominio globulare degli istoni. **b)** L'utilizzo del codice istonico si basa sull'azione di proteine *writers* e *erasers*, in grado di produrre o cancellare le modificazioni chimiche, e di proteine *readers*, che leggono le specifiche modificazioni chimiche e producono gli effetti conseguenti, che normalmente portano a stati di compattamento diversi della cromatina e a modulazione dell'espressione di specifici geni.



Capranico

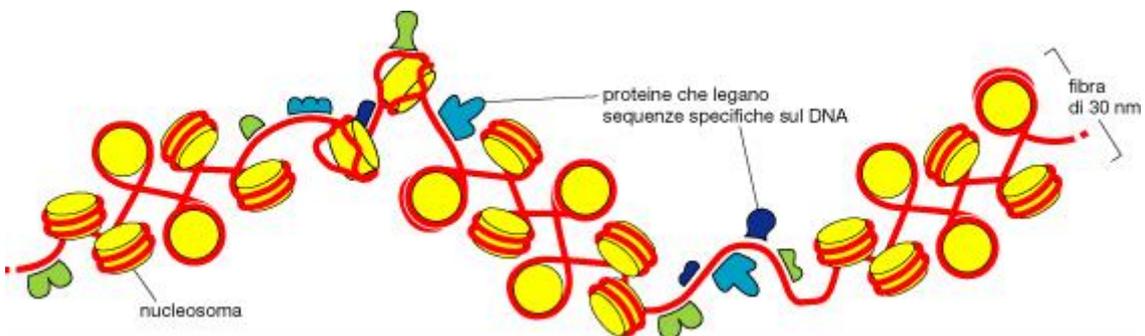
MODIFICAZIONE DELL'ORGANIZZAZIONE NUCLEOSOMALE

(a) Rimodellamento

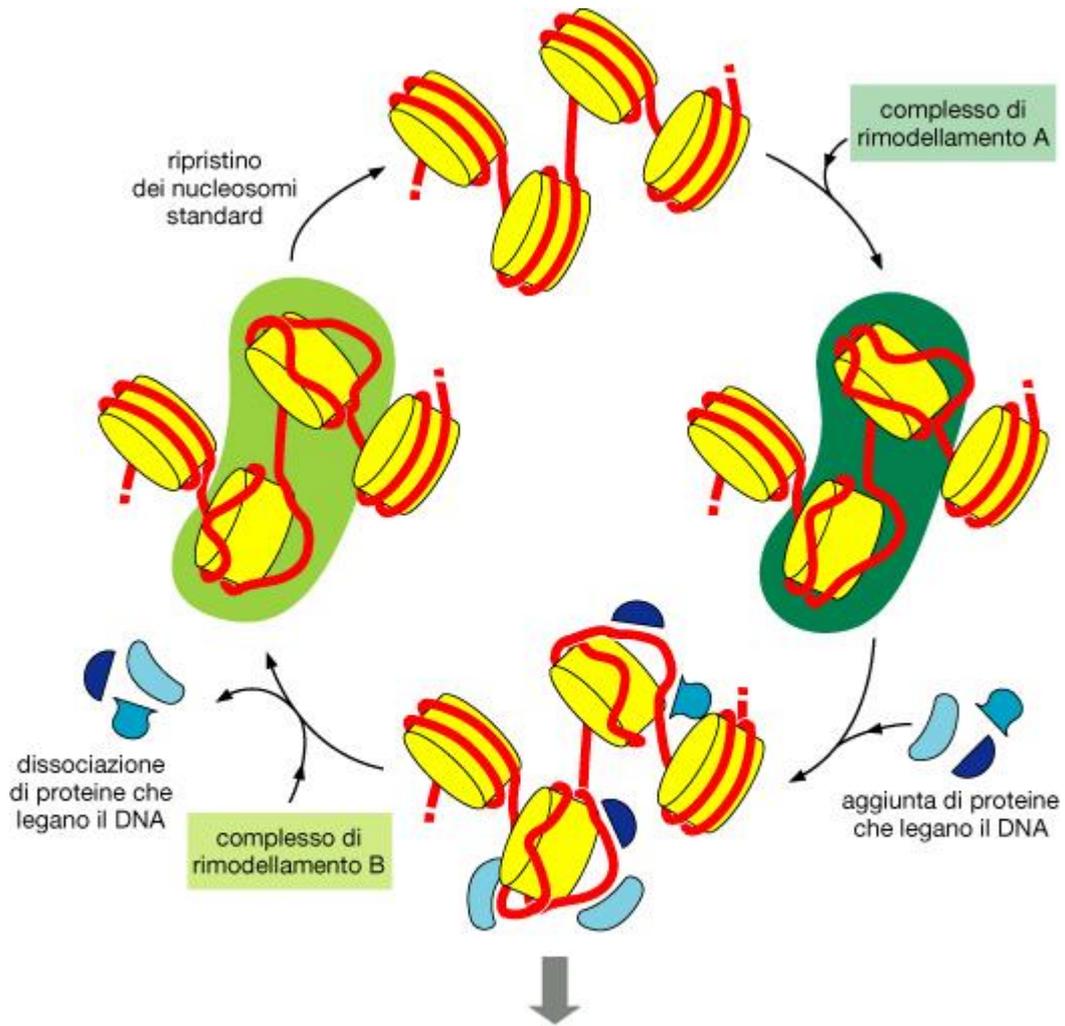


Cox

I nucleosomi sono intrinsecamente **dinamici**: la posizione dei nucleosomi può essere modificata da **complessi di rimodellamento** che muovono, eliminano o sostituiscono i nucleosomi utilizzando ATP.

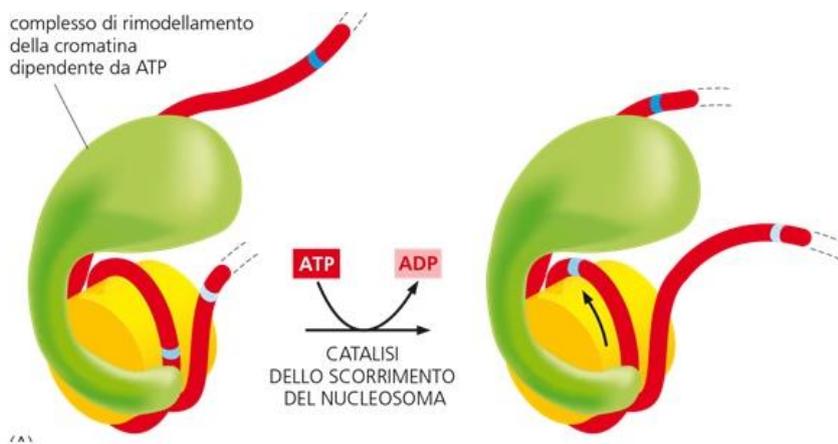


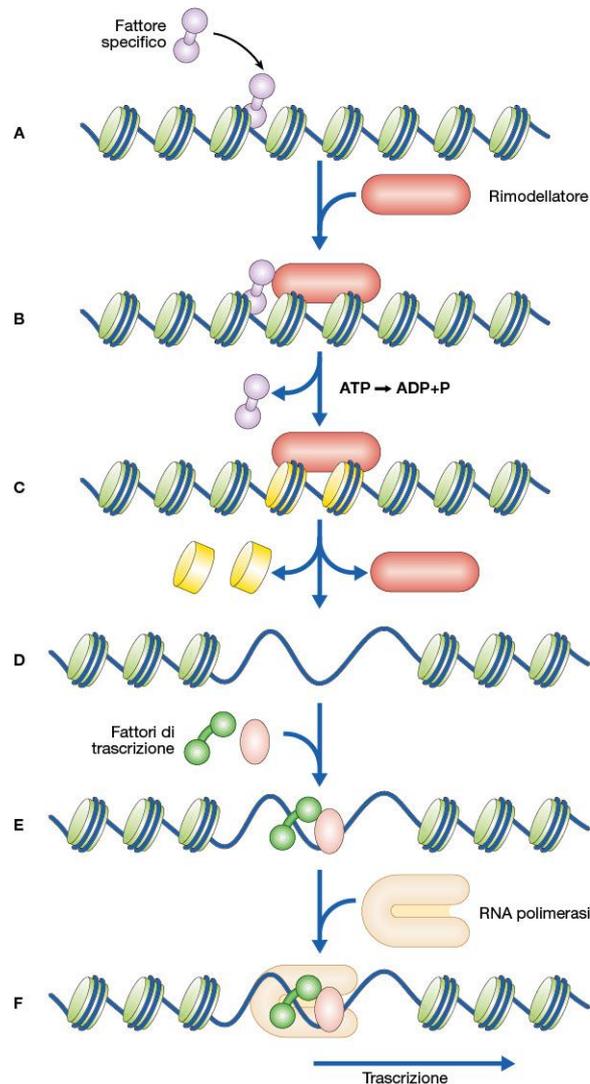
modello ipotetico per le code degli istoni nella formazione della fibra



ESPRESSIONE DEI GENI, REPLICAZIONE DEL DNA E ALTRI PROCESSI CHE RICHIEDONO ACCESSO AL DNA COMPATTATO NEI NUCLEOSOMI

Alberts

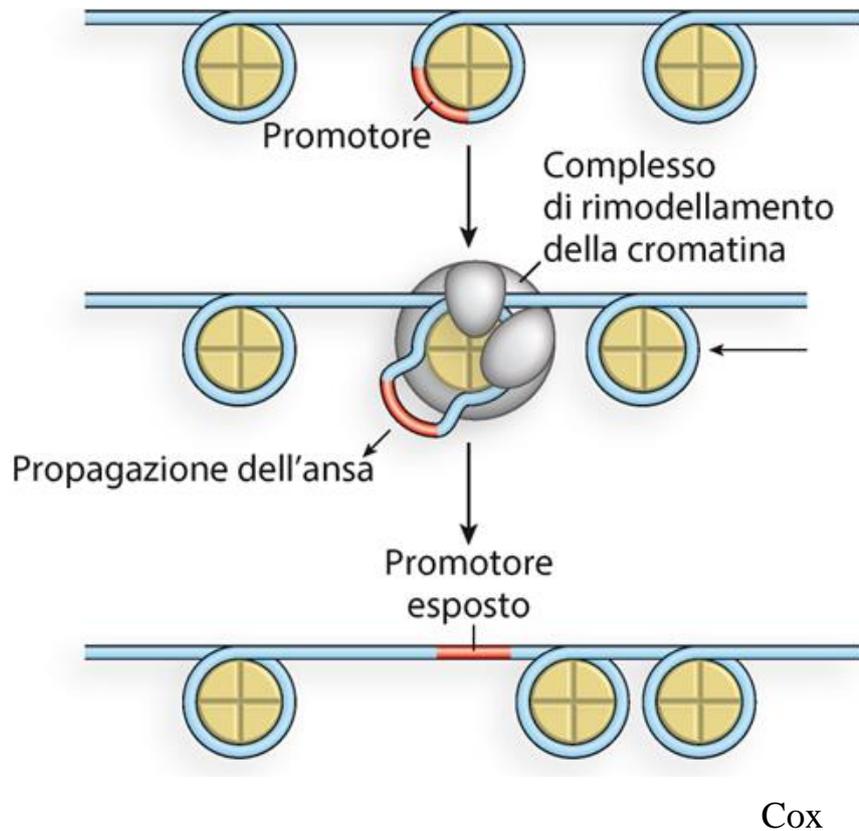




Modello schematico dell'attivazione di un gene da parte di un "rimodellatore" ATP-dipendente. (A) Un fattore specifico riconosce e lega una sequenza di DNA esposta nella regione cromatinica adiacente al gene che deve essere attivato. (B) Il fattore recluta il complesso di rimodellamento. (C) Il fattore viene rilasciato mentre il rimodellatore, utilizzando l'energia rilasciata dalla idrolisi di ATP, induce cambiamenti strutturali della cromatina che risultano in un indebolimento delle interazioni istoni-DNA. (D) I nucleosomi vengono rilasciati (o spostati sul DNA) in modo da rendere accessibile la regione del promotore. (E) I fattori di trascrizione possono ora riconoscere e assemblarsi sul promotore. (F) I fattori di trascrizione reclutano la RNA polimerasi, che può iniziare la trascrizione stessa.

Meccanismo di rimodellamento

Il promotore viene allontanato dal nucleosoma



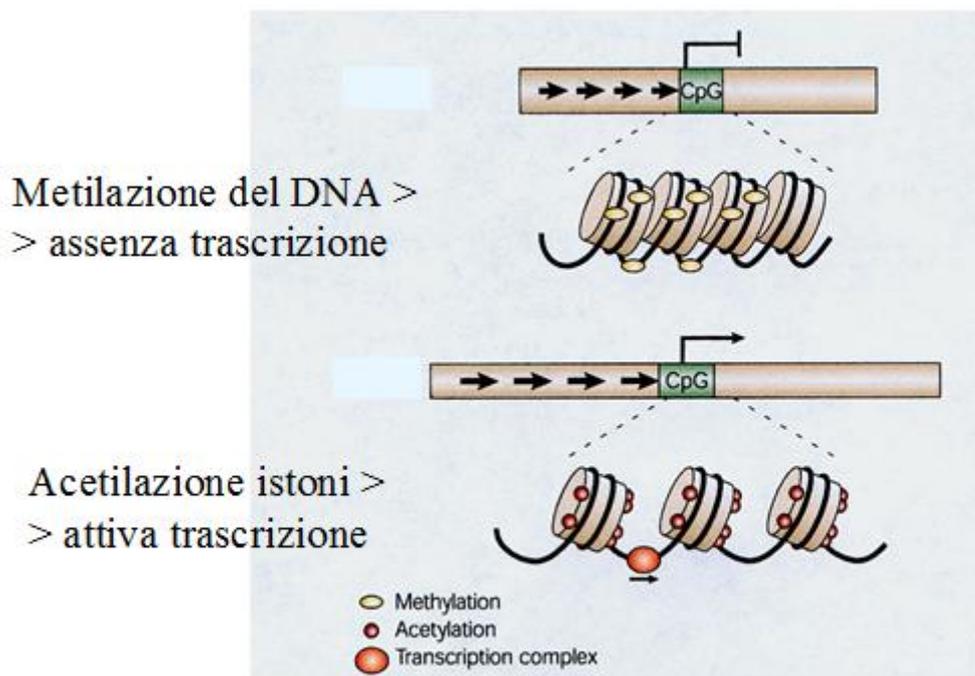
In sintesi

La cromatina trascrizionalmente attiva è demetilata e iperacetilata

I geni silenziati sono deacetilati sugli istoni e presentano metilazione delle citosine nel DNA

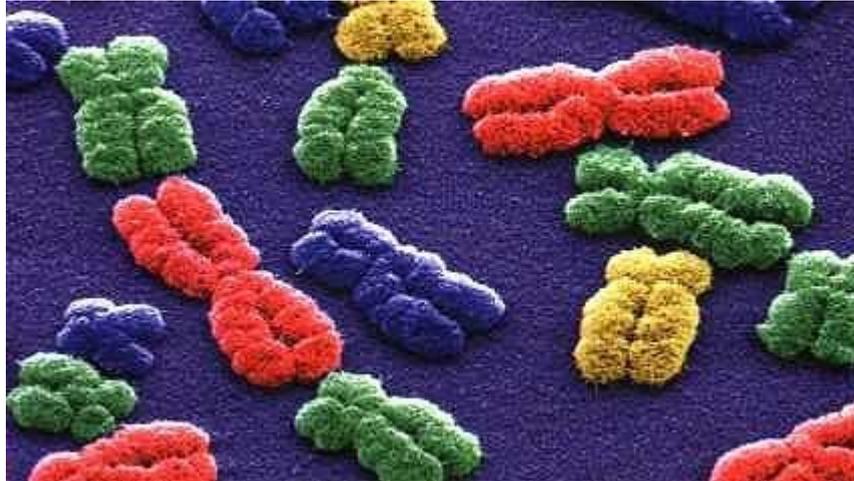
Le modificazioni principali della cromatina sono:

- metilazione del DNA
- acetilazione e metilazione degli istoni



TRASMISSIONE EPIGENETICA

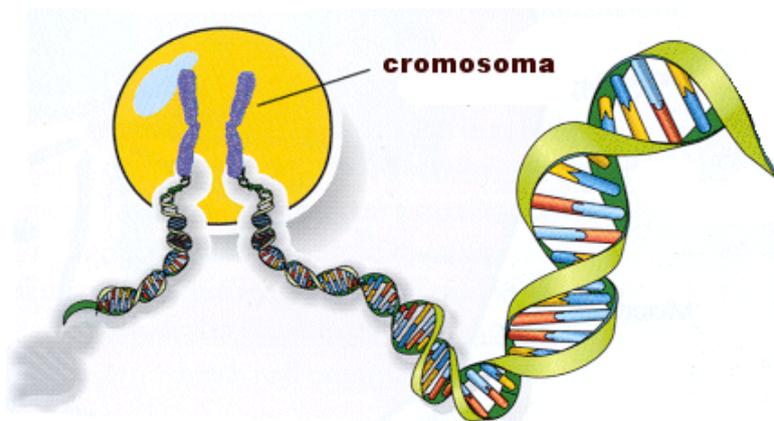
Quindi oltre ad ereditare i geni, la progenie eredita anche le modificazioni istoniche che controllano l'espressione di quei geni.

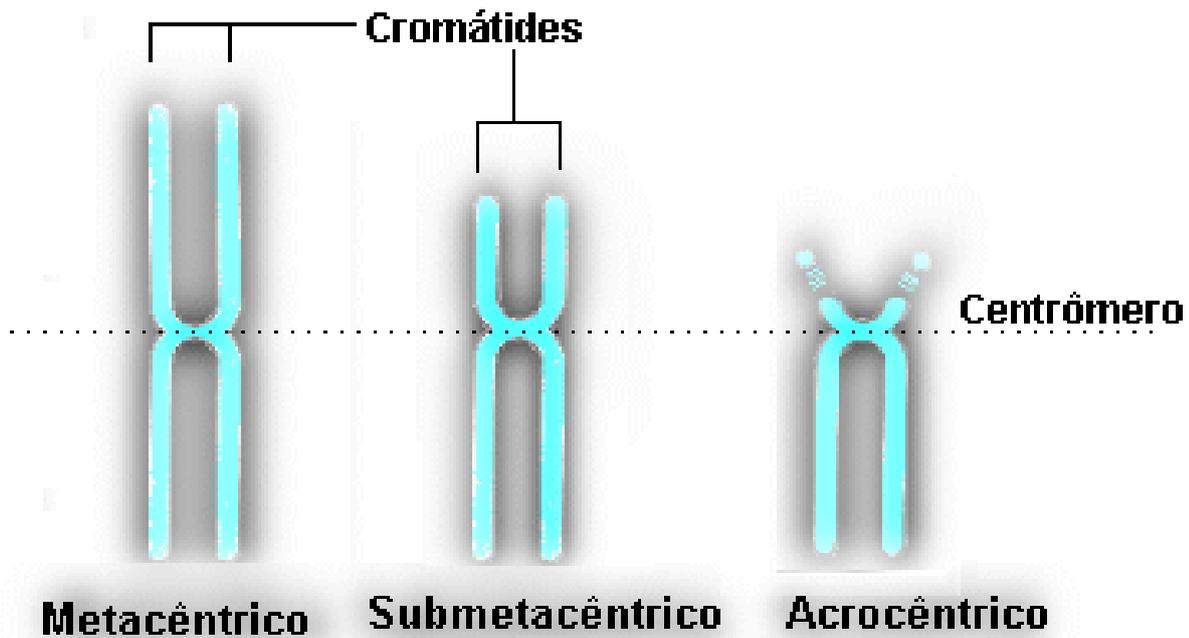


I cromosomi

I cromosomi sono macromolecole presenti nel nucleo delle cellule. Essi sono **visibili** durante la **divisione cellulare** e sono simili a bastoncini diritti o piegati, lunghi pochi micron sdoppiati in due filamenti (cromatidi) costituiti da DNA avvolto in una guaina proteica e uniti in un sol punto (centromero).

Sui cromosomi si trovano in successione lineare i geni, unita' fondamentali dell' informazione ereditaria.



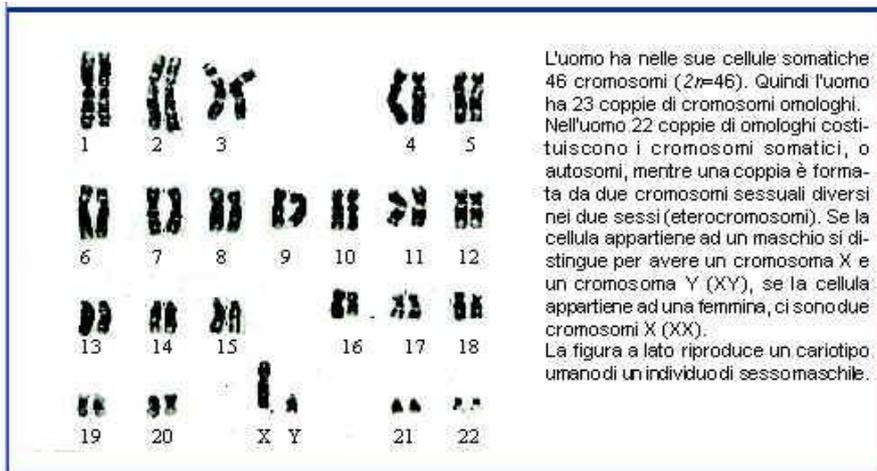


classificazione dei cromosomi a seconda della forma presentata alla metafase, determinata a sua volta dalla posizione del centromero

Nel cromosoma riconosciamo

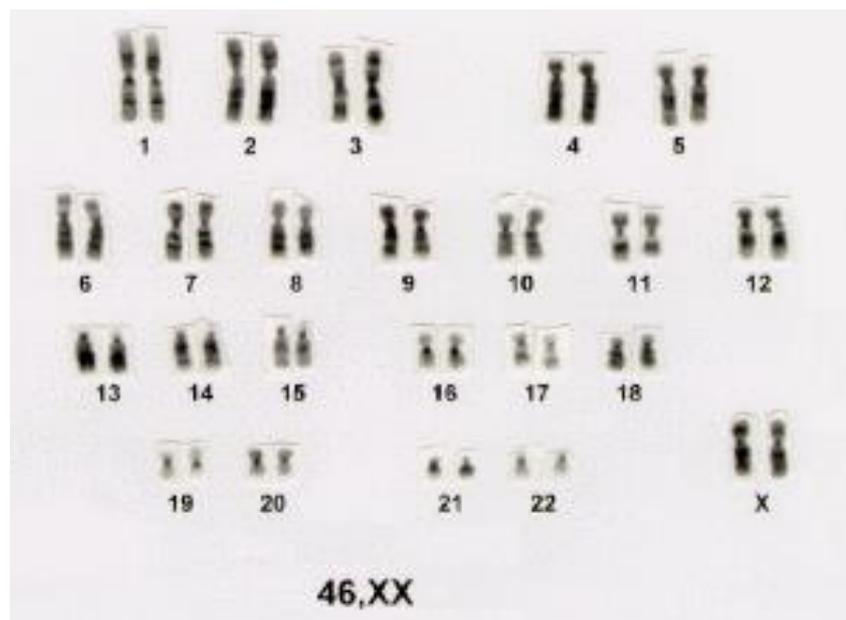
- *i telomeri*
- *il centromero*

il numero, le dimensioni e la forma dei cromosomi definiscono il **cariotipo**



44 + XY

**2 x 23
Corredo
diploide**



I **44** sono gli **autosomi**

XX e **XY** sono i **cromosomi sessuali**

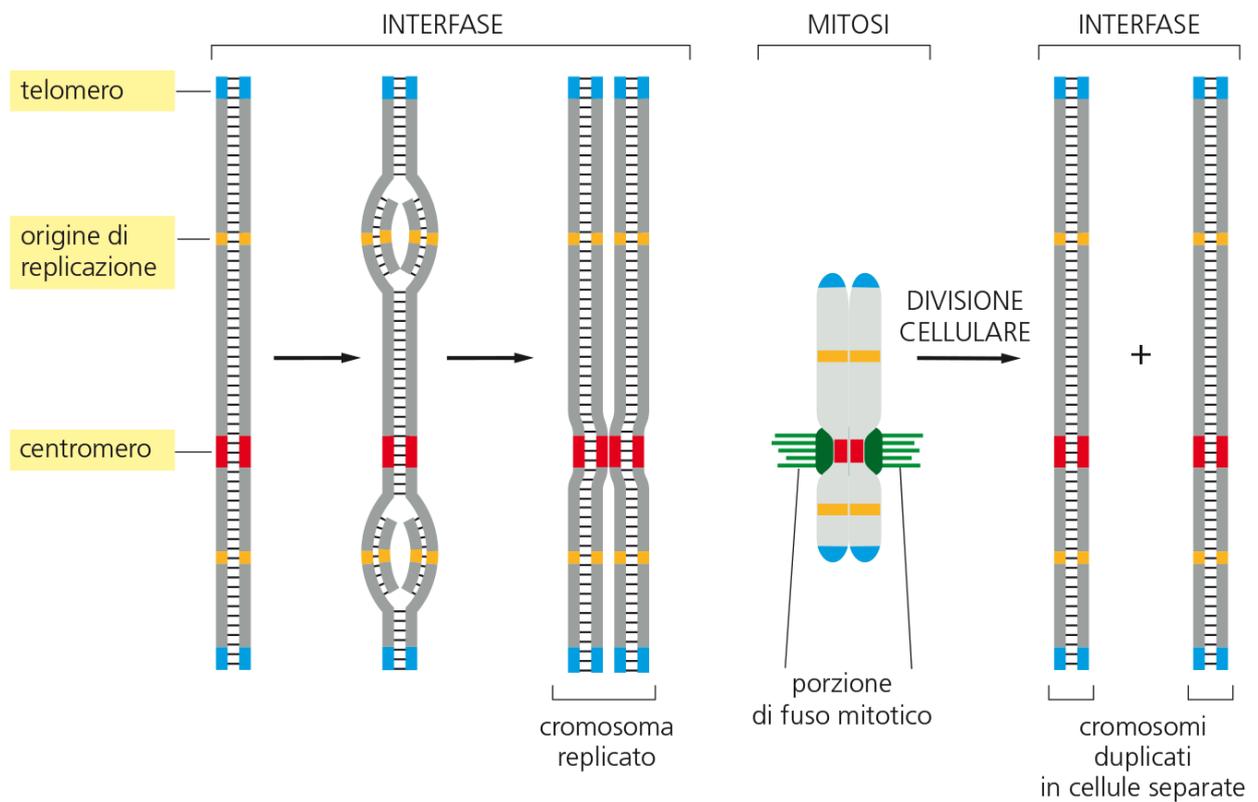
I cromosomi possono avere 1 o 2 cromatidi e questo dipende dalla fase del ciclo cellulare

G1 = 1 cromatide

S = duplicazione DNA, 2 cromatidi

G2 = 2 cromatidi

Fine mitosi = 1 cromatide



GENOMA

Comparazione della densità genica in cromosomi di differenti organismi

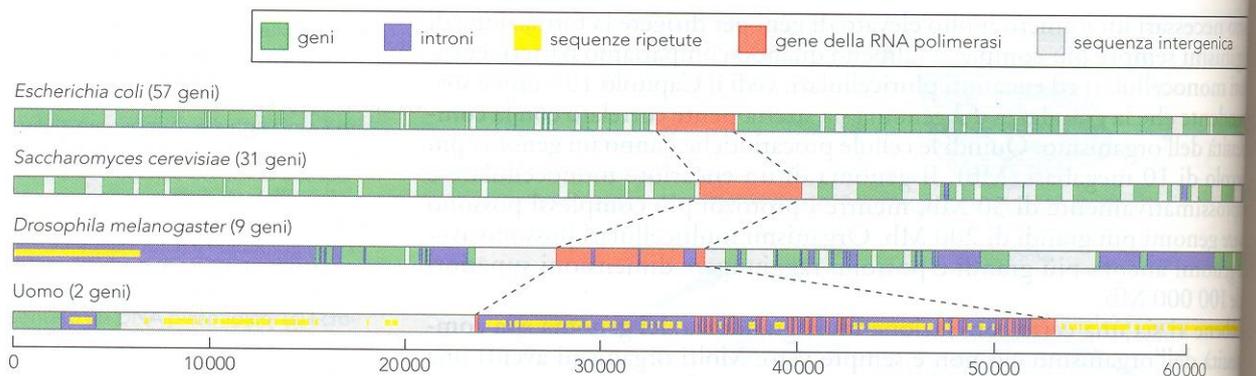


Figura 7.2

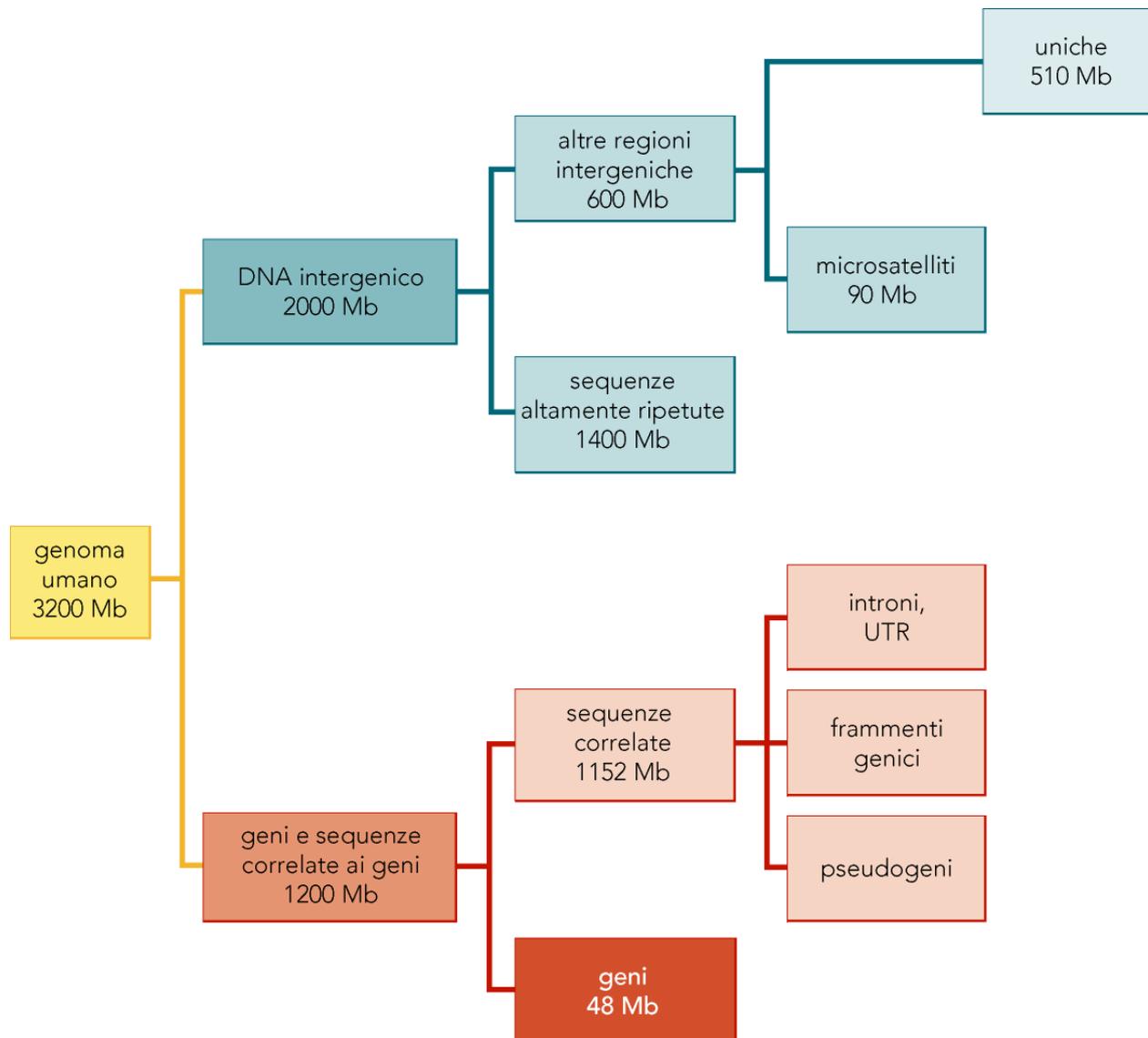
Comparazione della densità genica in cromosomi di differenti organismi. La figura illustra una regione rappresentativa di 65 kb di DNA per ciascun organismo. La regione che codifica per la subunità maggiore della RNA polimerasi (RNA Pol II per le cellule eucariotiche) è indicata in rosso. Da notare come il numero dei geni codificati all'interno di un tratto di DNA della stessa lunghezza diminuisce con l'aumentare della complessità dell'organismo.

Il genoma di *E. coli* è formato quasi interamente da geni

La maggior parte del cromosoma del batterio *E. coli* codifica per proteine o per RNA strutturali (Figura 7.2). La maggior parte delle sequenze non codificanti è adibita alla regolazione trascrizionale dei geni (come vedremo nel Capitolo 16). Poiché viene normalmente usato un sito specifico da cui parte l'evento trascrizionale ed il controllo dell'espressione di alcuni geni, anche queste regioni sono ridotte al minimo nel genoma. In *E. coli* è presente un elemento importante del genoma che non fa parte dei geni: l'origine di replicazione del DNA. Questa piccola regione del cromosoma è utilizzata per dirigere l'assemblaggio della macchina replicativa (come verrà discusso nel Capitolo 8). Nonostante quest'importante ruolo, questa regione è molto piccola occupando solo poche centinaia di

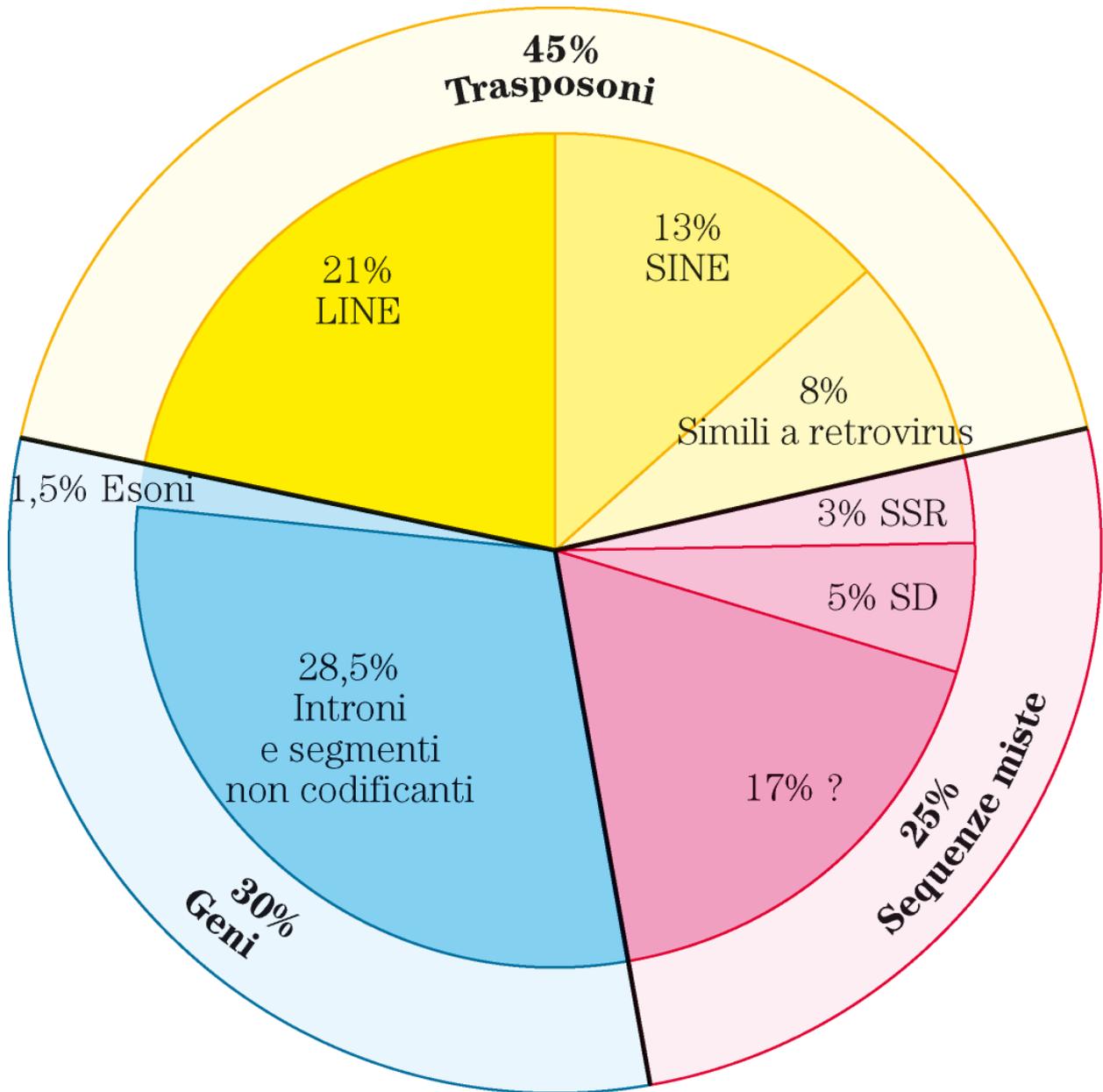
- **La grandezza del genoma è correlata alla complessità dell'organismo**

L'organizzazione ed il contenuto del genoma umano



Biologia Molecolare del Gene Watson

il genoma umano è composto da molti tipi di sequenze differenti, la maggior parte della quali non codificano proteine (DNA intergenico)
all'interno delle sequenze uniche ci sono le sequenze regolative

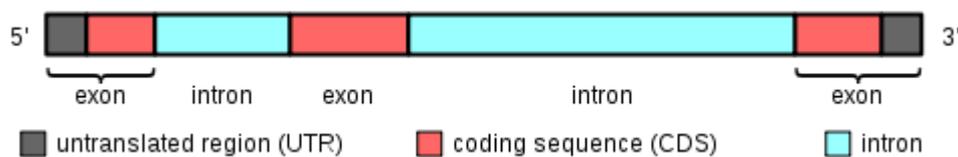
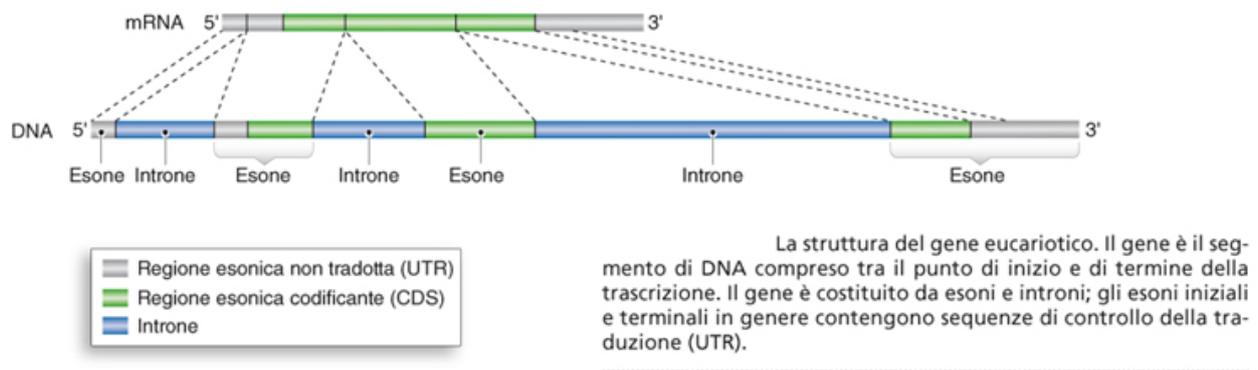


Lehninger pag 955

SSR = semplici sequenze ripetute (**DNA satellite**),
meno di 10pb = centromero e telomero

Gene

- E' una regione di DNA che controlla le caratteristiche ereditarie;
- porta l'informazione biologica per un determinato carattere: è in grado di codificare, i tre tipi di RNA



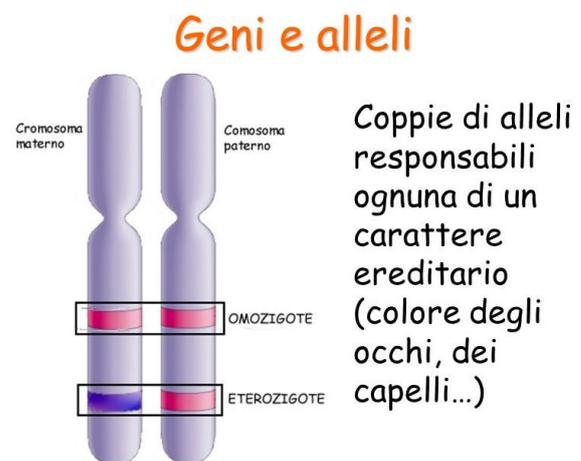
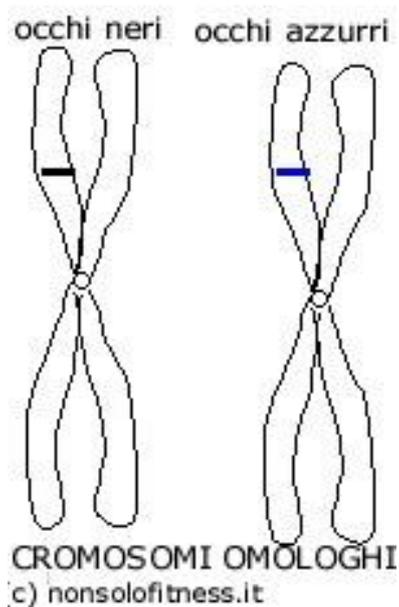
Geni interrotti: esoni ed introni

- I geni si trovano sui cromosomi, il cromosoma quindi è costituito da una sequenza di geni = **genoma**:

un gene occupa un suo preciso locus

Il gene può presentarsi in più forme diverse (varianti di un gene): "alleli".

- Individuo omozigote
- Individuo eterozigote



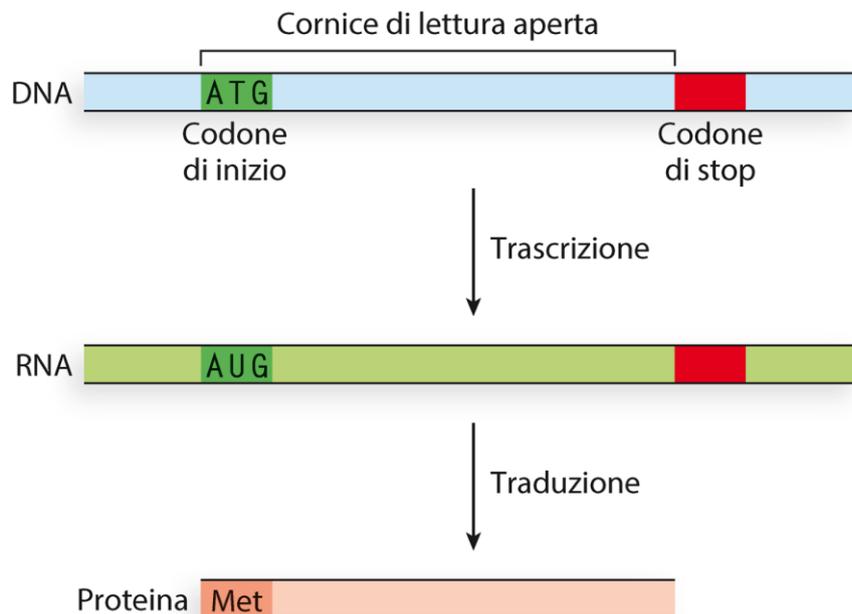
- **GENE COSTITUTIVO** (housekeeping)
- **GENE REGOLATO** - inducibile o reprimibile

GENI STRUTTURALI

GENI RIBOSOMIALI

GENI TRANSFER

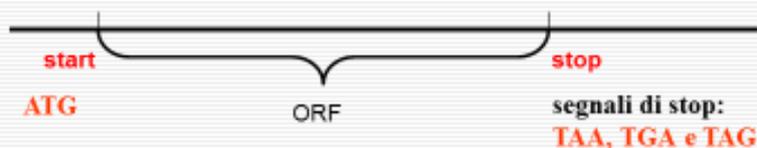
La maggior parte dei geni è identificata dall'Open Reading Frame (ORF)



Segnali di inizio e di stop nella cornice di lettura aperta di un gene

Gene Finding: ORF (Open Reading Frame)

Un ORF o schema di lettura aperto è una zona compresa tra 2 segnali, uno di start e uno di stop presenti nello stesso frame. All'interno dell'ORF non sono presenti ulteriori segnali di Stop.



Un ORF è una potenziale regione codificante per proteine.

DNA DEGLI EUCARIOTI

A) SEQUENZE UNICHE : Segmenti unici o ripetuti poche volte

Geni strutturali: geni che codificano per catene polipeptidiche

Una cellula eucariotica è in grado di sintetizzare da 10.000 a 30.000 proteine diverse. Il DNA di questi geni, normalmente, è presente in **copia unica** nel genoma aploide di una cellula, ove costituisce la *frazione di DNA a copia singola*.

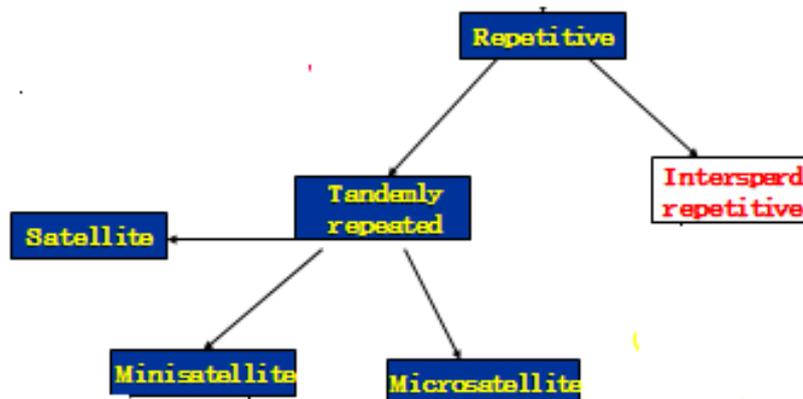
Es: un solo gene per la **fibroina della seta** nel baco

-i **reticolociti** contengono da una a poche coppie dei geni che codificano per le subunità dell'emoglobina

- grandi quantità di **ovoalbumina**, la proteina principale del bianco d'uovo

B) SEQUENZE RIPETUTE

con ripetizioni in tandem o singole



- **sequenze intersperse:** I *trasposoni*, sono sequenze ripetute che costituiscono oltre il 40% del genoma umano

LINE (elementi nucleari lunghi interspersi) e **SINE** (elementi nucleari corti interspersi) occupano una frazione significativa nel DNA genomico, **sono esempi di elementi trasponibili** cioè capaci di muoversi in punti diversi del genoma

L'integrazione può portare a :

1. **mutazioni**: trasposizione associata ad alcuni casi di emofilia, distrofia muscolare e cancro del colon
2. **trasposizione benefica**:
 - contribuire in modo positivo all'evoluzione della specie
 - aiutano a regolare l'espressione dei geni adiacenti

TANDEM = blocchi costituiti da moduli di sequenze ripetute tante volte

ATTCTGATTCTGATTCTGATTCTG

è una ripetizione in tandem di ATTCTG (ripetuta quattro volte).

- Sequenze di DNA con funzioni codificanti:
RNA ribosomiale, RNA transfer, istoni
- Sequenze di DNA che mancano di funzione codificante:
- DNA satellite costituito da 5 a qualche centinaia di basi, che viene ripetuto centinaia di volte.
Abbondante nell'eterocromatina costitutiva, fra cui il centromero

DNA mini-satellite da 10 a 100 coppie di basi, ripetuto migliaia di volte.

Presenti nei telomeri dei cromosomi

Altamente polimorfici in quanto il n. di ripetizioni è molto variabile nella popolazione (VNTR=n. variabile ripetizioni in tandem), quindi marcatori genetici.

Test di paternità

- **DNA micro satellite** da 1 a 5 coppie di basi, duplicati fino a 150 copie, distribuiti in modo omogeneo nel genoma.

La ripetizione più frequente è CA usata nelle tipizzazioni individuali, come il test del DNA o quello di paternità, per il n variabile di ripetizioni tra un individuo ed un altro

Concetto di variabilità'/ polimorfismo:

POLIMORFISMO

I polimorfismi genetici sono **variazioni** nelle sequenze di DNA presenti in una popolazione con una **frequenza maggiore dell'1%**. Quando la **frequenza** è **inferiore** a tale valore arbitrario, si preferisce parlare di **varianti genetiche rare**, che in molti loci sono presenti in aggiunta ai polimorfismi.

MINI/MICRO-SATELLITI

I loci dei mini/micro satelliti sono altamente polimorfi con un gran numero di alleli

Mostrano un alto grado di polimorfismo nella popolazione umana per il **numero di ripetizioni = alta eterozigotità** Queste variazioni forniscono una serie di marcatori genetici di tipo molecolare, utilizzabili per identificare individui diversi

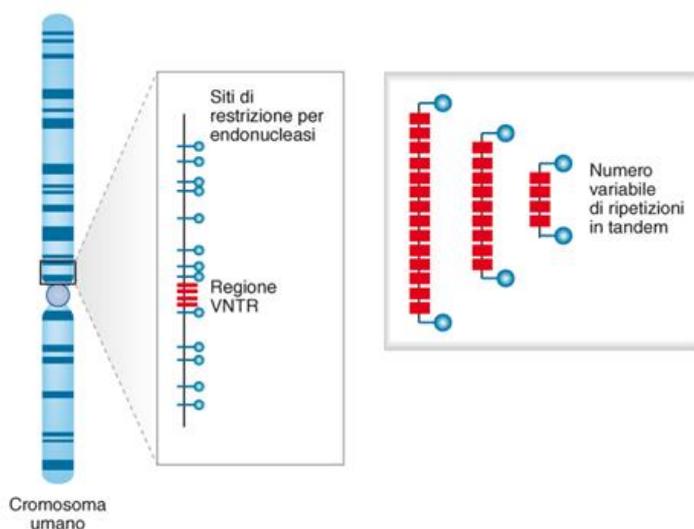
Esempio: un minisatellite è formato da una unità ripetitiva lunga 44pb e nella popolazione ha la seguente distribuzione:

7% = 18 ripetizioni

11% = 16 ripetizioni

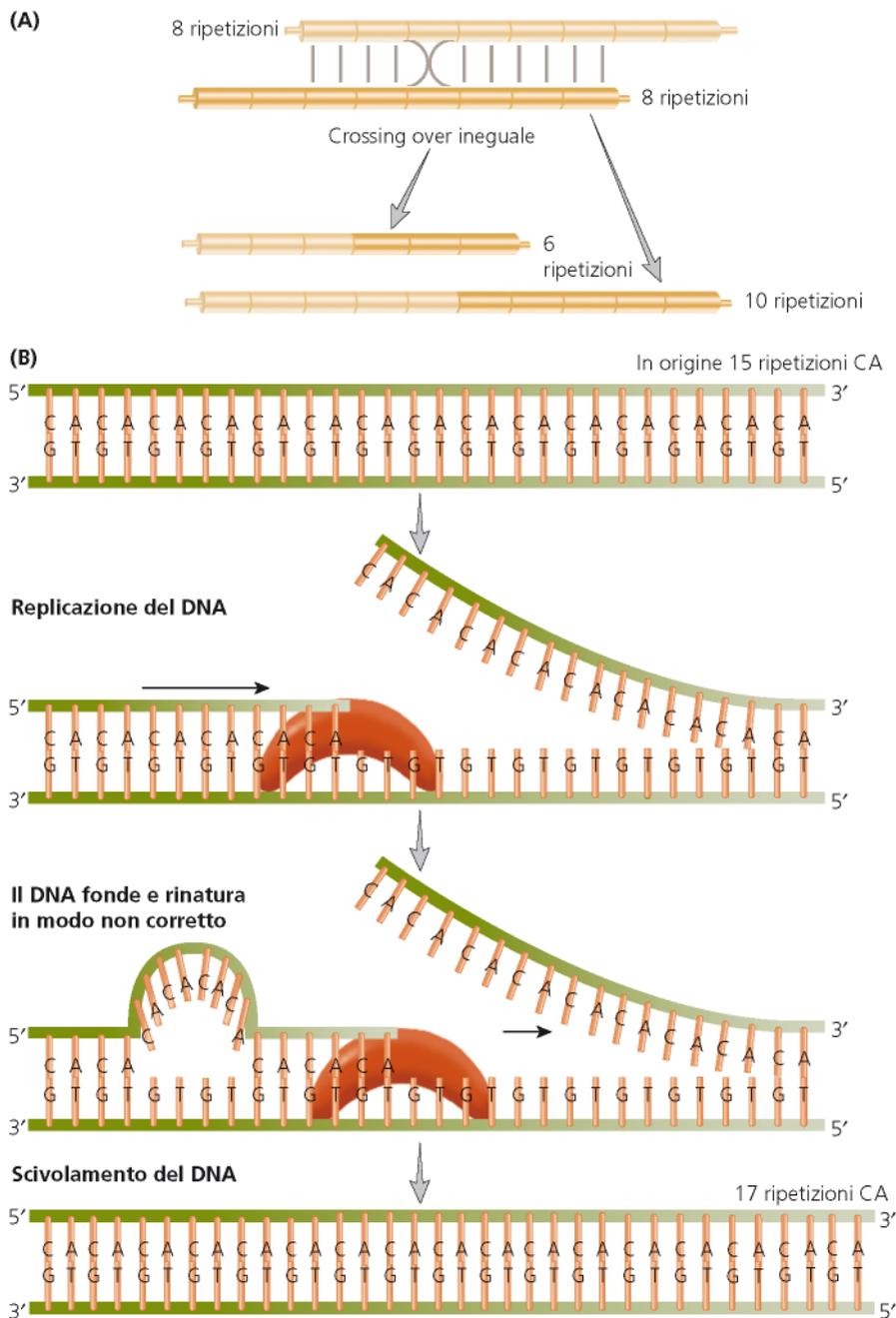
43% = 14 ripetizioni

36% = 13 ripetizioni



Le regioni VNTR sono polimorfiche del genoma. In particolare, lo è il numero di ripetizioni in tandem della sequenza che varia all'interno della popolazione.

***l'origine di questa variabilità è la ricombinazione genetica
tra unità ripetitive mal appaiate***



Difficoltà nel replicare in modo appropriato queste ripetizioni, si hanno quindi fenomeni di scivolamento che causano allungamento o riduzioni del n. ripetizioni = Sito del cromosoma polimorfico

I MINI-SATELLITI SONO UTILI PER LA MAPPATURA GENICA data l'alta probabilità che vi sia un'ampia variazione individuale.;

VENGONO USATI COME MARCATORI dell'individualità genetica nel TEST del DNA, determinazione della parentela

I Polimorfismi dei singoli nucleotidi (SNP) sono costituiti da sostituzioni di un singolo nucleotide e rappresentano la più grande fonte di variabilità inter-individuale nel genoma. Recentemente sono divenuti oggetto di grande attenzione da parte dei ricercatori che hanno via via evidenziato la presenza di alcune di **queste piccole variazioni geniche** determini la suscettibilità o la resistenza a molte delle malattie umane più comuni (ad esempio il diabete, il cancro, l'Alzheimer) e sia associata alla resistenza e alla sensibilità individuale ai farmaci.