Genetica molecolare

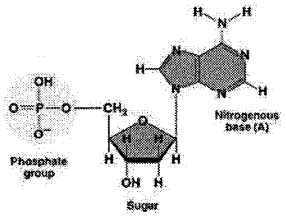
Il DNA genomico

Nel nucleo di ogni cellula di un individuo è presente lo stesso DNA Genomico.
Il numero di cellule che costituiscono un organismo animale è stimato su 1000 miliardi.

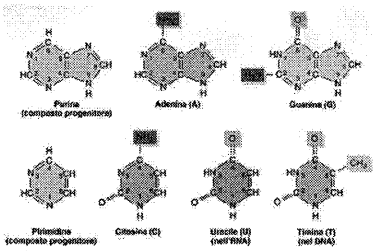
Il genoma definisce lo sviluppo di ogni individuo fin dalle più precoci fasi embrionali, ne codifica la morfologia ed i tempi del suo differenziarsi.
Il genoma contiene l'informazione che serve affinché una singola cellula, lo Zigote (l'oocita fecondato da uno spermatozoo), diventi una Bovina in lattazione o un Suino da prosciutto, un Cane o un Uomo.

Il DNA Genomico di un mammifero è costituito da circa 3 miliardi di paia di basi. La lunghezza di un assetto cromosomico 2n in forma despiralizzata è di circa 2 metri.
Nel nucleo di una cellula umana, e similmente in quello di una cellula animale, il DNA Genomico pesa in media 1 nanogrammo.
Dei 3,2 miliardi di pb del genoma umano aploide, circa l'1,2% (circa 21000 geni) è fatto da regioni codificanti proteine.

Proprietà del DNA:

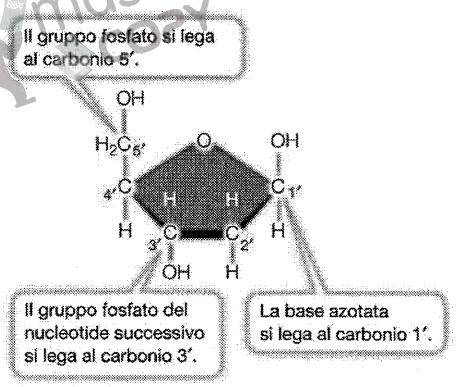


Il DNA è un polimero di nucleotidi. Ogni nucleotide consiste di una molecola dello zucchero desossiribosio, un gruppo fosfato e una base azotata.



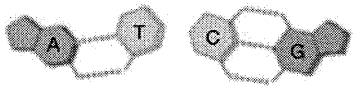
L'unica differenza tra i quattro nucleotidi del DNA è rappresentata dalle basi azotate: le purine adenina (A) e guanina (G), e le pirimidine citosina (C) e timina (T).

La natura antiparallela delle 2 catene polinucleotidiche è una caratteristica chiave della doppia elica. La nomenclatura deriva dal sistema di numerazione degli atomi di carbonio dell'anello dello zucchero. Una catena dell'elica è orientata 5'→3', e l'altra in direzione opposta (3' → 5'). Per convenzione, le sequenze di DNA sono scritte in orientamento 5'→3'. Questo significa che un DNA a singolo filamento inizia con un gruppo fosfato libero legato al carbonio 5' dello zucchero. I successivi nucleotidi sono aggiunti al filamento mediante legami fosfodiesterici, che uniscono il gruppo ossidrilico al carbonio 3' di uno zucchero con il fosfato legato al carbonio 5' di uno zucchero adiacente. Il filamento termina con il gruppo ossidrilico libero al carbonio 3' dell'ultimo zucchero.

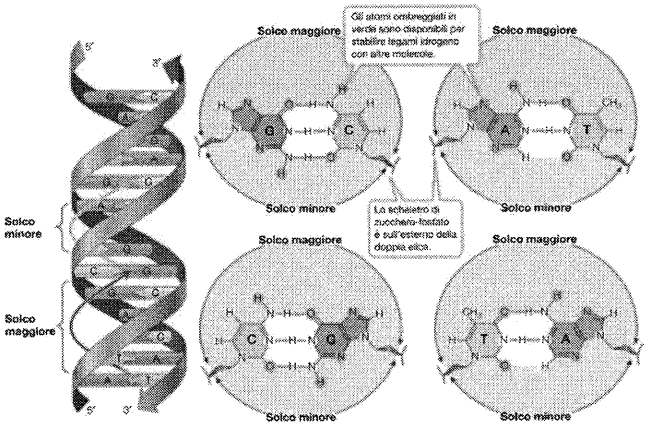


Le due catene sono tenute insieme da due tipi di forze chimiche:

1. LEGAMI IDROGENO tra le basi appaiate in maniera specifica. L'adenina si appaia con la timina per mezzo di due legami idrogeno, e la guanina si appaia con la citosina formando invece tre legami a idrogeno.
2. FORZE DI VAN DER WAALS tra le basi adiacenti sullo stesso filamento.



Si formano solchi minori e solchi maggiori dove entrano le proteine. Questi solchi esistono perché gli scheletri dei due filamenti in un lato della doppia elica sono più vicini tra loro che nell'altro. Il legame di proteine a sequenze specifiche di coppie di basi è la chiave delle interazioni DNA-proteine, necessarie per la replicazione e per l'espressione dell'informazione genetica nel DNA.



Ricapitolando:

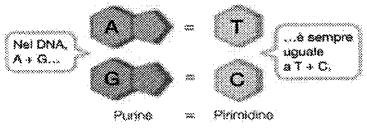
- La molecola di DNA e una doppia elica destrorsa dal diametro di 2nm;
- Le due catene sono antiparallele;
- Gli scheletri di zucchero-fosfato si trovano all'esterno e le basi all'interno;
- Le basi sono unite da legami a idrogeno;
- Si formano solchi maggiori e solchi minori dove entrano le proteine;
- Il DNA si può denaturare e rinaturare;

Composizione della molecola di DNA:

La composizione in basi del DNA è differente nelle diverse specie.
L'ordine preciso delle coppie (A) (T) e (C) (G) può essere un carattere specie dipendente che non altera la struttura a doppia elica del DNA.

Con questo modello è possibile qualsiasi sequenza di coppie di basi per tutta la lunghezza della doppia elica. Il numero di differenti sequenze possibili in una molecola di DNA è virtualmente infinito ed è in grado di poter codificare un'enorme quantità di informazioni. In questo modello è già implicato un possibile meccanismo di replicazione della molecola di DNA in modo da produrre due molecole figlie identiche.

Chargaff evidenziò una caratteristica costante in tutti i genomi: la quantità molare di A è sempre uguale alla quantità molare di T e quella di C è sempre uguale a quella di G.



REGOLA DI CHARGAFF: nei genomi esiste un'uguale quantità di purine e di pirimidine, l'unico rapporto che cambia è il rapporto molare (A+T)/(C+G).

Sequenze del DNA:

Gran parte del genoma degli eucarioti è costituito da sequenze che non sembrano avere alcuna funzione e che sono per lo più sequenze ripetute. Il DNA può essere distinto in tre gruppi in base al grado di ripetitività:

1. DNA A SEQUENZA UNICA: nei mammiferi rappresenta il 50-60% e comprende la maggior parte dei geni strutturali, ma anche sequenze non codificanti come gli spaziatori e gli introni. È presente in una o poche copie.
2. DNA MEDIAMENTE RIPETUTO (A SEQUENZE SPARSE): è costituito da sequenze ripetute da varie decine fino ad alcune migliaia di volte. Questa frazione rappresenta nei mammiferi il 25-50% e comprende sequenze funzionali, come le famiglie di geni ripetuti, geni regolatori e sequenze specificanti siti funzionali, ma è soprattutto costituita da sequenze non funzionali. Tra queste si trovano gli pseudogeni non maturati e gli elementi nobili che sono i trasposoni, i retroposoni virali e non virali (SINE, 100-500 pb; LINE, diverse migliaia di pb; pseudogeni).
3. DNA ALTAMENTE RIPETUTO (SEQUENZE A TANDEM): è costituito da sequenze in genere corte che si ripetono anche vari milioni di volte e che nei mammiferi rappresentano il 10-15% del genoma. Esistono vari tipi di DNA altamente ripetuto:
    - Il DNA satellite costituito da milioni di copie quasi uguali disposte in tandem a costituire un cluster che si localizza in regioni specifiche sul cromosoma, quali il telomero e il centromero.
    - Il DNA minisatellite costituito da sequenze lunghe da dieci a cento coppie di basi.
    - Il DNA microsatellite costituito da unità solitamente lunghe da due a quattro coppie di basi.

Cromatina:

Negli eucarioti il DNA è sempre legato a proteine istoniche e non istoniche a costituire una struttura che in intercinesi è chiamata CROMATINA. La cromatina non è un'entità indistinta, ma è costituita da una serie di filamenti di DNA e proteine, detti cromosomi, il cui numero è costante e caratteristico per ogni specie, che si rendono evidenti durante la divisione, quando sono nettamente separati fra loro.

PROTEINE ISTONICHE:
Sono le più abbondanti associate ai cromosomi. Sono piccole proteine basiche, con una carica netta positiva che facilita il loro legame al DNA carico (-)

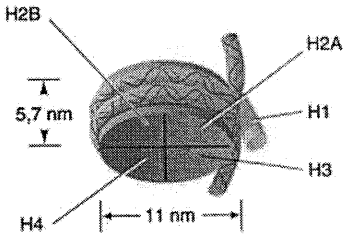
Le varie classi di istoni si indicano con la sigla H seguita da un numero che, a propria volta, può essere seguito da una lettera. Gli istoni più comuni sono distinti in:

- istoni del core nucleosomico (H2A, H2B, H3, H4) che sono in quantità equimolare nella cromatina e in unione con il DNA formano il filamento nucleosomico
- istoni linker (H1) che non si trovano del filamento nucleosomico, ma nelle strutture cromatiniche di ordine superiore.

Stechiometricamente, nella cromatina, vi è circa un'uguale quantità di istoni e di DNA.
Le quantità e proporzioni degli istoni rispetto al DNA sono costanti in tutte le cellule di tutti gli organismi eucarioti.

Gli Istoni svolgono un ruolo cruciale nell'"Impacchettamento" della cromatina. Diversi livelli di "Impacchettamento" rendono i cromosomi capaci di adattarsi dentro il nucleo di pochi micron di diametro:

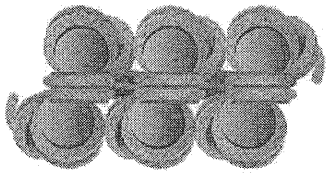
Il primo livello di "Impacchettamento" implica l'avvolgimento attorno ad un nucleo di istoni con la formazione di una struttura definita NUCLEOSOMA. Un corto segmento di DNA è avvolto attorno a 2 molecole per ciascuno dei 4 istoni H2A, H2B, H3, H4. L' H1, è una sola molecola e si ipotizza che svolga un'attività di linker. Il DNA si avvolge attorno al nucleo Istonico compiendo 1 giro e 3/4, il che comporta un compattamento di DNA di circa un fattore 7.



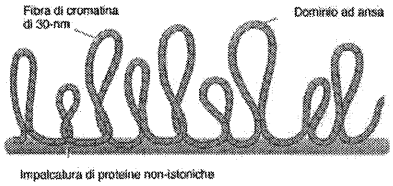
I nucleosomi uniti insieme dal DNA linker e dall'istone H1 producono la forma estesa di cromatina "a collana di perle". Questa struttura a rosario rappresenta l'unità di base della cromatina.

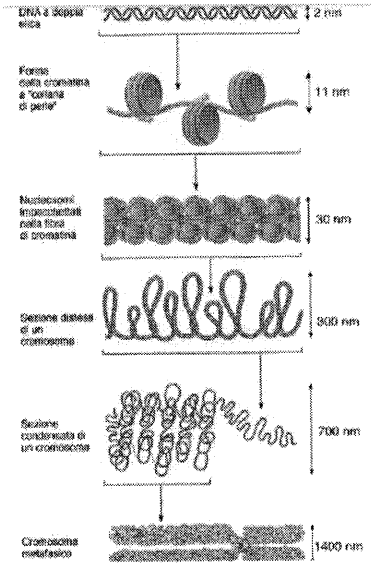


I nucleosomi possono associarsi tra di loro a formare una struttura più compatta, che ha un diametro di 30nm. L'avvolgimento del nucleo filamento di 10nm, determina la costituzione della fibra di 30nm, e condensa il DNA ad 1/6 della dimensione precedente.



Il livello successivo di avvolgimento implica la formazione di domini ad ansa.
I domini ad ansa, si estendono formando un angolo con l'asse principale del cromosoma, e sono ancorati ad un'intelaiatura strutturale filamentosa all'interno della membrana nucleare chiamata matrice nucleare.





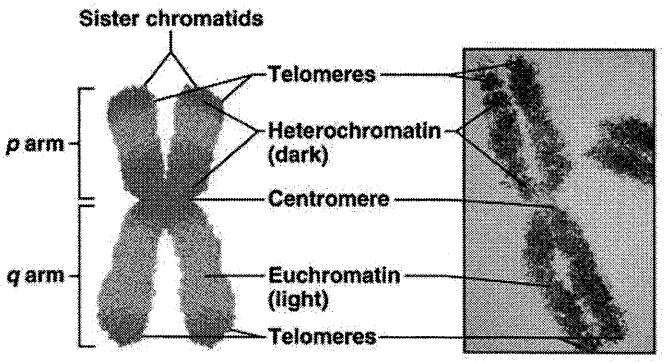
Il grado di impacchettamento del DNA si modifica durante il ciclo cellulare.
In metafase mitotica e meiotica (M) la cromatina raggiunge il più elevato grado di condensazione.
Attraverso la fase (G1) dell'interfase, la cromatina si rilascia gradualmente ed alla fase (S) si trova nella condizione di maggiore dispersione.
In (G2), ricomincia la condensazione della cromatina, che arriverà al grado massimo di compattamento nella metafase.

Se dal Cromosoma metafasico vengono rimossi gli Istoni:

1. Il Cromosoma conserva ancora la sua forma generale
2. Anse di DNA sporgono e si estendono da un'impalcatura proteica

Sulla base della colorabilità dei cromosomi, sono state definite 2 forme di cromatina:

1. EUCROMATINA: rappresenta i cromosomi o le regioni cromosomiche che manifestano un'alternanza normale di condensazione e decondensazione durante il ciclo cellulare.
   La maggior parte del Genoma di una cellula attiva è fatta da eucromatina.
   Visivamente subisce un cambiamento dell'intensità della colorazione, dal più scuro in metafase al più chiaro in fase S.
   L'eucromatina è tipicamente trascritta attivamente, ciò significa che i geni in essa contenuti possono essere espressi. Le regioni eucromatiche sono tipicamente prive di sequenze ripetute.



2. ETEROCROMATINA: rappresenta i cromosomi o le regioni cromosomiche che generalmente rimangono condensate, attraverso tutto il ciclo cellulare anche in interfase.
   Assume una colorazione più intensa rispetto all'eucromatina.
   Il Dna che si trova sotto questa forma replica in ritardo, nella fase S, rispetto al resto del DNA.
   Generalmente al suo interno i geni sono trascrizionalmente inattivi.
   Esistono due tipi di eterocromatina:
   - Eterocromatina costitutiva: è presente nella stessa posizione su entrambi i cromosomi omologhi di ogni coppia ed in tutte le cellule. Consiste essenzialmente di DNA Ripetuto. Ne sono un esempio le regioni centromeriche.
   - Eterocromatina facoltativa: rappresenta regioni del genoma che sono state specificatamente inattivate in determinate cellule o in precisi momenti della vita della cellula, ma non presentano alcuna differenza sostanziale nelle sequenze di DNA rispetto all'eucromatina. Differisce da tessuto a tessuto, nei diversi stadi dello sviluppo e a volte da un cromosoma omologo all'altro, ed è l'espressione dell'inattivazione specifica di determinati geni che è alla base del differenziamento.
     Un particolare esempio di eterocromatina facoltativa è il corpo di Barr, che si trova nelle cellule somatiche delle femmine dei mammiferi ed è uno dei due cromosomi X permanentemente inattivato.

PROTEINE NON ISTONICHE:

Le proteine non istoniche sono tutte le proteine associate al DNA eccetto gli istoni e possono essere distinte in cinque gruppi:

1) Proteine ad attività enzimatica: sono in grado di catalizzare le diverse funzioni del DNA nucleare, quali trascrizione, duplicazione, ricombinazione e riparazione.
2) Proteine che si associano all'RNA: sono una componente eterogenea che comprende proteine che si legano in modo transitorio all'RNA in via di formazione, proteine che formano complessi stabili con funzioni particolari e proteine che sono coinvolte nel trasporto degli RNA definitivi nel citoplasma.
3) Proteine coinvolte nella struttura della cromatina: controllano soprattutto la sua spiralizzazione e despiralizzazione.
4) Proteine che controllano il mantenimento strutturale dei cromosomi: regolano l'organizzazione strutturale e funzionale dei cromosomi dai batteri all'uomo.
5) Fattori di trascrizione: comprendono i fattori generali della trascrizione che interagiscono con l'RNA polimerasi dando inizio alla trascrizione e le proteine che regolano la trascrizione.

master COPY