

GENETICA, EPIGENETICA, NUTRIGENETICA, NUTRIGENOMICA



Giovanni Chetta

Agosto 2021

Indice

Premessa	4
Genetica	5
Acidi nucleici.....	5
Introduzione	5
Genoma – Cromatina - Cromosomi.....	9
Meiosi e Mitosi.....	14
Indice RF e Mappe genetiche	17
Genomica	20
Leggi di Mendel	20
Dark Matter e paradossi della genomica	23
Eucromatina - Eterocromatina	23
Replicazione (duplicazione) del DNA.....	24
Sintesi del DNA (del nuovo filamento)	25
RNA.....	31
Trascrizione del DNA	35
Proteine.....	38
Traduzione.....	42
Variabilità genetica: Mutazioni	48
Introduzione	48
Mutazioni cromosomiche.....	50
Mutazioni geniche.....	57
Mutazioni puntiformi	59
Elementi trasponibili o trasposomi	61
Mutazioni di splicing del mRNA.....	64
Mutazioni condizionali	65
Mutazioni per reversione e soppressione.....	65
Mutazioni Indotte e agenti mutageni	66
Interferenti Endocrini (IE).....	69
Sistemi di riparazione del DNA.....	71
Introduzione	71
Tipi di danno e riparazione.....	72
PARP1	76
Sistema di riparo SOS	77
Checkpoint del ciclo cellulare.....	78
Variabilità genetica: Polimorfismi genetici	78

Deacrizione.....	78
Marcatori genetici.....	79
RFLP.....	80
STR (STRP) e VNTR.....	80
SNPs.....	82
Frequenza dei polimorfismi genetici e Medicina Predittiva.....	84
Studi associazione e analisi genetica.....	84
Tecniche di analisi biomolecolari.....	86
Introduzione.....	86
PCR.....	87
Elettroforesi su gel di Agarosio.....	88
Sequenziamento (DNA Sequencing).....	89
Microarrays.....	90
Epigenetica, Nutrigenetica e -omica.....	92
Epigenetica.....	92
Descrizione.....	92
Meccanismi Epigenetici.....	95
Nutrigenetica e Nutrigenomica.....	100
Introduzione.....	100
Descrizione.....	100
Effetti della dieta sui principali processi epigenetici.....	102
Nutraceutici.....	103
Obiettivi.....	104
Dieta ad personam (dieta personalizzata).....	105
Microbiota e Microbioma.....	107
Descrizione.....	107
Funzioni del Microbiota.....	112
Ricerca.....	117
Conclusione.....	121
Bibliografia.....	122

Premessa

L'intento di questo lavoro è approfondire l'importanza e le possibilità di applicazione integrata dell'epigenetica nell'ambito di una terapia multidisciplinare che considera il “network” costituito dai principali sistemi di regolazione dell'organismo umano. Alla luce delle recenti scoperte sulla matrice extracellulare (MEC) e il sistema connettivo, può risultare importante considerare l'effetto integrato di tecniche e terapie in grado di incidere profondamente sia su essi sia sui nostri acidi nucleici. In particolare vengono considerati gli effetti a riguardo di esercizio fisico, terapia manuale, elettroterapia e fitoterapia. Tenendo conto che tutto ciò non rappresenta certamente un punto di arrivo ma semmai di partenza verso una scienza i cui confini, forse infiniti, connettono il micro al macrocosmo, grazie a molteplici funzioni capaci di strutturare “una vorticoso rete globale di tensegrità”.

Genetica

Acidi nucleici

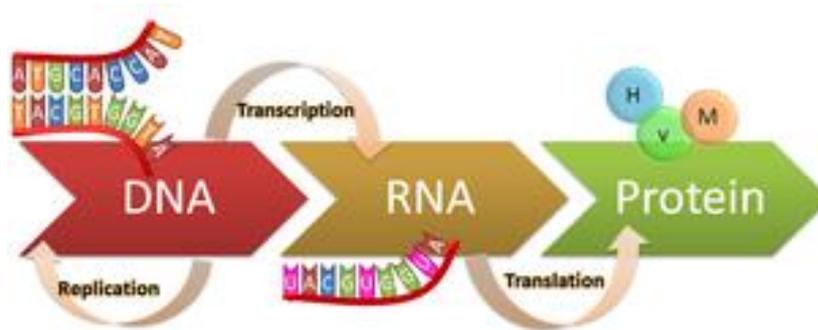
Introduzione

Gli acidi nucleici, *DNA* e *RNA*, rappresentano bio-macromolecole di importanza vitale, basti pensare al loro ruolo fondamentale nella sintesi di tutte le proteine. Il loro studio risulta fondamentale per interpretare su basi molecolari i fenomeni della vita. Piccole differenze negli acidi nucleici determinano differenze enormi tra gli organismi.

I *nucleosidi trifosfato NTP (ATP - GTP - CTP - UTP)* sono esempi di nucleotidi che contengono una base azotata legata a uno zucchero a cinque atomi di carbonio (ribosio o desossiribosio) con tre gruppi fosfato legati allo zucchero. Sono i precursori molecolari sia del DNA sia del RNA oltre a fungere come fonte di energia per le reazioni cellulari e a essere coinvolti nelle vie di segnalazione.

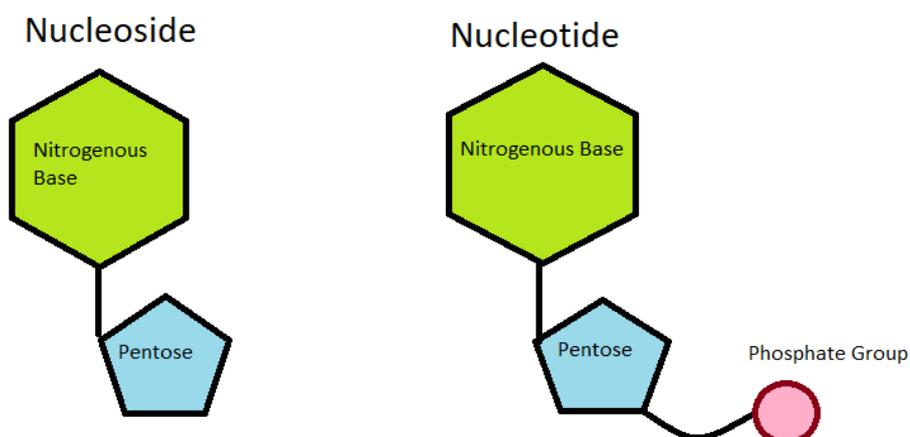
Il DNA (acido desossiribonucleico o deossiribonucleico) costituisce il materiale genetico delle cellule ed è presente nel nucleo delle cellule eucariotiche e nel citoplasma delle procariotiche. L'RNA (acido ribonucleico), presente nel citoplasma e nucleo di cellule eucariote e nel citoplasma delle procariote, svolge una primaria funzione all'interno del complesso processo che porta all'unione degli amminoacidi nella formazione dei polipeptidi.

L'informazione genetica viene sostanzialmente espressa in due stadi: la *trascrizione* dal DNA al RNA e la successiva *traduzione* per la sintesi delle proteine. Il DNA è il depositario dell'informazione genetica delle cellule mentre l'RNA viene impiegato principalmente nella trascrizione e nella traduzione di questa informazione che infine si esprime nella sintesi delle proteine.



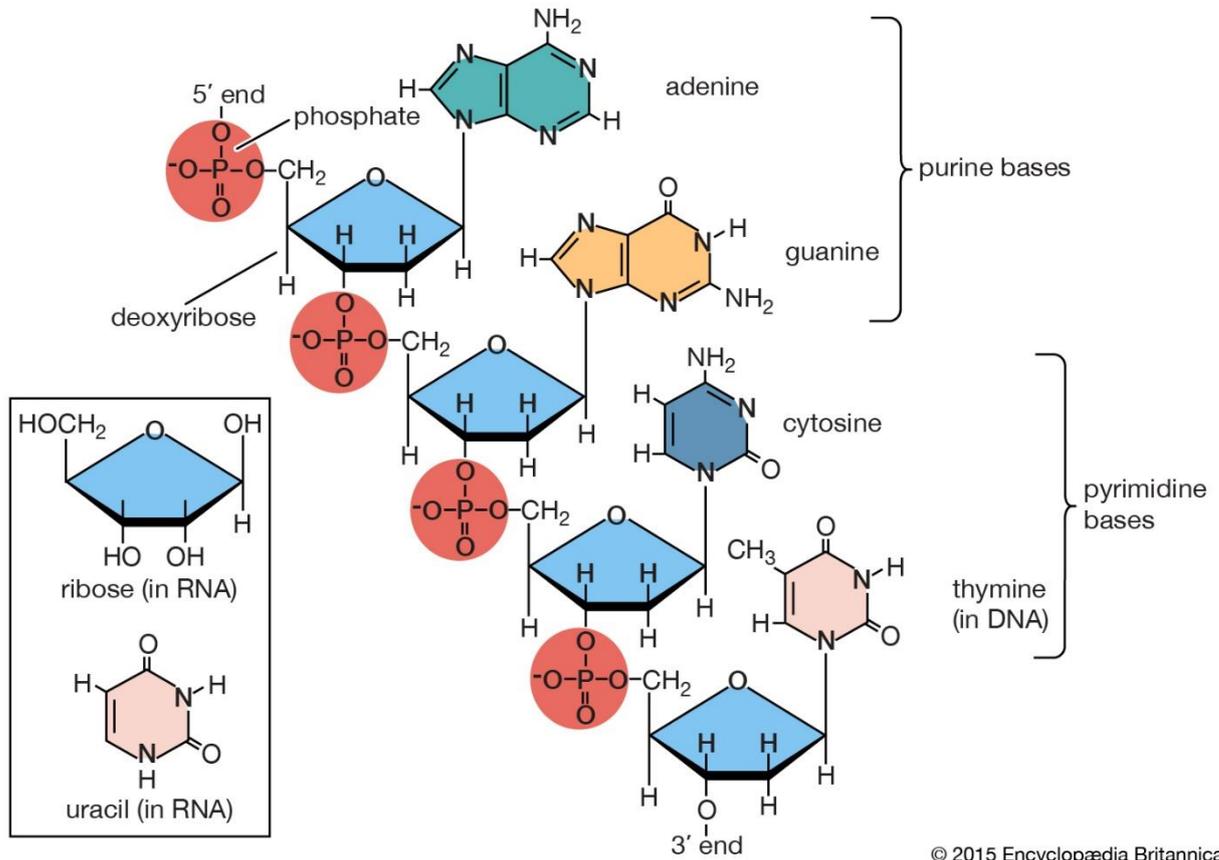
Nel nucleotide il C-1 del pentoso si lega al N-1 della base pirimidinica o al N-9 della purina; mentre l'acido fosforico si esterifica sul C-5 dello zucchero e, nella catena dell'acido nucleico, forma un ponte col C-3 del pentoso di un altro nucleotide (legame fosfodiesterico tra il gruppo ossidrilico libero in 3' e il gruppo fosfato in 5'); si viene così a formare un lungo scheletro (filamento) o un reticolo. La sintesi di questo particolare legame viene catalizzata da specifici enzimi presenti nel nucleo (rispettivamente DNA-polimerasi e RNA polimerasi) coinvolti in una serie complessa di reazioni determinanti per la replicazione stessa della vita.

Una blanda degradazione degli acidi nucleici porta a una miscela di monomeri acidi, noti come *nucleotidi* (ribonucleotidi per l'RNA). Ciascun nucleotide è composto da una base purinica o pirimidinica, una unità di pentoso e da uno a tre gruppi fosfato. Una successiva cauta idrolisi rimuove selettivamente il fosfato ottenendo una molecola, definita nucleoside, costituita da una base pirimidinica o purinica legata a un'unità di pentoso. Per l'idrolisi di entrambi i tipi di acidi nucleici si ottiene infatti: acido fosforico, uno zucchero pentoso e una miscela di basi puriniche e pirimidiniche.



Lo zucchero del DNA è il desossiribosio mentre quello dell'RNA è il ribosio

Le basi azotate principali del DNA sono le purine adenina e guanina e le pirimidine citosina e timina, mentre dell'RNA sono adenina, guanina, citosina e un'altra base pirimidinica, l' uracile. Le purine derivano appunto dalla purina e sono formate da due anelli eterociclici contenenti azoto, le pirimidine dalla piridina in cui l'anello azotato è unico



Un *codone (codon)* di DNA o RNA è la specifica tripletta nucleotidica che corrisponde a un singolo amminoacido.

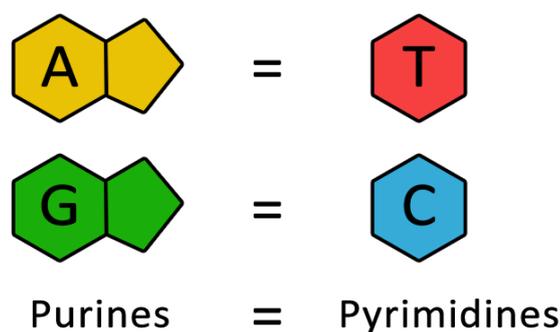
Un *gene* è una sequenza nucleotidica di DNA che codifica la sequenza primaria di un prodotto genico finale, che può essere un polipeptide, un RNA strutturale & proteina strutturali) o catalitico (enzima).

Nelle cellule il filamento di DNA è associata ad una seconda catena polinucleotidica (filamento complementare) tramite legami a idrogeno che si generano tra le basi azotate e complementari (ogni base azotata può legare solo un'altra specifica base a mò di stampo) che possono facilmente essere rotti per permettere l'apertura del doppio filamento e la trascrizione eseguita dall'enzima RNA-polimerasi.

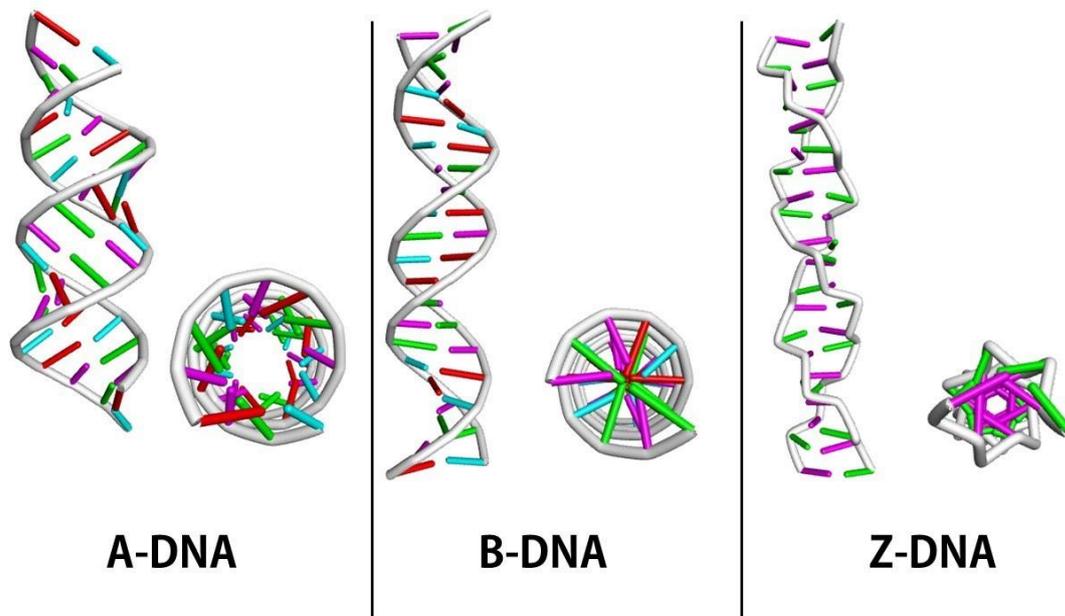
Questa struttura a “scala” (le basi azotate formano i gradini mentre gli assi longitudinali sono costituiti dagli zuccheri e fosfati) del DNA si avvolge su stessa a formare una doppia elica. Infatti, data la rigidità dei legami fosfodiesterici, per limitare la presenza di acqua intorno alle basi azotate idrofobe tale “scaletta” si avvolge su se stessa intorno all’asse centrale assumendo la tipica conformazione osservata per la prima volta da Watson e Crick nel 1954, che valse loro il premio Nobel per la medicina.

Regole di Chargaff

- 1) La composizione in basi del DNA varia da una specie all’altra.
- 2) La percentuale dei quattro tipi di nucleotidi è sempre la stessa nel DNA di cellule provenienti da tessuti diversi del medesimo individuo.
- 3) La composizione delle molecole di DNA non è influenzata da fattori esterni o dall’età dell’organismo.
- 4) In una molecola di DNA a doppio filamento vi è eguaglianza tra le coppie di basi tali che numero basi Alanina (A) risulta uguale a quello di basi Tiamina (T) e il numero basi Guanina (G) uguale quello di basi Citosina (C).
- 5) Tale uguaglianza si presenta all’incirca anche sullo stesso filamento della doppia elica di DNA (oggi sappiamo che, tale regola non risulta valida per il DNA di mitocondri e cloroplasti).



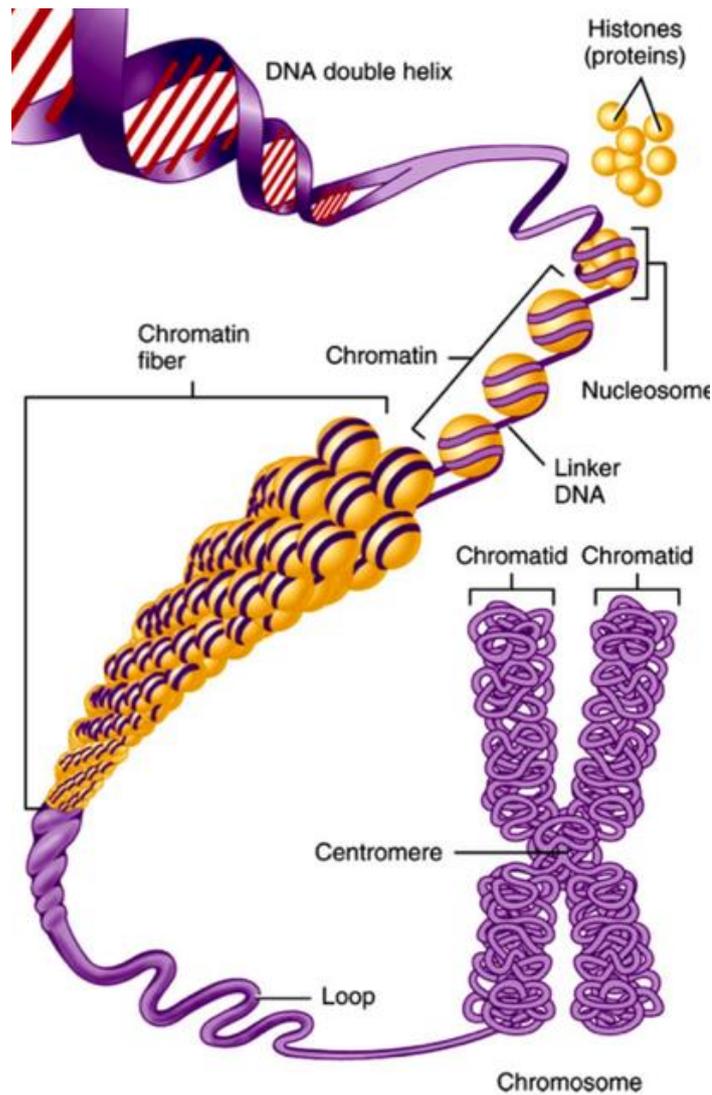
La doppia elica *del Dna* può assumere, in particolari condizioni ambientali o per specifiche sequenze di basi, varie forme strutturali alternative caratterizzate da specifici angoli torsionali e movimenti translazionali e rotazionali delle basi azotate, di cui le tipologie di elica più facilmente riscontrabili vengono denominate forma A, B e Z.



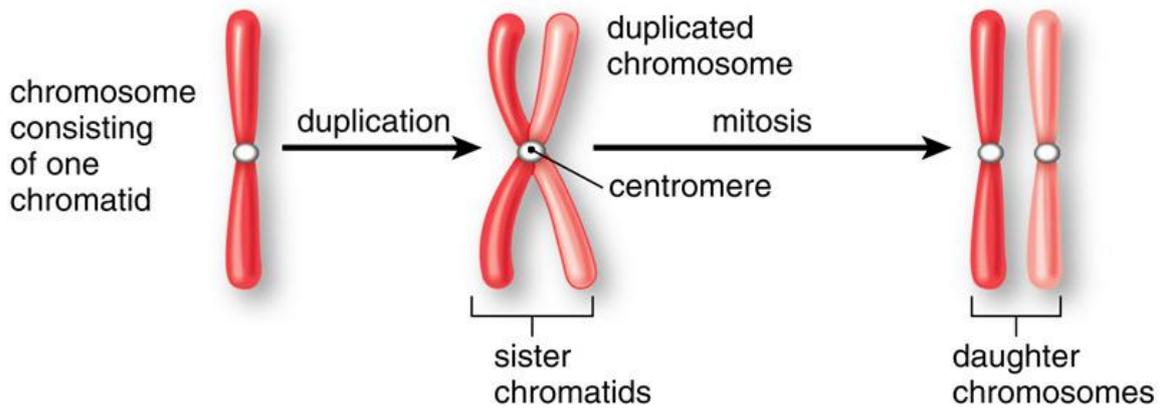
Genoma – Cromatina - Cromosomi

Con il termine *genoma* (o patrimonio genetico) si intende l'insieme delle sequenze nucleotidiche del DNA di un individuo. Il genoma umano risulta composto da 3,2 miliardi di coppie di nucleotidi: se il filamento di DNA di una singola cellula venisse disteso risulterebbe lungo ca. 1 metro. All'interno del nucleo cellulare le molecole di DNA (genoma cellulare) non si trovano pertanto in forma libera ma, nella cisterna perinucleare, associate a specifiche proteine basiche, definite istoni, costituendo la *cromatina*. A essa sono associati ulteriori proteine (basiche e acide), alcuni enzimi e molecole di RNA. Tra gli istoni e il DNA si vi è un'attrazione elettrostatica, in quanto le proteine istoniche sono cariche positivamente mentre il DNA presenta le cariche negative dei gruppi fosfato, che determina una struttura molto compatta in cui il DNA si ripiega su stesso avvolgendosi in diversi gradi attorno agli istoni. In questo modo inoltre la cromatina protegge il DNA da danni chimico-fisici e ne modula l'espressione genica.

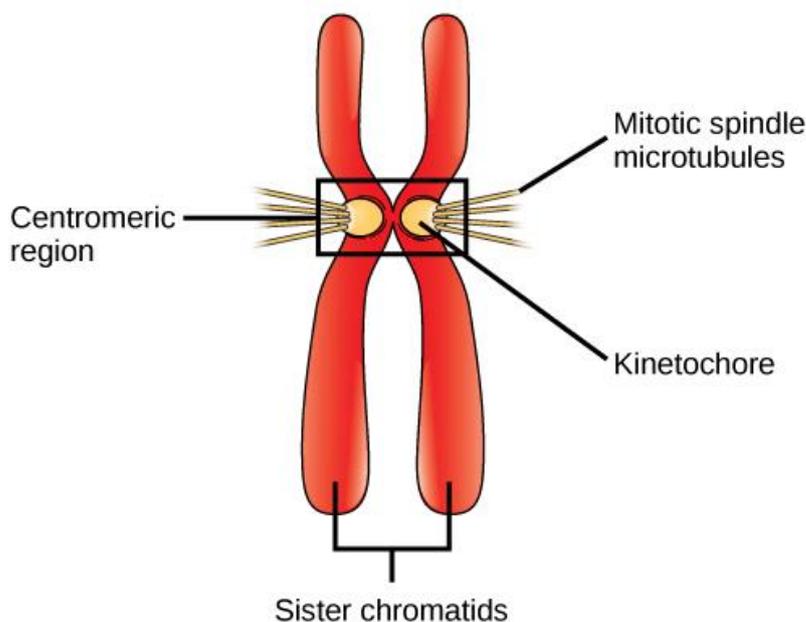
L'unità base della cromatina è il *nucleosoma*, formato da otto proteine istoniche sulle quali si avvolgono due giri di filamento di DNA della lunghezza di circa 165 nucleotidi (diametro complessivo 10 nanometri). Ne risulta una struttura detta "collana di perle" in cui i nucleosomi risultano le perle intervallate da un tratto libero di filamento definito DNA-linker. Un'altra proteina, l'istone H1, è in grado di avvicinare tra loro i nucleosomi formando una struttura ulteriormente compattata definita **solenoide**, in cui le fibre di DNA risultano ispessite (diametro 30 nm) e la fibra di cromatina condensata si avvolge ulteriormente su se stessa raggiungendo lo spessore di 700 nm.



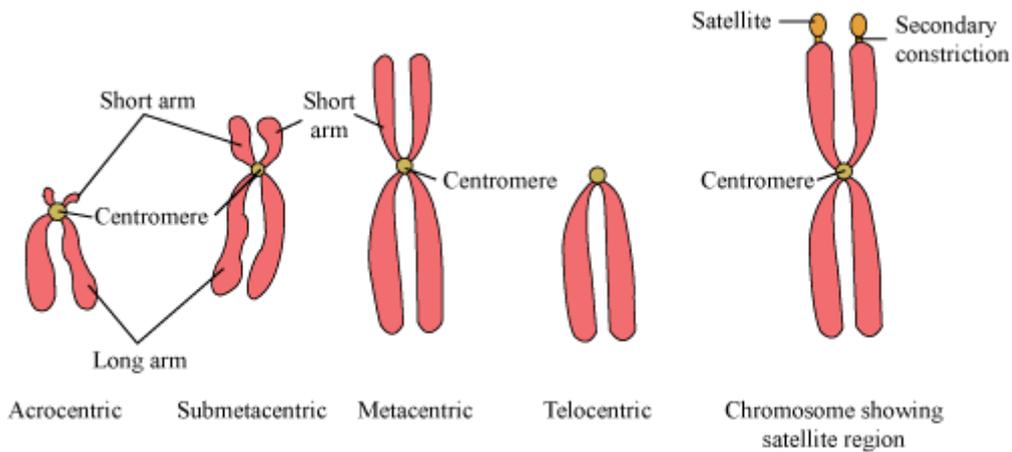
Lo stadio massimo del super-avvolgimento avviene nelle fasi di divisione cellulare in cui la cromatina si compatta nei *cromosomi*, con la tipica forma a X (composta dai due cromatidi uniti a livello del centromero) di pochi micron (cromosoma X) e visibile tramite colorazione basica al microscopio ottico. E' in tal modo infatti che si compatta ciascuna unità funzionale del DNA dopo essersi duplicata. il termine cromosoma può riferirsi per esteso anche al filamento di DNA non distinguibile nella cromatina.



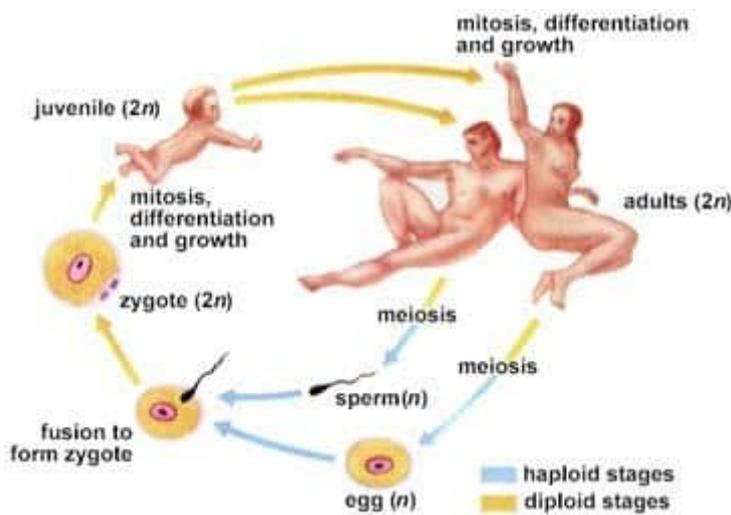
Il centromero o “costrizione primaria”, è il locus, a mò di strozzatura, indispensabile per la sua corretta segregazione cromosomica. Esso presenta un complesso proteico specializzato (cinetocore) a cui si agganciano le fibre del fuso mitotico che assicurano la corretta migrazione dei cromosomi durante mitosu e meiosi.



I cromosomi possono presentare diversa posizione e numero di centromeri (monocentrici, policentrici, olocentrici).

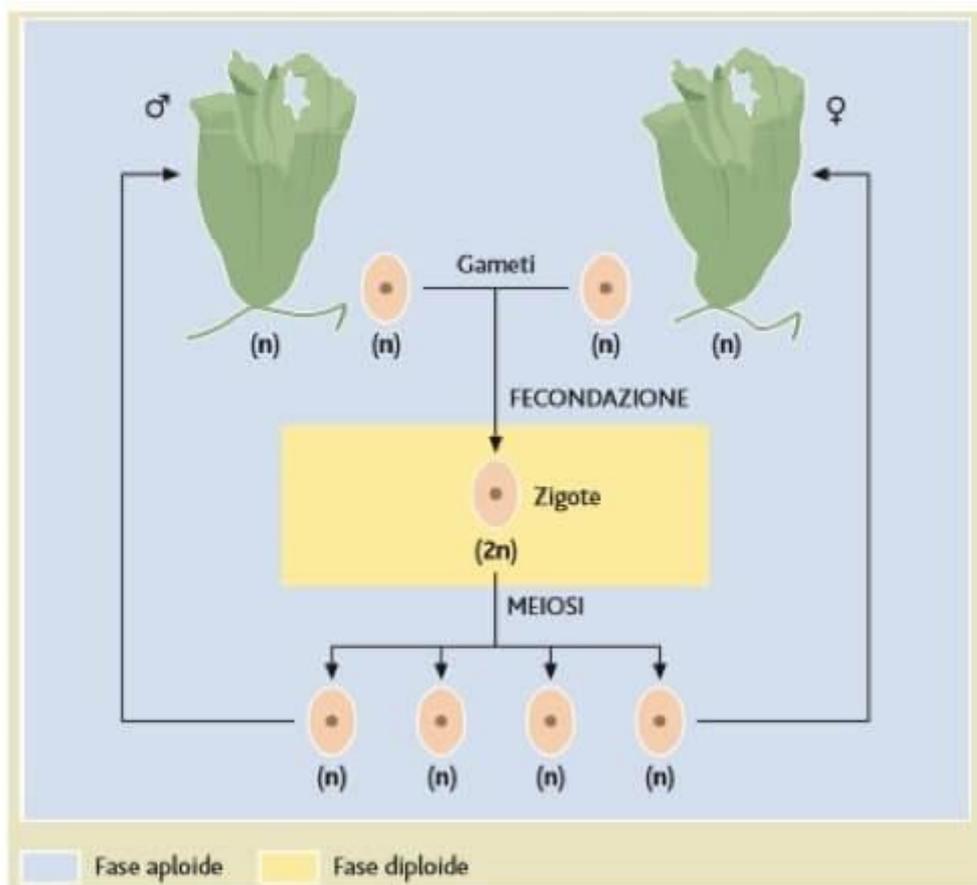


Types of chromosomes



L'insieme dei cromosomi presenti nella cellula rappresenta l'*assetto o corredo cromosomico* che è caratteristico per ogni specie e rimane costante nelle generazioni. Ploidia (grado di ploidia n) indica il coefficiente per cui viene moltiplicato il numero fondamentale dei cromosomi (23 nell'uomo):

Nella riproduzione sessuale, lo *zigote* definisce la cellula uovo fecondata risultante dall'unione e fusione del gamete maschile e femminile e possiede un corredo diploide derivante dalla fusione dei corredi cromosomici aploidi dei due gameti.



Le *cellule somatiche* (le cellule del corpo) degli animali sono diploidi ($2n$) ossia contengono 2 cromosomi per ogni tipo di essi, definiti *cromosomi omologhi*, mentre i gameti maturi (cellule destinate alla riproduzione) sono aploidi ($1n$) cioè presentano un solo cromosoma per ogni tipo definito *eterocromosomi* o *cromosoma sessuale X e Y*. La poliploidia è diffusa nel regno vegetale.

Gli individui di una specie hanno *cariotipo* simile cioè lo stesso insieme morfologico di cromosomi (numero e morfologia) osservabile al microscopio ottico. L'analisi del cariotipo permette di costruire una rappresentazione grafica ordinata del corredo cromosomico di un individuo, definita *cariogramma*. Il cariotipo umano comprende 22 coppie di autosomi (cromosoma che non partecipa alla determinazione del sesso) e una coppia di cromosomi sessuali, diversa nel maschio (XY) e nella femmina (XX).

Il sesso del nascituro dipende dal gamete maschile, che può portare il cromosoma X o il cromosoma Y. Il cromosoma X difatti presenta una eredità di tipo biparentale (trasmissibile da padre e madre) mentre il cromosoma Y è uniparentale da parte del padre. Il cromosoma X umano è metacentrico (centromero localizzato nella porzione centrale) e ha grandi dimensioni (ha più di 150 milioni di coppie di nucleotidi e 900-1200 geni). Molti dei geni del cromosoma

X risultano molto importanti per il corretto sviluppo ma solo uno di questi geni svolge un ruolo nel determinare il fenotipo femminile.

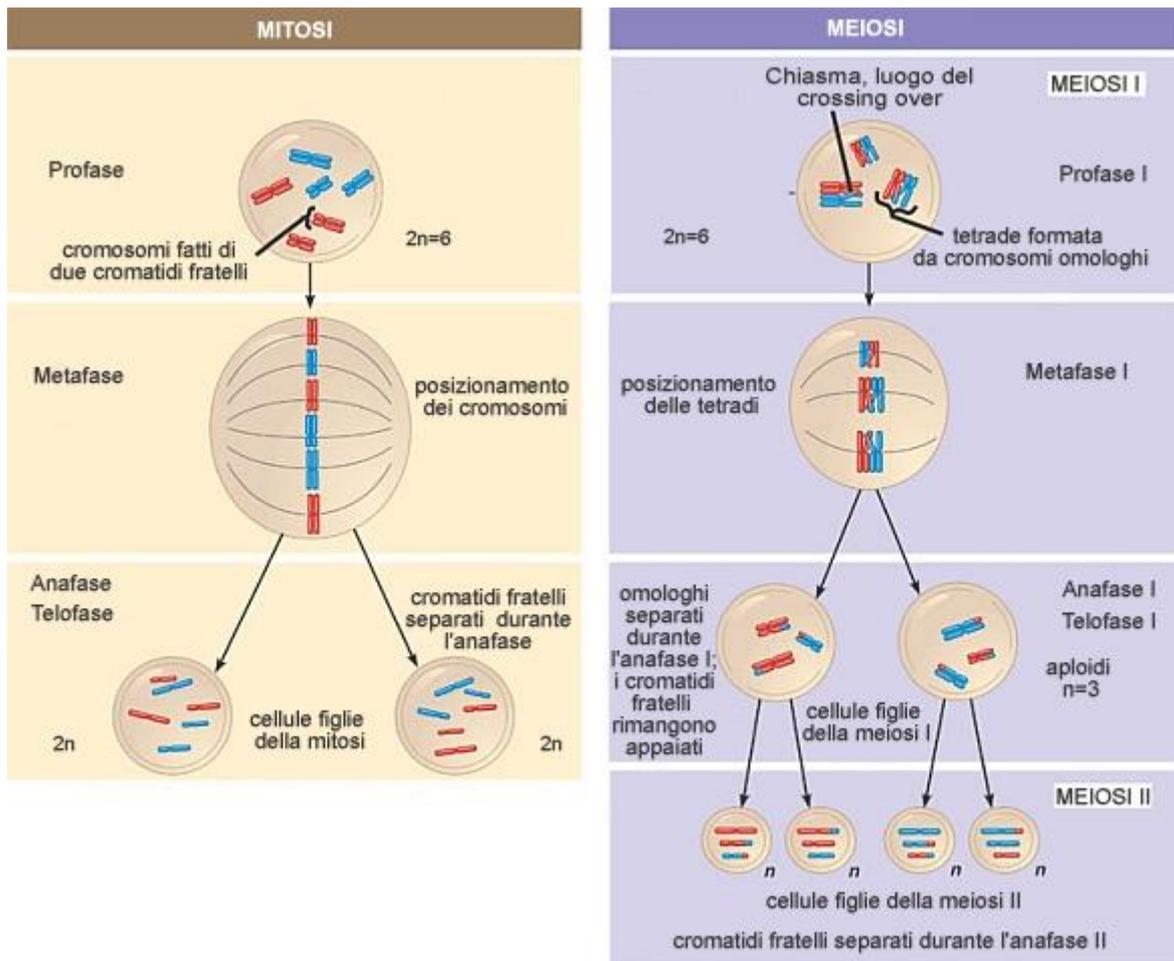
Il cromosoma Y presenta dimensioni più ridotte (57 milioni di coppie di nucleotidi, 200 geni). Il suo gene SRY (Sex Determining Region Y) stimola lo sviluppo dei testicoli nelle prime settimane e quindi la produzione di testosterone e l'attivazione a cascata di altri geni che comportano lo sviluppo maschile.

Meiosi e Mitosi

I cromosomi omologhi appaiono durante la meiosi e sono uno di origine paterna e uno di origine materna. Essi presentano nelle stesse posizioni (locus genico) geni che controllano gli stessi caratteri ereditari. Tali geni sono definiti *alleli* e possono presentare delle varianti derivanti da mutazioni o polimorfismi (es. i gruppi sanguigni). In caso di alleli uguali (2 geni copia) si parla di genotipo omozigote di quell'individuo, nel suo zigote, per quel carattere (ad esempio AA o aa), se diversi di genotipo eterozigote (Aa).

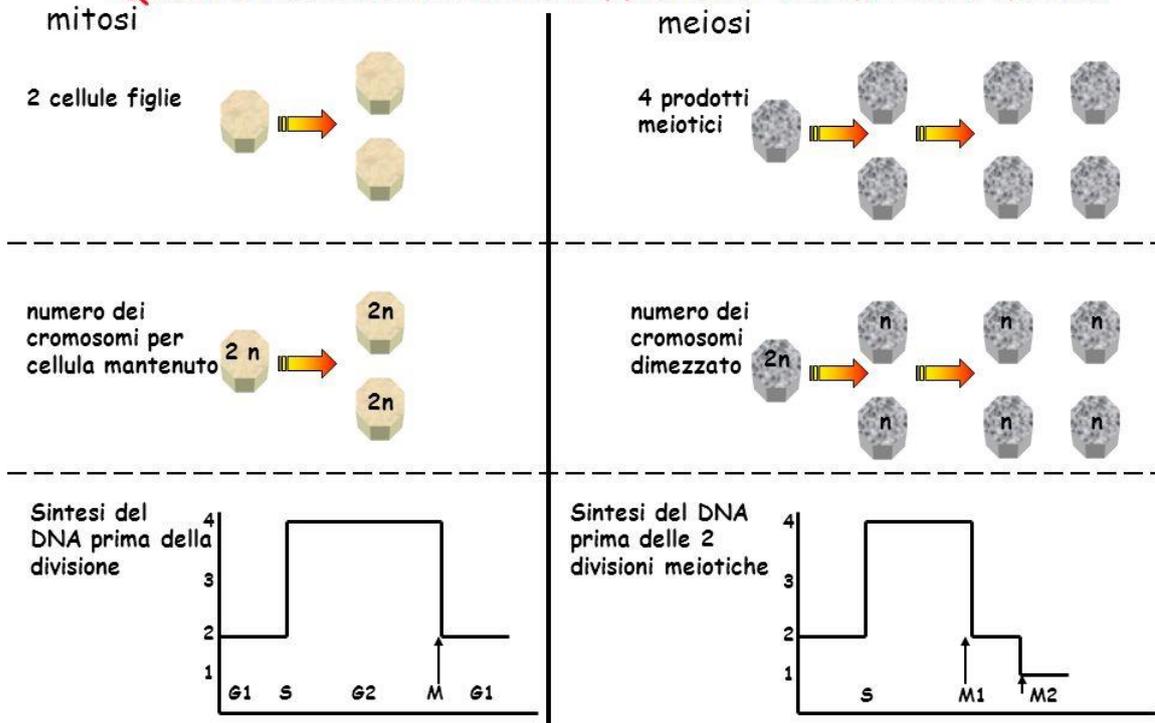
Il 99,9% del DNA è conservato fra individui diversi (100% per gemelli identici).

Il *genotipo* definisce quindi la costituzione genetica di un individuo che, se diploide, è identificata da due alleli per ogni carattere; Il genotipo è determinato dal tipo di allele fornito da ciascun gamete al momento della fecondazione. L'interazione del genotipo con fattori esterni ed interni si manifesta nel *fenotipo* inteso sia a livello del singolo carattere sia come l'insieme dei caratteri espressi da un individuo; il fenotipo rappresenta pertanto una variabile.



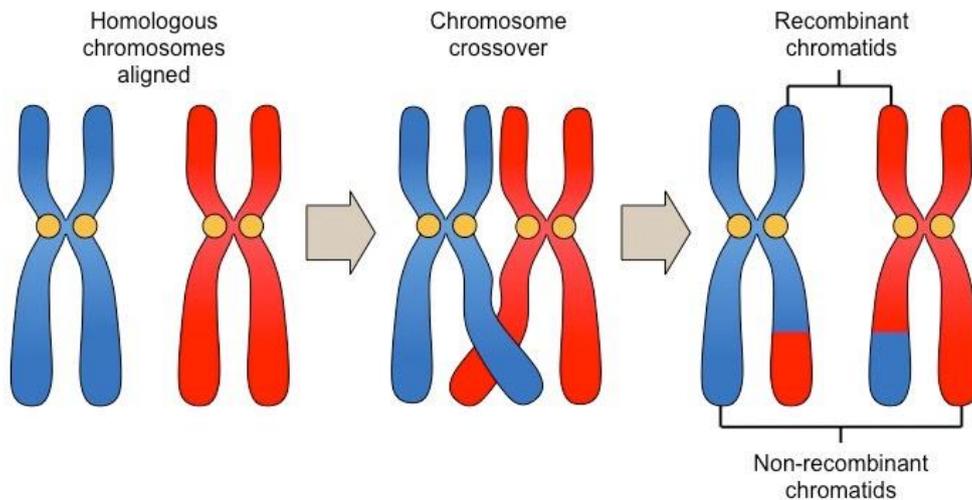
Le cellule somatiche di un organismo possiedono uguale patrimonio genetico e si dividono per mitosi, un processo di riproduzione asessuata delle cellule eucariote, generando cellule che contengono sempre lo stesso corredo. La mitosi serve per la crescita e lo sviluppo embrionale nonché per sostituire le cellule somatiche danneggiate o morte. La frequenza di divisione mitotica varia da tessuto a tessuto e da organo a organo. Il ciclo vitale di una cellula somatica è suddiviso in interfase e fase mitotica.

Quadro riassuntivo delle differenze tra mitosi e meiosi



La meiosi trasforma, mediante due divisioni successive, una cellula diploide in quattro cellule aploidi, geneticamente diverse l'una dall'altra. Un individuo infatti produce per meiosi gameti sempre diversi grazie a due eventi:

- 1) ricombinazione di alleli diversi durante il crossing-over che avviene due coppie di cromatidi fratelli (coppia formata dalle due copie di un cromosoma duplicato, uniti per il centromero) di due cromosomi omologhi durante la profase meiotica e raramente la mitotica. Di norma la frequenza con la quale il crossing-over avviene è direttamente proporzionale alla distanza che separa i due loci (*distanza interlocus*), quindi all'aumentare della distanza tra due geni, la proporzione di gameti ricombinanti aumenta e quella di gameti parentali diminuisce.



- 2) Assortimento degli omologhi durante l'anafase I che separa in modo casuale (segregazione indipendente) i cromosomi di origine materna e paterna. Si definiscono *geni associati* i geni presenti sullo stesso cromosoma che non segregano indipendentemente (in quanto non sono stati coinvolti in cross-over) e pertanto mostrano un'associazione (definita anche concatenazione o linkage). Nel linkage completo si producono solo gameti parentali ossia non ricombinati in proporzioni uguali (non è intervenuto alcun crossing over). In caso invece di crossing over si produce gameti sia parentali che ricombinanti (linkage parziale). Da quanto detto in precedenza due geni posti molto vicini sullo stesso cromosoma tenderanno ad avere una frequenza ricombinante minima e quindi un'alta probabilità di linkage.

Indice RF e Mappe genetiche

L'indice della frequenza di ricombinazione RF (Recombination frequency) di 2 geni posti sullo stesso cromosoma (frequenza con cui avviene il crossover) viene calcolato come rapporto n° gameti ricombinanti (con combinazioni alleliche diverse da quelle dei genitori) / n° gameti totali. La RF risulta pertanto direttamente proporzionale alla distanza tra i due geni. Il *centimorgan (cM)* è l'unità di misura della RF : 1 cM corrisponde alla distanza tra due geni con $RF = 1\%$ (1 gamete su 100 presenta una ricombinazione fra essi) ossia la distanza di 1 cM tra 2 marker indica che tali marker vengono separati in media 1 volta ogni produzione di 100 gameti ossia 1 volta ogni 50 meiosi ossia equivale al 1% di possibilità che un marker di un locus venga separato da un marker di un altro locus dello stesso cromosoma tramite il crossing over nell'ambito di una singola generazione.

E' un metodo che presenta dei limiti come nel caso di crossing over multipli

La creazione di *mappe genetiche* o mappa cromosomica o di concatenazione (genetic linkage map da non confondersi con la gene map) si basa proprio sul principio della RF e consiste in una rappresentazione della distanza che separa i geni di frequenza di ricombinazione genetica.

Tale mappa consente:

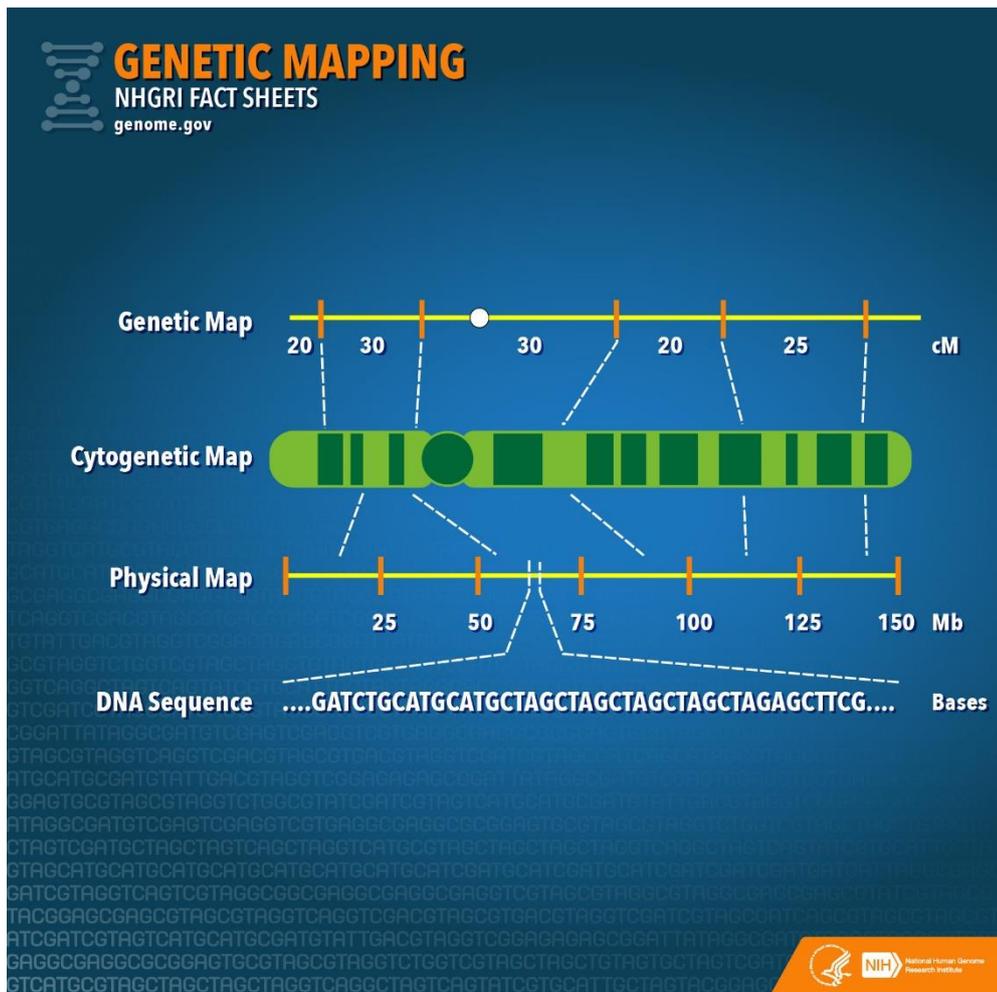
- localizzazione di un locus genico (o di un marker) rispetto agli altri e quindi definizione dell'ordine con cui i geni sono disposti sul cromosoma;
- predizione di segregazione;
- costruzione di una mappa genomica a partire da frammenti di DNA, isolati e inseriti in vettori di clonaggio;
- comprensione dell'organizzazione del genoma.

I risultati ottenuti dalla mappa genetica vengono integrati dalle mappe fisiche (di cui ne esistono tre tipi in base al livello di risoluzione) xhe, tramite marcatori genetici, esegue un'analisi diretta del DNA.

La mappa citogenetica si ottiene con la visualizzazione al microscopio ottico per mezzo di particolari tecniche di colorazione, dei cromosomi di una cellula.

Il passo successivo è l'identificazione della sequenza delle basi del DNA umano e ciò rientra nel *Progetto Genoma Umano HGP* (Human Genome Project) i cui scopi sono:

- completamento di una mappa genetica ad alta risoluzione (1cM) del genoma umano;
- completamento di una serie di mappe fisiche ad alta risoluzione di tutti i cromosomi umani;
- acquisizione di una collezione di cloni di DNA ordinati che coprano l'intero genoma;
- determinazione della sequenza nucleotidica completa di un genoma di riferimento;
- mappatura di tutti i geni.



Grazie a tale progetto sappiamo che abbiamo nella cellula:

- 2 metri di DNA in 5-20 μm di spazio, 46 cromosomi, 30.000-40.000 geni, 6 miliardi di paia di basi,
- solo il 3-5% del genoma codifica per proteine
- più del 50% del genoma è costituito da sequenze ripetute con funzione sconosciuta;
- una differenza dello 0,1% del DNA determina la variabilità della popolazione.

Ancora *non* si conosce bene:

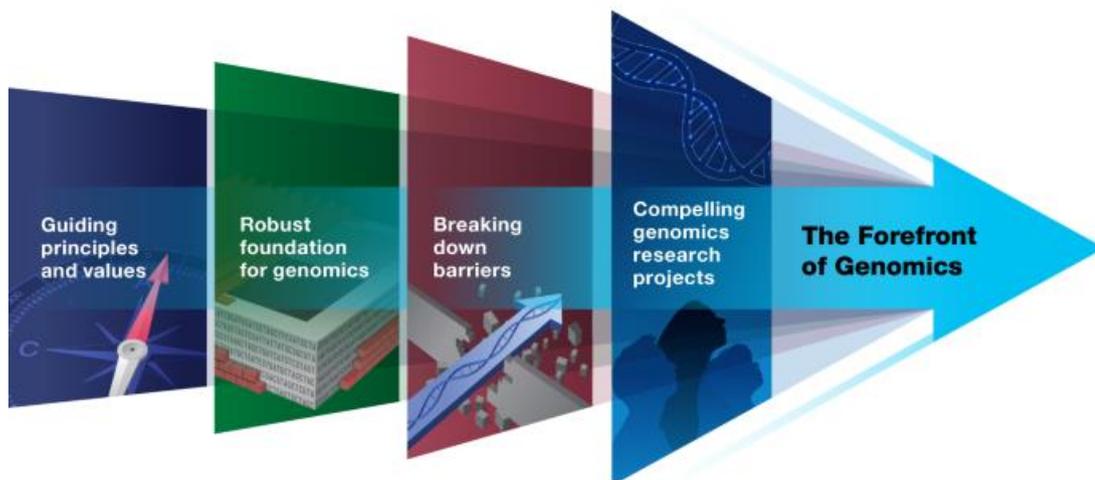
- esatto numero dei geni, loro localizzazione, funzione e fine regolazione
- tipi di DNA non-codificante, sua distribuzione e funzione;
- struttura e funzione di molte proteine
- correlazione tra variazioni di sequenza tra singoli individui con la salute e la malattia (predizione della suscettibilità a specifiche malattie in base alla variabilità genetica individuale)
- geni coinvolti nelle patologie complesse.

Genomica

Il Progetto Genoma Umano rappresenta un fondamento della genomica che è la disciplina che si occupa della struttura, sequenza, funzione ed evoluzione del genoma ossia di tutta l'informazione genetica contenuta nel DNA presente nelle cellule di una particolare specie. Questa nuova branca della biologia molecolare nasce e si sviluppa grazie alle tecniche di sequenziamento del DNA.

La genomica comprende principalmente due sottoaree:

- genomica strutturale che si occupa della mappatura genetica, di quella fisica e del sequenziamento di interi genomi.
- genomica funzionale che mira a comprendere le modalità con cui i geni dirigono lo sviluppo e il funzionamento del nostro organismo e come il loro malfunzionamento induca uno stato patologico.



Leggi di Mendel

- I) La prima legge di Mendel o *legge della dominanza* afferma che dall'incrocio tra due linee pure che differiscono per un solo carattere fenotipico, si ottiene una I generazione filiale (F1) in cui gli individui manifestano uno solo dei due fenotipi parentali. Questo fenotipo è definito dominante, mentre l'altro è recessivo e ricompare in II generazione filiale (F2).
- II) La seconda legge di Mendel o *legge della segregazione*, afferma che le due copie di un gene (alleli) si separano durante la formazione dei gameti; ogni gamete pertanto ne contiene solo una.

- III) La terza legge di Mendel o *legge dell'assortimento indipendente*, afferma che durante la formazione dei gameti, geni diversi si distribuiscono l'uno indipendentemente dall'altro. Oggi sappiamo che tale legge vale sempre per geni collocati su cromosomi distinti (ossia per gli alleli) mentre non è sempre valida per geni presenti sullo stesso cromosoma.

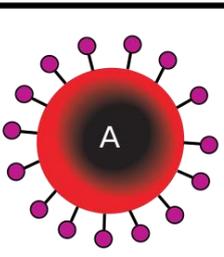
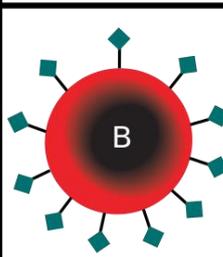
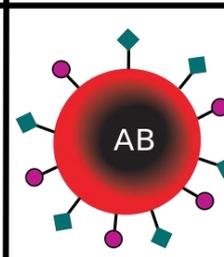
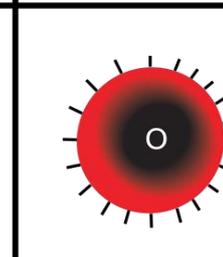
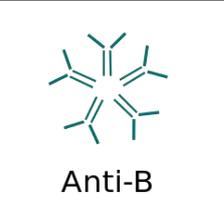
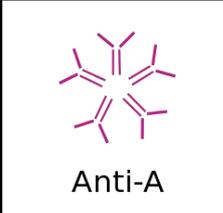
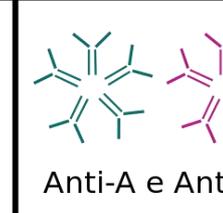
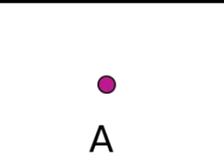
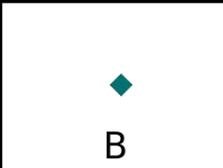
Nomenclatura

- Razza/linea pura: discendenza che presenta lo stesso carattere in tutte le generazioni (la riproduzione sessuale fornisce lo stesso risultato di quella asessuale).
- Ibrido: da genitori che presentano forme diverse (alleli diversi) per lo stesso carattere.
- Carattere dominante: quello che si manifesta impedendo la comparsa dell'altro che rappresenta quindi il carattere recessivo: la maggior parte delle malattie genetiche umane è causata da alleli recessivi (es. anemia falciforme).
- Generazione filiale: derivante dall'incrocio di due diverse linee pure.

Il termine omozigote si riferisce quindi a un gene in cui l'informazione riportata, che determina il fenotipo, dall'allele materno è identica a quella paterna ossia razza pura. Negli eterozigoti invece il contributo dell'allele materno e paterno è diverso (fenotipi differenti) e la determinazione fenotipica è correlata ai concetti di dominanza e recessività genetica oltre ad altri fattori quali l'interazione genotipo-ambiente.

In accordo con le leggi di Mendel:

- Si parla di *dominanza incompleta* quando nessuno dei due alleli per un carattere risulta dominante sull'altro pertanto l'eterozigote può presentare un fenotipo intermedio (qualitativamente e/o quantitativamente) rispetto a quello dei 2 genitori. Nelle generazioni successive ricompaiono i caratteri dei genitori (secondo le leggi di Mendel).
- Si parla di *codominanza* quando l'eterozigote manifesta i tratti fenotipici di un carattere di entrambi i genitori (tutti e due gli alleli di un locus manifestano il proprio fenotipo). Un esempio è il sistema ABO dei gruppi sanguigni che rappresenta anche un caso di poliallelia o allelia multipla in cui a uno stesso locus genico corrispondono più di 2 alleli. Nel caso dei gruppi sanguigni i 3 diversi alleli determinano gli antigeni presenti sulla superficie dei globuli rossi. La combinazione di questi 3 alleli produce 4 diversi fenotipi nella popolazione: A, B, 0, AB.

	Gruppo A	Gruppo B	Gruppo AB	Gruppo O
Tipi di GLOBULI ROSSI				
Anticorpi presenti	 Anti-B	 Anti-A	Nessuno	 Anti-A e Anti-B
Antigeni presenti	 A	 B	 A e B	Nessuno

Negli organismi diploidi dovrebbe esistere solo una coppia di alleli per ogni gene; in realtà è possibile che ve ne siano di più grazie alle **mutazioni genetiche**, che possono creare una nuova versione di un allele preesistente.

Al contrario la *pleiotropia* risulta essere un ampliamento dei principi di Mendel ed evidenzia la capacità di un singolo allele di influenzare più fenotipi diversi. Diverse malattie umane, caratterizzate da quadro clinico complesso (es. fenilchetonuria), trovano origine in un gene pleiotropico.

Inoltre oggi sappiamo che non sono solo i due alleli di uno stesso gene che interagiscono fra di loro bensì anche due o più geni diversi. L'*eredità poligenica* infatti indica la situazione in cui uno stesso carattere fenotipico è influenzato da più geni risultandone l'espressione sommativa, per questo lo si definisce carattere poligenico; ne sono esempi molti caratteri umani quali il colore della pelle, l'altezza, l'iride degli occhi.

Secondo la *concezione di Morgan* (Nobel per la fisiologia e medicina nel 1933) tramite questi meccanismi le specie acquisiscono un'ampia gamma di variazioni individuali restando allo stesso tempo unitarie. L'ambiente esercita una pressione selettiva sulla adattabilità delle caratteristiche alternative (alleli).

Dark Matter e paradossi della genomica

Si è stimato che circa l'1 - 5% delle 3×10^9 pb (paia di basi) che costituiscono il patrimonio genetico aploide codifica per proteine. Oggi sappiamo che quanto maggiore è la complessità di un organismo tanto minore è la sua densità genica. Più che il numero di cromosomi, geni o basi, è il genoma non codificante, la cosiddetta *dark matter* della genomica, che conta per la sua essenziale funzione nei processi di interazione e di regolazione.

I tre paradossi della genomica:

- 1) Paradosso C (enigma del valore C): la complessità di un organismo non è correlata alla grandezza del suo genoma;
- 2) Paradosso K: la complessità di un organismo non è correlata al numero dei suoi cromosomi;
- 3) Paradosso N: la complessità di un organismo non è correlata al numero dei suoi geni.

Euromatina - Eterocromatina

Oltre alle proteine istoniche la cromatina presenta le *proteine regolatrici* (sensibili a segnali cellulari e ormonali, che provocano la separazione degli istoni e la conseguente distensione del filamento, in determinate zone, permettendo alla RNA-Polimerasi di leggere e trascrivere la sequenza di nucleotidi per la sintesi proteica. Tale stato “aperto” della cromatina si definisce *euromatina* mentre con *eterocromatina* si identifica il suo stato “chiuso” in cui la deacetilazione delle code istoniche favorirebbe il legame delle proteine Sir (Silent Information Regulator), al nucleosoma. Durante le fasi di crescita cellulare la maggior parte della cromatina si trova sotto forma di euromatina.

Esistono zone del DNA, quali ad es. i centromeri e i telomeri, che non contengono geni (non codificanti) e si trovano sempre in forma di eterocromatina definita eterocromatina costitutiva. L'eterocromatina facoltativa riguarda invece porzioni di DNA codificanti e solo temporaneamente silenziate (es. in alcune cellule in base ai tipi di tessuto oppure a seconda delle fasi dello sviluppo dell'organismo o del ciclo cellulare).

Sofisticati meccanismi di regolazione dell'espressione genica determinano l'attivazione/disattivazione di specifici geni in base al tipo di cellula e a fattori ambientali e fisiologici.

Replicazione (duplicazione) del DNA

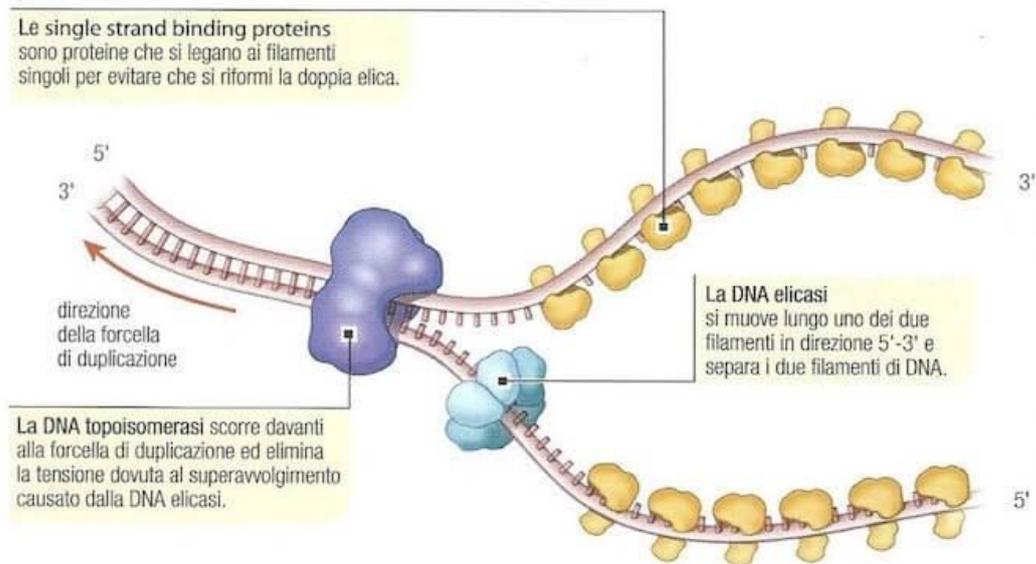
Attraverso il meccanismo definito *replicazione*, il DNA può essere duplicato e trasferito alle cellule figlie tramandando così le informazioni vitali di generazione in generazione. La replicazione del DNA può comportare degli errori e l'informazione può quindi essere trasferita leggermente modificata.

Nella maggioranza dei casi tali modifiche non comportano cambiamenti nell'organismo o, qualora avvengano, risultano incompatibili con la vita o con la capacità riproduttiva dell'individuo e quindi scompaiono al termine della generazione che le ha sviluppate. Modifiche che invece apportano nuovi caratteri possono rientrare a far parte del pool genico di una popolazione e, qualora al mutare delle condizioni ambientali rappresentassero un vantaggio, selezionerebbero gli individui che le possiedono a scapito degli altri e ciò sarebbe alla base dell'evoluzione.

La duplicazione del DNA è semiconservativa: a ogni ciclo di replicazione le molecole di DNA figlie contengono un filamento vecchio e uno nuovo.

La duplicazione della doppia elica di DNA richiede innanzitutto che i due filamenti (dsDNA double-stranded DNA) vengano svolti e separati in due filamenti singoli (ssDNA single-stranded DNA) rompendo i deboli legami a idrogeno esistenti tra le coppie di basi azotate complementari. Tale processo viene definito *denaturazione del DNA* (DNA melting) e avviene per opera dell'enzima DNA-elicasi a partire dalla regione detta forca (o forcella) di replicazione.

Gli elementi indispensabili all'avvio della duplicazione di DNA, definiti *replisoma* o sistema del DNA, sono: DNA elicasi, DNA topoisomerasi (DNA-girasi), proteine SSB (single strand binding proteins).



Il DNA eucariotico viene duplicato in poche ore grazie al fatto che esistono più origini di replicazione. In ogni origine vengono organizzate due forche che procedono in direzione opposta; ciò accade anche nelle cellule procariote tipiche, come *Escherichia coli* (in cui il DNA è organizzato in un'unica molecola circolare) dove però l'origine di replicazione, chiamata *oriC*, è unica e in essa si assemblano due forche di replicazione che procedono in direzione opposta fino a incontrarsi in una regione di terminazione, pressoché opposta a *oriC*, detta *terC* (durata duplicazione del DNA batterico circa 40 minuti).

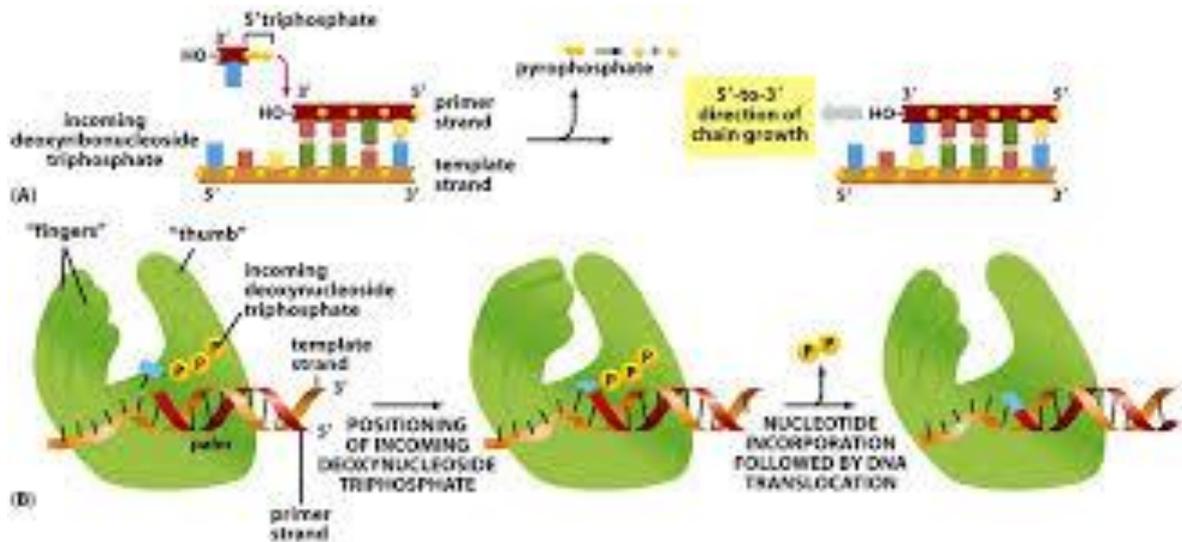
Il tratto di DNA compreso fra un'origine e le due terminazioni della replicazione, cioè i punti in cui le forche di replicazione adiacenti si fondono, rappresenta l'unità di replicazione (contenente tutti i geni che codificano per i polipeptidi atti alla sua autoreplicazione) e viene chiamata *replicone*.

Sintesi del DNA (del nuovo filamento)

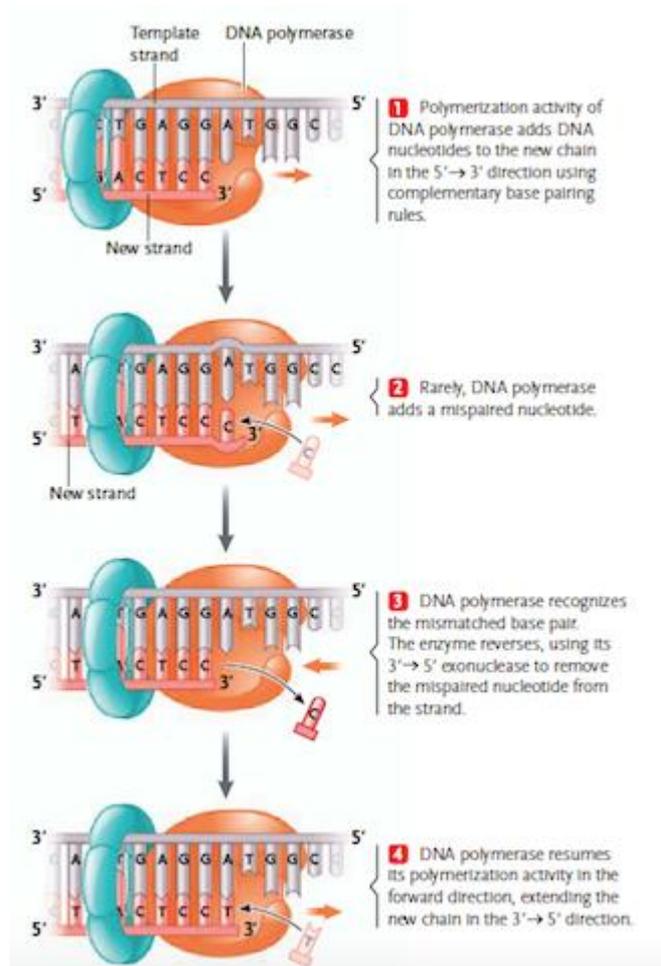
L'enzima DNA polimerasi I DNA dipendente è in grado di allungare in direzione 5'-3' un tratto di acido nucleico preesistente mediante l'aggiunta di deossinucleotidi rispettando la complementarità delle basi azotate rispetto a quelle dello stampo. La presenza di quest'ultimo si rende necessaria al fine di evitare sintesi di DNA con sequenze casuali. Pertanto, una volta avvenuta la separazione dei due filamenti, l'enzima *primasi* (una RNA polimerasi) crea un piccolo tratto di RNA, detto *primer o innesco*, che viene allungato dalla DNA polimerasi. Quest'ultima utilizza nucleosidi trifosfati (dNTP, deossinucleosidi trifosfato) come substrati: il rilascio di pirofosfato (PPi) e la successiva idrolisi in due gruppi fosfato liberi, in seguito alla

formazione del legame fosfodiesterico col 3'-OH dell'ultimo nucleotide del filamento in crescita, genera l'energia indispensabile ad attuare la polimerizzazione.

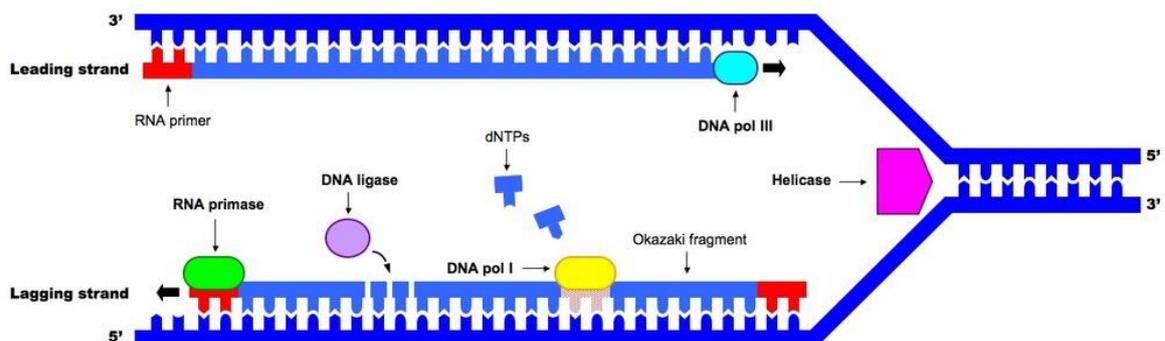
La struttura della DNA polimerasi ricorda una mano destra parzialmente chiusa che accoglie nel suo palmo il complesso innesco-stampo.



La DNA polimerasi inoltre rileva appaiamenti scorretti e rimuove i nucleotidi errati grazie a un'attività esonucleasica 3'-5' (così definita in quanto la rimozione dei nucleotidi, tramite rottura dei legami fosfodiesterici, avviene a partire da un'estremità), definita *correttore di bozze* (proofreading).



Poiché, come detto, la DNA polimerasi polimerizza in direzione 5'-3', uno dei due filamenti viene sintetizzato in modo continuo (leading strand) a partire da un unico primer, mentre quello con orientamento opposto in modo discontinuo (lagging strand) producendo dei frammenti di DNA (frammenti di Okazaki) composti da 1000-2000 nucleotidi nei procarioti, 100-200 negli eucarioti. La formazione dei legami fosfodiesterici di questi frammenti è realizzato dall'enzima *DNA ligasi*.

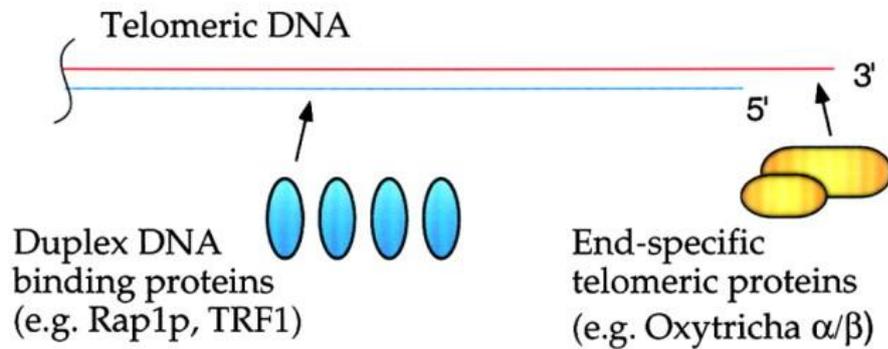


L'enzima RNasi H provvede a eliminare tutti i primer insieme a una polimerasi alternative che provvedono anche a colmare i vuoti rimasti.

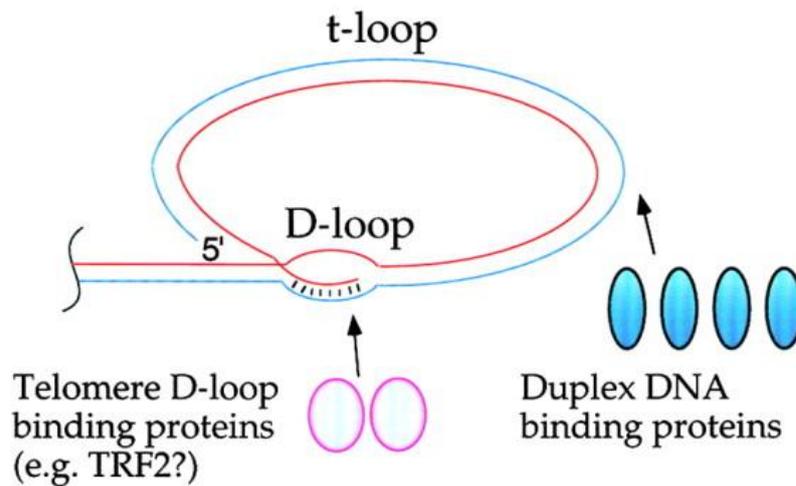
I *telomeri* costituiscono le parti terminali dei cromosomi e svolgono un ruolo protettivo di fondamentale importanza. Essi sono rappresentati da sequenze 5'-TTAGGG-3' (ripetute circa 2.500 volte nell'uomo), prima di questa sequenza vi sono ripetizioni degenerate e altre sequenze ripetute mentre la parte terminale è costituita da un singolo filamento (di ca. 300 basi) di DNA 3' - protrudente che si ripiega invadendo la regione a doppia elica formando il cosiddetto T-loop. Il T-100p viene tenuto assieme da un insieme di proteine (TRF1, TRF2, POT1, TIN1, TIN2 ecc.) denominato complesso Shelterin. Grazie a tali strutture, i telomeri formano "cappucci" che proteggono le estremità del DNA dall'attacco di vari enzimi (esonucleasi, proteine coinvolte nella riparazione ecc.) e da altre attività cellulari potenzialmente dannose.

Durante la divisione cellulare essi vanno incontro ad accorciamento. Un altro fattore capace di comportare l'accorciamento dei telomeri è lo stress ossidativo attuato dai radicali liberi. Un tempo si pensava che i telomeri non presentassero alcun ruolo codificante ma oggi sappiamo che producono trascritti denominati "terra" che sembrano implicati nella loro stessa regolazione.

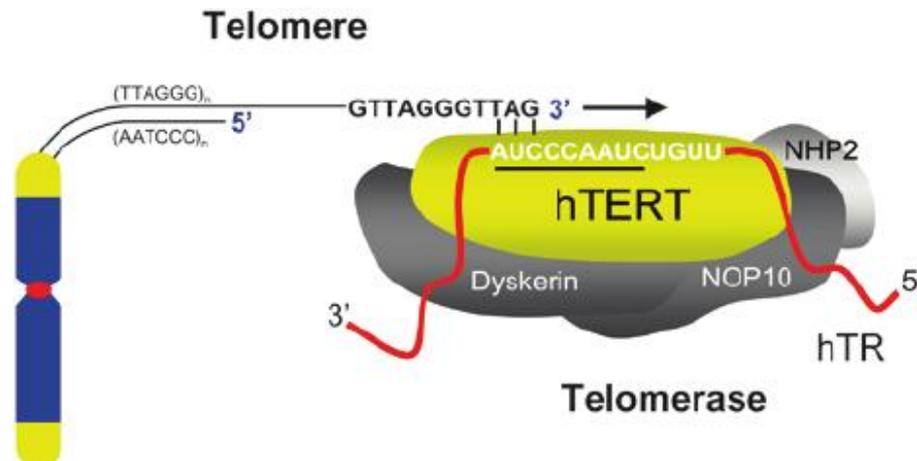
A. The classical view



B. The new view



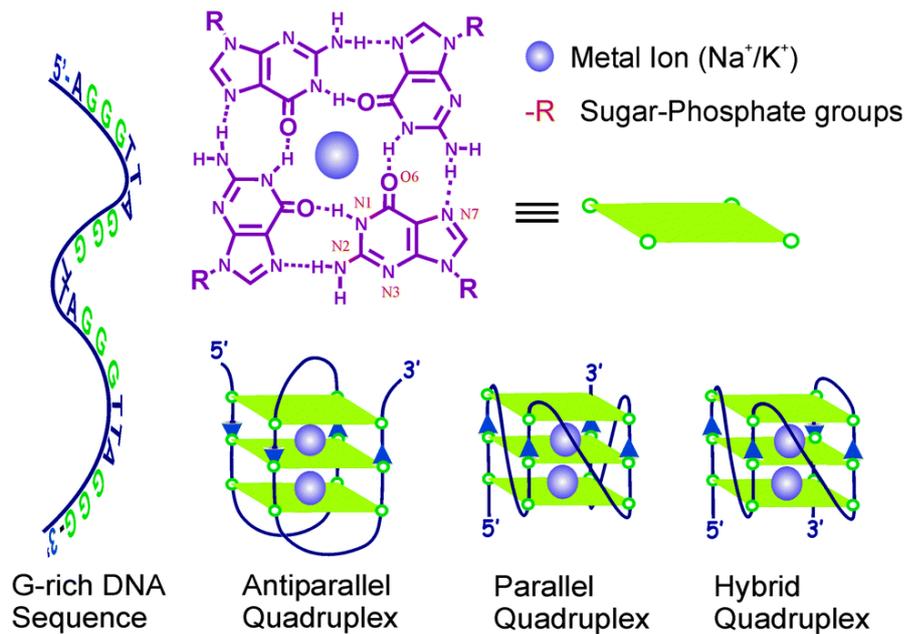
Il mantenimento dei telomeri è assicurato dalla *telomerasi*, un complesso proteino-RNA formata principalmente dall'enzima trascrittasi inversa (hTERT) più una frazione ribonucleo-proteica (TER o hTR) contiene uno stampo, costituito da un breve tratto di RNA, che utilizza per creare il DNA ricco di Guanina del telomero. L'insieme proteico afferra l'estremità del telomero portando con sé la telomerasi in modo da permetterle di aggiungere le unità ripetenti.



Nei mammiferi la telomerasi svolge la sua massima attività in cellule embrionali, staminali, linfocitiche e cancerose (almeno nel 85% dei tumori). Dopo la nascita è molto meno attiva e così i telomeri si accorciano con l'età. Se i telomeri divengono troppo corti possono essere identificati come danni del DNA smettendo di crescere (senescenza cellulare) o avviando l'apoptosi cellulare. L'assenza dei telomeri comporta anche una maggiore "collosità" degli acidi nucleici che tenderanno così a compattarsi in maniera anomala.

L'invecchiamento (e lo stato ossidativo) è quindi sinonimo di accorciamento (erosione) dei telomeri. In teoria l'attivazione dell'enzima telomerasi può rendere la cellula eterna; negli animali a crescita continua (che non "invecchiano" mai), come l'aragosta, la telomerasi risulta sempre attiva. Un eccesso di attività della telomerasi può però causare gravi problemi (es. tumori).

La sequenza ricca di guanina dei telomeri può formare una struttura secondaria planare molto particolare in cui quattro guanine poste in quattro punti diversi si uniscono tramite legami a idrogeno, definita quartetto o tetrade di guanine (G4-DNA). Due o più tetradi di guanina possono a loro volta impilarsi l'uno sull'altro per formare un quadruplex G. Tali strutture sono in grado di ridurre l'attività della telomerasi e le loro attività nei processi genetici di base sono oggetto di ricerca oltre che nei telomeri, nella regolazione genica e in genomica funzionale.



Riduzione dello stress, eliminazione del fumo di sigaretta, sana attività fisica e alimentazione, riduzione delle calorie rappresentano stimoli organici a ripristinare una più fisiologica lunghezza telomerica.

RNA

RNA (RiboNucleic Acid) è la macromolecola biologica presente nel nucleo e nel citoplasma presentante un ruolo centrale nella produzione o sintesi delle proteine a partire da una molecola di DNA.

La struttura del RNA è di norma a elica singola (fanno eccezione i dsRNA descritti in seguito) ossia è un unico filamento di nucleotidi tenuta insieme dai legami fosfoesterei da cui “pendono” le varie basi azotate secondo una sequenza prefissato nel DNA nucleare. tale filamento può trovarsi in forma distesa o ripiegata su se stessa tramite legami idrogeno tra alcune basi azotate. La modalità con cui si formano questi legami a idrogeno è infatti stabilita dalla cosiddetta “complementarietà delle basi azotate” (determinata dalla posizione dei vari gruppi OH e NH₂): adenina – uracile (2 legami), guanina – citosina (3 legami).

Esistono diverse classi di RNA, tutti trascritti nel nucleo a partire dal DNA, di cui le principali:

- mRNA: messaggero
- tRNA: di trasferimento
- rRNA: ribosomiale
- miRNA (micro) e siRNA (small/short interfering): regolazione dell'espressione genica (descritti nel capitolo “Epigenetica”).

Gli *RNA messaggeri (mRNA)* vengono trascritti dai geni che devono essere espressi ossia tradotti in specifiche proteine. Pertanto gli mRNA rappresentano la copia del gene, che può essere trasportata fuori dal nucleo raggiungendo il citoplasma, che fornisce le istruzioni per la sintesi proteica nei ribosomi.

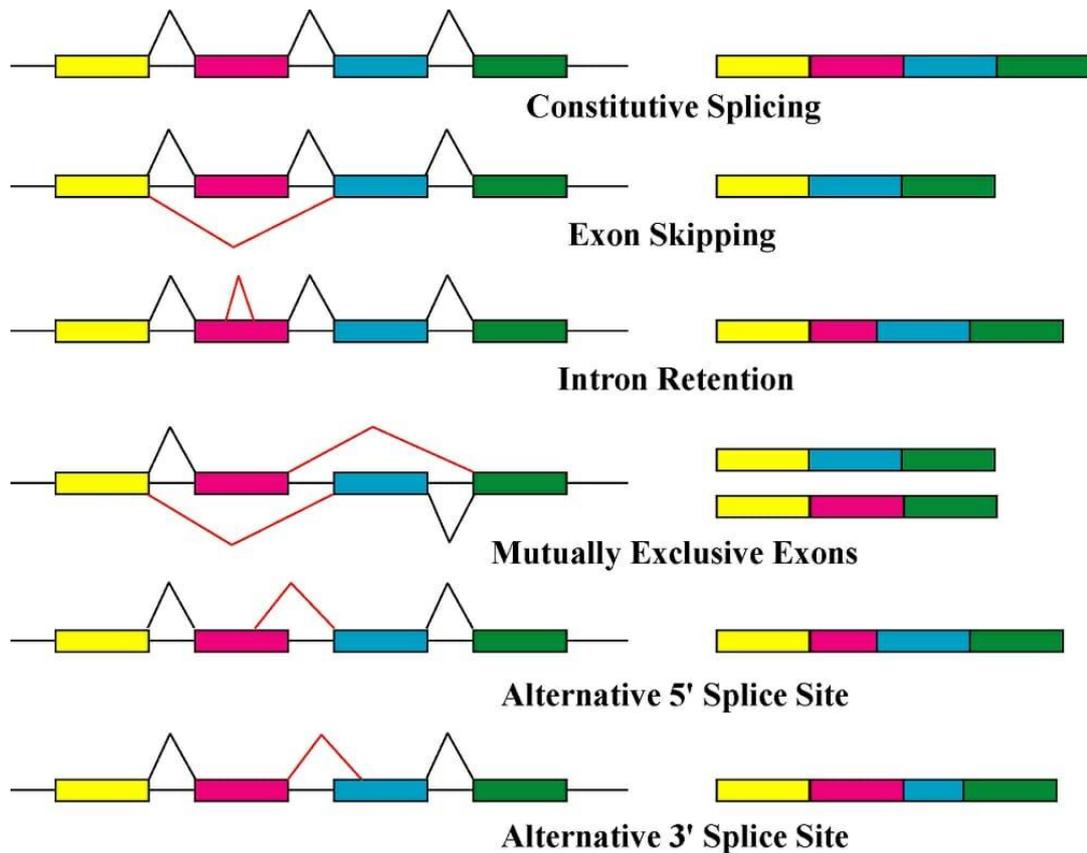
L'mRNA trascritto primario (pre-mRNA) subisce nel nucleo tre processi di maturazione prima di essere trasportato nel citoplasma:

- 1) Capping al 5' (cappuccio in 5' o 5' cap), inserimento di un nucleotide speciale, costituito da guanina, 7-metil-guanosina e due gruppimetilici (CH₃), all'estremità 5' che avviene solo nel nucleo (pertanto l'mRNA di mitocondri e cloroplasti non viene rivestito) in maniera altamente regolata, assicura la stabilità del RNA messaggero mentre avviene la traduzione e riveste un ruolo nell'iniziarla;
- 2) Poliadenilazione al 3'. aggiunta di una coda poliadenilica - poli(A) di circa 50-250 adenine (non presente negli mRNA che codificano per gli Istoni) la cui presenza impedisce l'azione delle esonucleasi 3'-5' e consente la separazione del mRNA dai molto più numerosi rRNA e tRNAI;
- 3) Splicing, rimozione delle parti non codificanti (introni) e legame enzimatici delle zone codificanti (esoni) così da formare l'mRNA definitivo.

Oltre allo splicing "canonico" detto costitutivo (costitutive) esiste lo *splicing alternativo* è che porta alla produzione di RNA messaggeri maturi diversi, a partire da uno stesso pre-mRNA, unendo in maniera diversa gli esoni. In tal modo si ha sintesi di proteine diverse per funzione, localizzazione e altre proprietà.

Sono stati identificati 5 tipi diversi di Splicing alternativo:

- 1) Salto dell'esone, l'esone viene eliminato dal trascritto primario (sembra essere il meccanismo più comune nei mammiferi);
- 2) Introne trattenuto, a causa del non riconoscimento dei siti di taglio col rischio di sintesi di una proteina tronca e/o non funzionale.
- 3) Esone mutuamente esclusivo, solo uno dei due esoni viene mantenuto nell'mRNA maturo;
- 4) Sito di taglio alternativo 5', viene usato un sito di taglio alternativo al 5'cambiando l'estremità 3' dell'esone a monte;
- 5) Sito di taglio alternativo 3', viene usato un sito di taglio al 3'alternativo cambiando l'estremità 5' dell'esone a valle;



Le sequenze che permettono il riconoscimento di siti di Splicing sono riconosciute da proteine SR (ricche in arginina e serina) e vengono chiamate:

- Exotic Splicing Enhancers (ESE) se presenti su esoni;
- Intronic Splicing Enhancers (ISE) presenti su introni.

Le sequenze invece che mascherano i siti di Splicing sono riconosciute dalle proteine hnRNP (Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins) e vengono definite:

- Exotic Silencers (ESS) se presenti su esoni;
- Intronic Silencers (ISS) presenti su introni.

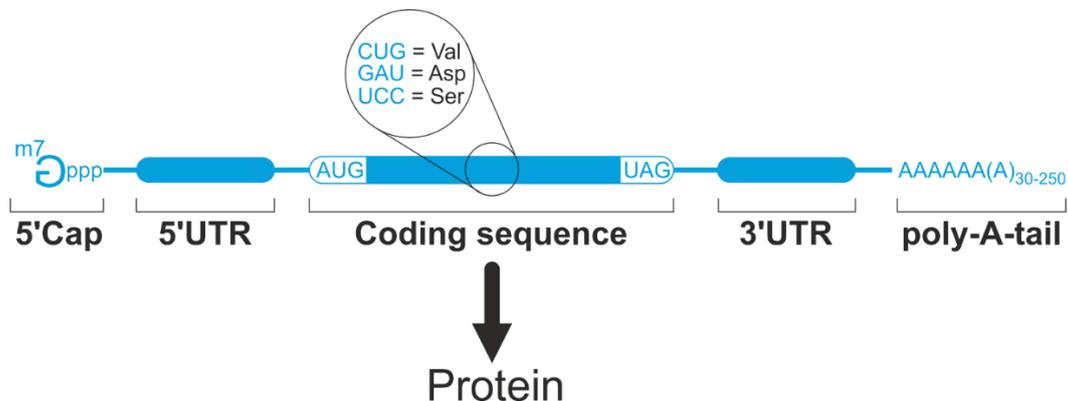
La possibilità che avvenga uno Splicing alternativo dipende dalla presenza nella sequenza del RNA di ESE, ISE, ESS, ISS e dalla disponibilità delle relative proteine di legame.

Pertanto ogni gene e quindi ogni mRNA che viene trascritto contiene l'informazione per un'unica proteina ma da uno stesso pre-mRNA si possono ottenere diversi mRNA biologicamente attivi.

Un esempio nei mammiferi sono le cinque diverse forme di tropomiosina, tutte derivanti dallo stesso pre-mRNA, corrispondenti ai rispettivi tessuti: muscolare striato, muscolare liscio, connettivo, del fegato e del cervello.

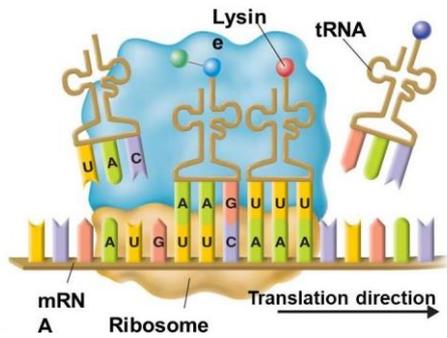
La struttura di un mRNA maturo (biologicamente attivo) si compone di tre parti principali:

- 1) sequenza leader o “regione al 5’ non tradotta” (5’ Untranslated Region - 5’ UTR) in posizione 5’, di lunghezza variabile ma costante per un dato tipo di mRNA, non codifica per un amminoacido ma contiene l’informazione indispensabile al ribosoma per orientarsi e cominciare la sintesi proteica (traduzione);
- 2) sequenza codificante del mRNA, segue la sequenza leader, determina nella traduzione la sequenza amminoacidica di una proteina, la sua lunghezza varia in funzione di quella della relativa proteina;
- 3) sequenza di coda o “sequenza al 3’ non tradotta” (3’ UTR), presente subito dopo la sequenza codificante e costituisce la porzione terminale in 3’ della molecola di mRNA, ha una lunghezza variabile a seconda dell’ mRNA. 5



Il codone è l’unità informativa del mRNA costituita da una specifica tripletta di nucleotidi che, all’interno dei ribosomi, traduce il codice genetico in codice proteico per uno specifico amminoacido nell’ambito appunto della sintesi delle proteine. Uno stesso amminoacido viene codificato da vari codoni. Esistono infatti 61 diversi tRNA (61 differenti codoni) pertanto, come già detto, si definisce il codice genetico come “degenerato” o ridondante. Ogni mRNA però risulta specifica per una sola proteina.

I tRNA (*RNA transfer o di trasporto*) si ottengono tramite processamento di pre-tRNA, contenenti una sequenza leader in 5’ (sequenza situata fra l’estremità 5’ e il codone di inizio, in



genere non codifica per proteine ma per il peptide leader con funzione regolativa) e una sequenza di coda in 3' (entrambe eliminate per via enzimatica). I tRNA maturi ossia biologicamente attivi sono corte catene di RNA (di circa 70-90 nucleotidi) trascritti da specifici geni che, una volta sintetizzati, si ripiegano su se stessi assumendo una tipica forma a trifoglio. Ogni tRNA si

lega nel citoplasma a un amminoacido per poi cederlo poi al ribosoma così che quest'ultimo venga incorporato nella catena polipeptidica. Il tRNA presenta una regione con tre nucleotidi, definita anticodone, che riconosce il corrispondente codone del mRNA tramite l'appaiamento di basi complementari. Il tRNA presenta in 3' un sito di attacco per l'amminoacido specifico di una catena polipeptidica in crescita che trasferisce al sito ribosomiale della sintesi proteica. Ogni molecola di tRNA può legarsi ad un solo tipo di amminoacido. Il tRNA rappresenta in cellule procarioti ed eucarioti il 10-15% del RNA totale.

Gli *rRNA*, 18S, 28S, 5,8S e 5S, sono una famiglia di piccole sequenze di RNA che insieme a proteine specifiche costituiscono la subunità piccola e grande dei ribosomi. La subunità piccola riconosce l'mRNA e si lega a esso, la subunità grande presenta tre siti funzionali:

- una importante regione enzimatica che catalizza l'aggiunta di amminoacidi alla catena polipeptidica nascente, mediante formazione di legame peptidico;
- i siti P e A che si legano al tRNA, permettendo quindi di tradurre l'informazione portata dall'RNA messaggero nella corretta sequenza di amminoacidi.

Anche l'rRNA matura deriva da un pre-rRNA contenente sequenze spaziatriche interne (ITS) ed esterne ossi alle estremità (ETS) che vengono rimosse enzimaticamente.

Trascrizione del DNA

La trascrizione rappresenta il processo, simile in cellule eucariote e procariote, di copiatura di sequenze di basi di DNA in sequenze di basi di RNA.

Un breve tratto della doppia elica di DNA vicino al gene viene denaturata e grazie all'azione dell'enzima RNA polimerasi viene sintetizzata (trascritta) una molecola di RNA in direzione 5'-3' dallo stampo di DNA in direzione opposta (3'-5'). Solitamente viene trascritta solo una delle due eliche di DNA, chiamata appunto elica stampo (quella complementare è detta "elica senso").

RNA polimerasi è un enzima appartenente alla classe delle transferasi di cui si conosce ancora relativamente poco. Negli eucarioti esistono 3 diversi tipi di RNA polimerasi:

- RNA polimerasi I localizzata nel nucleolo, trascrive rRNA 28S , 18S , 5,8S;
- RNA polimerasi II, localizzata nel nucleo, trascrive mRNA e alcuni snRNA;
- RNA polimerasi III, localizzata nel nucleo, trascrive rRNA 5S, tRNA e snRNA non sintetizzati dalla RNA polimerasi II.

La polimerizzazione del RNA è molto simile a quella del DNA, l'RNA polimerasi però per iniziare non necessita di un primer ma non ha capacità di correzione di bozza. La trascrizione sottosta a vari tipi di regolazione.

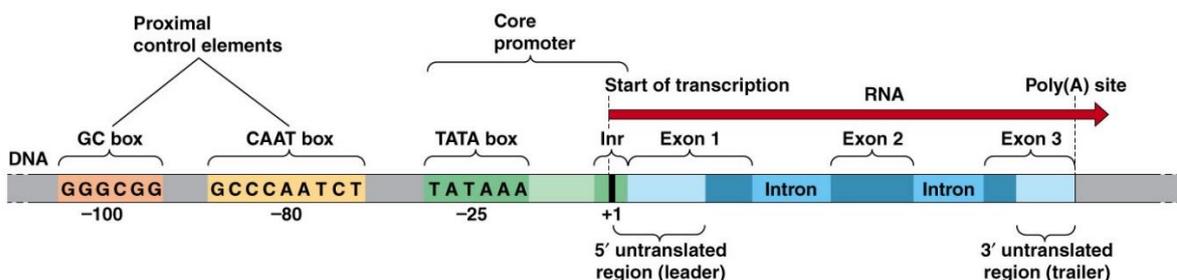
Solo la trascrizione dei geni strutturali in pre-mRNA (poi processato in mRNA maturo) viene tradotta nella sintesi proteica. Tali geni negli eucarioti contengono sia esoni sia introni e pertanto vengono detti frammentati o interrotti. I geni non strutturali esprimono l'informazione anche per strutture non proteiche come alcuni RNA (rRNA, tRNA e snRNA).

Un gene che codifica per una proteina possiede molti **geni regolatori**, detti elementi, localizzati a monte e a valle del punto di inizio della trascrizione. Gli elementi regolatori si dividono in promoter, enhancer (attivano la trascrizione) e silencer (reprimono la trascrizione),

Geni Promoter: La regione immediatamente adiacente al sito di inizio della trascrizione è organizzata in una serie di elementi o moduli regolatori con sequenza canonica (ovvero comune a tutti gli organismi) detti promotori ed è essa stessa definita Promotore.

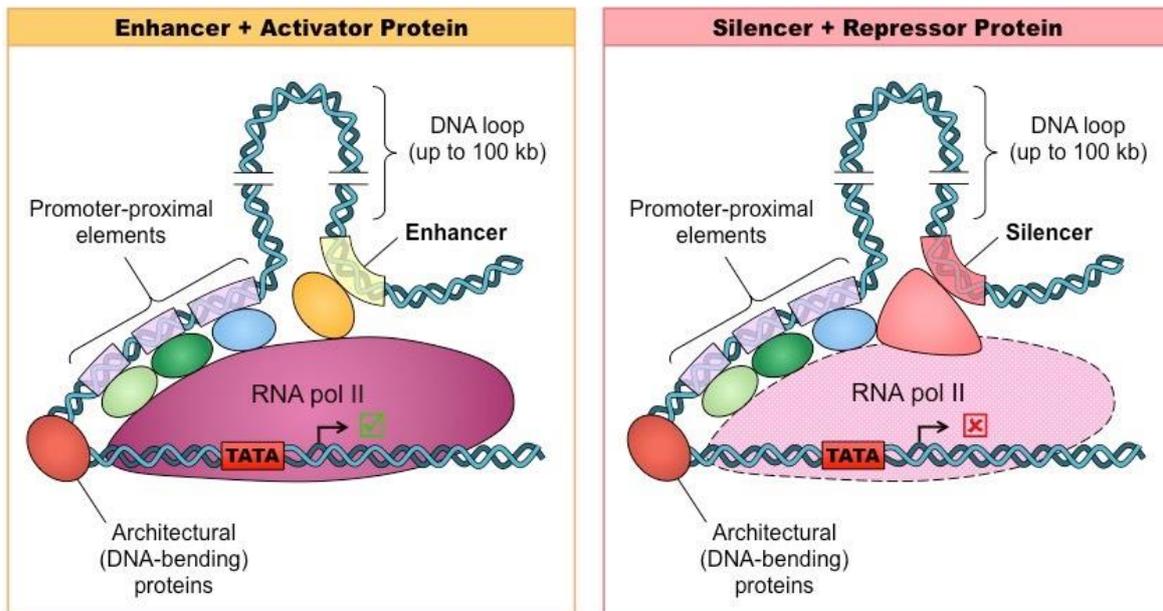
Partendo da quello più vicino al sito di inizio di trascrizione gli elementi promotori sono:

- TATA box o o Goldberg-Hogness box
- CAAT box
- GC box



© 2012 Pearson Education, Inc.

I *Geni Enhancer* (elementi di intensificazione) e *Silencer* (silenzianti) sono necessari per ottenere rispettivamente il massimo o il minimo grado di trascrizione di un dato gene. Essi si legano al promotore e il loro effetto si manifesta in entrambi gli orientamenti anche a notevole distanza dal gene. Il loro funzionamento è poco chiaro, si sa che quando le proteine regolative si legano agli enhancer o silencer il DNA forma una struttura a occhiello (loop) in modo da favorire le interazioni con i fattori di trascrizione e di regolazione.



Gli elementi regolatori legano infatti:

- fattori di trascrizione o Transcription Factor TF (proteine richieste per l'inizio della trascrizione dalla RNA polimerasi);
- fattori di regolazione (proteine coinvolte nella attivazione o repressione della trascrizione di un gene).

RNA polimerasi per riconoscere il proprio promotore necessita di specifici *Transcription Factor* TF i quali, in base al RNA polimerasi con cui cooperano, vengono definiti:

- TFI: RNA polimerasi I
- TF II: RNA polimerasi II
- TF III: RNA polimerasi III

Per ogni RNA polimerasi vengono coinvolti diversi fattori trascrizionali, indicati con una successione di lettere ossia TF A, B, C ecc.

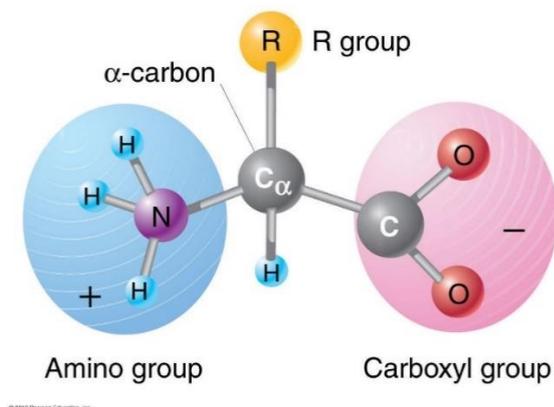
Come già affermato, una volta che mRNA è maturo (biologicamente attivo) codifica la sintesi di una proteina.

Proteine

Le proteine sono composti organici azotati ad alto peso molecolare molto complessi, formate da una o più subunità macromolecolari (polipeptidi), a loro volta costituiti da subunità minori (amminoacidi).

Gli amminoacidi sono implicati praticamente a 360° nelle funzioni organiche, sono composti organici la cui struttura di base è un atomo di carbonio centrale (carbonio alfa) al quale si legano:

- un gruppo aminico (NH₂),
- un gruppo carbossile (COOH),
- un atomo di idrogeno (H),
- un gruppo variabile (R) che determina le caratteristiche di ogni singolo amminoacido.



Ai 20 amminoacidi proteinogenici “canonici” vanno aggiunti tre scoperti solo recentemente (selenocisteina, pirrolisina e N-formilmetionina).

Il nostro organismo non riesce a sintetizzare alcuni degli amminoacidi che vengono perciò definiti "aminoacidi essenziali (AAE – Amino Acid Enhanced) e devono pertanto essere introdotti con gli alimenti. Nello specifico essi sono i seguenti otto:

- Lisina: presente soprattutto in legumi, latticini, manzo, serve alla formazione della carnitina e della vitamina B3, partecipa alla creazione dell'ormone della crescita (GH) e alla fissazione del calcio nelle ossa, inoltre è fondamentale nella produzione di anticorpi ed è parte costituente della cheratina dei capelli.

- **Triptofano:** si trova in legumi, latticini, uova, carne, pesce, cioccolato, aminoacido chiave nella sintesi proteica e di sostanze fondamentali come il neurotrasmettitore serotonina che può essere convertito in melatonina (fondamentale per la corretta regolazione del ritmo sonno-veglia). Infine circa il 3.3% del triptofano alimentare viene destinato alla sintesi di **niacina** (nota anche come Vitamina PP) utile, fra le altre cose, per la conversione dei nutrienti in energia.
- **Fenilalanina:** in cereali integrali, carne, pesce, uova, è coinvolta in tutti i processi metabolici, ad es. la produzione di dopamina (neurotrasmettitore fondamentale per la regolazione della frequenza cardiaca, del sonno e dell'umore) e degli ormoni tiroidei. Dalla fenilalanina deriva l'amminoacido tirosina (per questo detto semi-essenziale),
- **Treonina:** in legumi, frutta secca, funghi, uovo, prodotti caseari, carne e pesce (merluzzo, sardine), è un costituente degli anticorpi e oltre che nell'ambito del sistema immunitario riveste un ruolo importante nelle funzioni depurative di fegato e reni, è un precursore di collagene ed elastina e, in caso di attività sportive, può essere utile per prevenire stiramenti muscolari e traumi dei tendini.
- **Metionina:** in cereali e altri semi, latticini, albume d'uovo, pesce (merluzzo), proteine della soia (ne sono poveri i legumi e la maggior parte di frutta e verdura), è alla base della produzione di carnitina, cisteina, creatina, taurina e vitamina B12, aumenta le **capacità depurative** e svolge azione lipolitica a livello epatico. L'amminoacido cisteina viene sintetizzato a partire dalla metionina (e viene pertanto definito semi-essenziale). Stesso discorso vale per N-formilmetionina considerato il 23esimo amminoacido e anch'esso derivato dalla metionina.
- **Leucina:** in cereali, legumi, carne, pesce, uova, latticini, svolge un ruolo importante a livello muscolare in quanto ne accresce la resistenza, stimola la sintesi proteica (evitando il catabolismo muscolare durante l'attività sportiva intensa o di lunga durata) e supporta il metabolismo nei periodi di digiuno.
- **Isoleucina:** in legumi, semi, frutta secca, carne, pesce, uova, è strettamente legata al fabbisogno di **glucosio**, viene utilizzata come fonte alternativa ad esso in caso di ipoglicemia avanzata (dovuta ad es. a intensa attività fisica), è in grado di stimolare la produzione di insulina e risulta pertanto utile in soggetti diabetici.
- **Valina:** in cereali integrali, legumi, albume d'uovo, funghi, alga Spirulina, latticini e prodotti caseari (soprattutto il Parmigiano), carne, pesce, svolge importanti funzioni di ricostruzione dei tessuti, soprattutto muscolari, motivo per cui risulta particolarmente adatta nell'impiego sportivo, il suo rapido assorbimento intestinale la rende quasi immediatamente biodisponibile.
- **Istidina** (nono aminoacido considerato essenziali per i soggetti in crescita): in carne, pesce, frutti di mare, albume d'uovo, proteine della soia, precursore dell'istamina ed è pertanto

indicato nel trattamento di allergie, infiammazioni e patologie autoimmuni come l'artrite reumatoide, è inoltre un componente della carnosina che ha proprietà antiossidanti e anti-invecchiamento. Poiché pare intervenga nella dilatazione dei vasi sanguigni trova applicazione anche nell'ambito degli sport di resistenza.

Leucina, Isoleucina e Valina vengono ulteriormente classificati come *aminoacidi essenziali ramificati* (BCAA – Branched-Chain Amino Acid) per la loro tipica struttura chimica. Trovano ampia applicazione **in** ambito sportivo in quanto, diversamente dagli altri aminoacidi, essi, dopo essere stati assorbiti nell'intestino tenue, non devono essere metabolizzati dal fegato ma, veicolati dal sangue, vengono captati direttamente dai muscoli, dove possono essere utilizzati per fini plastici (ricostruzione/riparazione, costruzione e accrescimento del tessuto), anticatabolica (favoriscono l'adattamento progressivo del muscolo agli stimoli dell'allenamento contrastando anche la formazione dell'acido lattico) ed energetica.

Due aminoacidi vengono definiti *aminoacidi semi-essenziali* in quanto l'organismo li sintetizza a partire da aminoacidi essenziali e sono:

- Cisteina, sintetizzata a partire dalla metionina, riveste un ruolo importante nei processi di assorbimento delle proteine e della cheratinizzazione. Soggetti con carenza di vitamina B e/o affetti da alcolismo possono manifestarne una carenza. Inoltre sempre dalla metionina deriva quello che viene considerato il 23esimo aminoacido ossia la N-formilmetionina.
- Tirosina, sintetizzata a partire dalla fenilalanina, è imprescindibile nella formazione di neurotrasmettitori quali dopamina, adrenalina e noradrenalina (fondamentali per le capacità adattive dell'organismo, soprattutto in situazioni stressogene) ed è coinvolta nella produzione degli ormoni tiroidei e della melanina.

Si definiscono *aminoacidi condizionatamente essenziali* in quanto in determinate condizioni fisiopatologiche l'organismo non riesce a sintetizzarle del tutto o in quantità sufficiente e sono i seguenti cinque: arginina, glicina, glutamina, prolina e taurina.

La loro funzione è necessaria al corretto svolgimento delle attività di omeostasi.

Tutti gli altri sono definiti *aminoacidi non essenziali* poiché l'organismo è sempre in grado di sintetizzarli **autonomamente** e sono: acido aspartico, acido glutammico, alanina, arginina, asparagina, glicina, glutamina, prolina, serina.

Il nostro organismo infatti ne produce in quantità diverse e variabili in base al proprio fabbisogno. Essi intervengono sostanzialmente nella sintesi proteica con riflessi in innumerevoli funzioni quali ad es. memoria, apprendimento, difese immunitarie, anti-invecchiamento precoce.

I 20 amminoacidi standard possono inoltre essere suddivisi in base alle *proprietà chimiche* ossia alla carica e alla polarità delle loro catene laterali (gruppi R):

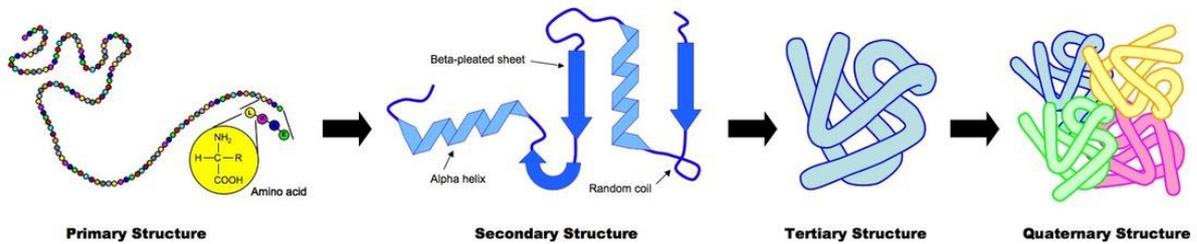
- neutri apolari: alanina, fenilalanina, glicina, isoleucina, leucina, metionina, prolina, triptofano, valina;
- neutri polari: asparagina, glutammina, serina, treonina, cisteina, tirosina;
- carichi acidi: aspartato, glutammato;
- carichi basici: arginina, istidina, lisina.

In biochimica ci si riferisce più spesso agli *L- α -amminoacidi* di formula generica $\text{NH}_2\text{CHR}\text{COOH}$ in cui il gruppo amminico e carbossilico sono legati allo stesso atomo di carbonio (definito per questo carbonio α) in configurazione stereoisomerica L.

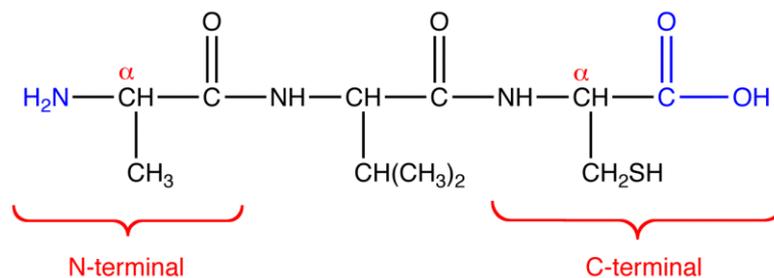
E' possibile schematicamente suddividere la complessa struttura molecolare delle proteine in 4 livelli di organizzazione:

- 1) **Struttura Primaria**, costituita dalla sequenza degli aminoacidi che la compongono- Le strutture primarie sono rette da legami peptidici covalenti, che si vengono a creare durante il processo di traduzione, tra il gruppo carbossilico di un aminoacido e quello amminico dell'aminoacido seguente fino a formare un polipeptide;
- 2) **Struttura Secondaria**, data dalla disposizione tridimensionale a livello locale del filamento polipeptidico. Le forme più diffuse sono ad Alfa elica (dovuta legami idrogeno all'interno della stessa catena) e quella a Beta foglietto o β -Sheet (dovuta a legami idrogeno tra più filamenti beta adiacenti ossia **catene** polipeptidiche di 3-10 aminoacidi con conformazione estesa) o segmenti di catena che assumono una forma non stabile.
- 3) **Struttura Terziaria**, data dalla struttura tridimensionale globale del filamento. La struttura terziaria è sorretta primariamente da interazioni idrofobiche, da legami idrogeno, interazioni ioniche e ponti disolfuro;
- 4) **Struttura Quaternaria**, rappresentazione 3D tipica delle proteine multimeriche, ossia proteine formate da più catene polipeptidiche (subunità) ciascuna con la propria struttura primaria, secondaria e terziaria (es. emoglobina formata da due catene alfa e due beta). I

legami chimici coinvolti nella formazione della struttura quaternaria sono a idrogeno, forze di Van der Waals (deboli forze intramolecolari fra bipoli) e i ionici.



Le due terminazioni delle catene amminoacidiche sono definite “terminazione carbossilica” (C-terminale) e “terminazione amminica” (N-terminale) e sono basate sulla natura dei gruppi liberi (alfa) delle due estremità.



Traduzione

Ogni tripletta di basi azotate (identificate con una lettera dell’alfabeto) del codice mRNA (codone) specifica un solo aminoacid., Esso viene letto in modo continuo (senza segni di interruzione) in gruppi successivi di tre nucleotidi senza sovrapposizioni. Specifici meccanismi cellulari assicurano che la traduzione inizi nel punto corretto del mRNA. Il codice mRNA contiene infatti dei segnali di inizio (*codoni di inizio o consenso*) e di fine (*codoni di stop o nonsense*) traduzione e quindi sintesi proteica. Tutti i codoni che specificano per aminoacidi vengono denominati codoni consenso, il codone AUG (che specifica per la metionina) è il più comune codone di inizio della sintesi proteica. Dei 64 codoni esistenti, 61 codificano per gli aminoacidi mentre gli altri tre (UAG o codone Ambra, UAA o codone Ocra, UGA o codone Opale) specificano la fine del processo di traduzione di una catena polipeptidica in quanto non esistono per essi tRNA con l’anticodone appropriato; pertanto vengono denominati codoni stop o nonsense. In presenza di particolari segmenti di mRNA, il codone UGA e il codone UAG

possono codificare rispettivamente la selenocisteina (ventunesimo amminoacido conosciuto) e la pirrolisina ,(ventiduesimo amminoacido).

Poiché le possibili combinazioni di triplette sono maggiori rispetto al numero degli amminoacidi, codoni differenti possono codificare per lo stesso amminoacido; ciò conferisce al codice la caratteristica della ridondanza o degenerazione. Il codice è quindi *degenerato* (ridondante), in quanto a ogni amminoacido corrisponde più di un codone ma secondo schemi precisi es. se in codoni diversi i primi due nucleotidi coincidono mentre il terzo è U o C, essi il più delle volte specificano lo stesso amminoacido. La degenerazione risulta essere un sistema di difesa dalle mutazioni puntiformi qualora esse colpiscano la terza base, in tal caso infatti la sintesi proteica può rimanere intatta.

Al contempo il codice genetico è *privo di ambiguità* in quanto difficilmente un codone specifica per più di un amminoacido, tranne in rari casi in cui si ha una variazione sito specifica nella traduzione. Ad esempio GUG funge da codone di inizio per la metionina, se però esso si trova in qualsiasi altro punto della sequenza codificante specifica per una valina.

Ciascun amminoacido inoltre è codificato dalle stesse triplette in ogni organismo vivente studiato con piccole eccezioni per protozoi unicellulari e mitocondri (es. l'amminoacido lisina è codificata da AAA o AAG negli mRNA di tutti gli organismi). Il codice è quindi quasi universale.

Un'altra caratteristica del codice genetico è il **il** *“vacillamento dell'anticodone”* intendendo con ciò che la base al 5' terminale dell'anticodone (complementare alla base al 3' terminale del codone), a differenza delle prime due basi, può appaiarsi con tre basi differenti presenti al 3' del codone. Pertanto esistono 61 codoni consenso che specificano amminoacidi nel mRNA, i quali in teoria potrebbero essere letti da meno di 61 tRNA per via del vacillamento nell'anticodone.

	U	C	A	G	
U	UUU phe	UCU ser	UAU tyr	UGU cys	U
	UUC	UCC	UAC	UGC	C
	UUA leu	UCA	UAA STOP	UGA STOP	A
	UUG	UCG	UAG STOP	UGG trp	G
C	CUU leu	CCU pro	CAU his	CGU arg	U
	CUC	CCC	CAC	CGC	C
	CUA	CCA	CAA gln	CGA	A
	CUG	CCG	CAG	CGG	G
A	AUU ile	ACU thr	AAU asn	AGU ser	U
	AUC	ACC	AAC	AGC	C
	AUA	ACA	AAA lys	AGA arg	A
	AUG met	ACG	AAG	AGG	G
G	GUU val	GCU ala	GAU asp	GGU gly	U
	GUC	GCC	GAC	GGC	C
	GUA	GCA	GAA glu	GGA	A
	GUG	GCG	GAG	GGG	G

La *sintesi proteica* avviene nei ribosomi, dove il messaggio contenuto in codice nel mRNA viene tradotto in direzione 5'-3' così come viene trascritto; il polipeptide viene sintetizzato a partire dall'estremità N-iniziale e finisce con quella C-terminale.

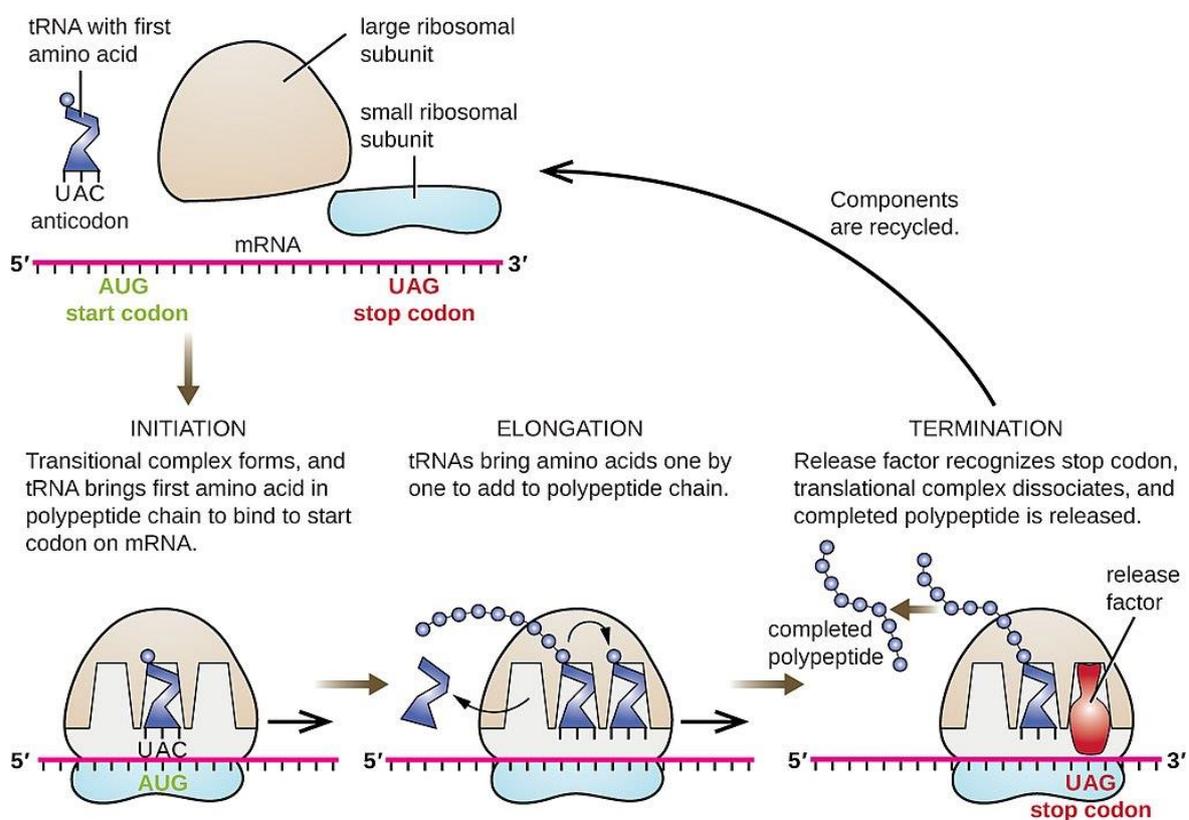
Ogni aminoacido arriva al ribosoma legati in maniera specifica al proprio tRNA, quindi la sequenza corretta di aminoacidi si ottiene grazie al legame specifico tra il codone dell'mRNA e l'anticodone complementare del tRNA. La specificità del riconoscimento del codone risiede nella molecola del tRNA (nel suo anticodone) e non nell'aminoacido da essa trasportato.

Il “caricamento” dell'aminoacido al proprio tRNA a formare una molecola chiamata *aminoacil-tRNA* (o tRNA carico) richiede energia fornita da ATP e avviene mediante un legame, tra il gruppo carbossilico dell'aminoacido e il gruppo 3'-OH o 2'-OH del ribosio dell'adenina che si trova alla fine di ogni tRNA, catalizzato dall'enzima aminoacil-tRNA sintetasi altamente specifico ossia uno per ogni aminoacido (pertanto vengono commessi errori solo 1 su 10.000-100.000 reazioni).

Dato che la degenerazione del codice è largamente presente, tutti i tRNA specifici per un dato aminoacido devono possedere un sito di riconoscimento comune per l'aminoacil-tRNA sintetasi specifica per quel determinato aminoacido.

Il processo di sintesi di una proteina avviene in tre fasi simili in cellule procariote ed eucariote:

1. Inizio della traduzione;
2. Allungamento della catena polipeptidica;
3. Terminazione della traduzione.



Inizio della traduzione

Parte con il codone di inizio (codone consenso) AUG del mRNA che codifica per una metionina - Met (solo raramente vi è la tripletta GUG come codone d'inizio) che rappresenterà quindi l'aminoacido N-terminale. Nei procarioti la metionina è formilata (presenta l'aggiunta di un gruppo formile al gruppo amminico), quindi il loro codone di inizio specifica per una formilmetionina (fMet). Per l'inizio della traduzione viene utilizzato quindi uno speciale t-RNA Met (tRNA iniziatore) diverso da quello impiegato per la lettura dei codoni AUG situati in altri punti della molecola di mRNA. Il primo passo è rappresentato dal legame tra il fattore di inizio degli eucarioti eIF4A (multimero di numerose proteine tra cui CBP - Cap Binding Protein) e

l'mRNA. Dopo il riconoscimento del cap in 5', si lega al mRNA un complesso formato dalla subunità minore dei ribosomi e alcuni fattori di inizio (eIF, Guanosina Trifosfato - GTP e Met-tRNA). Tale complesso migra lungo l'mRNA alla ricerca del codone di inizio AUG che è inserito in una breve sequenza segnalatrice detta, sequenza di Kozak. Questo modello d'inizio è noto come "modello a scansione, il codone AUG risulta essere quasi sempre il primo codone AUG a partire dall'estremità 5. Una volta trovato il codone d'inizio la sub-unità ribosomiale minore (40S) e successivamente quella maggiore (60S) si legano al mRNA mentre vengono rilasciati tutti gli eIF; si forma così il complesso di inizio (80 S). Il ribosoma negli eucarioti e nei procarioti possiede due siti per gli aminoacil-tRNA (tRNA carichi): un sito aminoacilico indicato con **A** e un sito peptidico indicato con **P**.

Allungamento della catena polipeptidica

Si compone di tre passaggi:

- Legame dell'aminoacil tRNA (tRNA carico) al ribosoma, il primo tRNA-Met (tRNA iniziatore) si lega al codone d'inizio AUG mediante legami idrogeno nel sito P del ribosoma. L'orientamento di questo complesso tRNA-codone porta il codone successivo dell'mRNA a trovarsi esposto sul sito A del ribosoma; a questo punto la molecola seguente di aminoacil-tRNA, insieme ad alcuni fattori proteici di allungamento e alla GTP, viene condotto al ribosoma e si lega, tramite il proprio anticodone, al codone del mRNA esposto nel sito A.
- Formazione del legame peptidico, il ribosoma presenta quindi i due aminoacil-tRNA in posizione corretta perchè si possa formare il legame peptidico tra i due aminoacidi. Si ha la rottura del legame tra il gruppo carbossilico dell'aminoacido e il tRNA nel sito P, la metionina libera si lega mediante legame peptidico al secondo aminoacido situato nel sito A grazie all'enzima peptidil transferasi. Sul sito P quindi rimane un tRNA scarico e sul sito A un peptidil tRNA legato ai primi due aminoacidi della catena polipeptidica nascente.
- Traslocazione, consiste nel movimento del ribosoma lungo l'mRNA, un codone alla volta. Una volta formato il legame peptidico tra i due aminoacidi e la catena polipeptidica in formazione si trova sul tRNA nel sito A, il ribosoma si sposta lungo l'mRNA di un codone in direzione 3'. E' stato proposto un nuovo modello che coinvolge un terzo sito, il sito E. In questo caso il tRNA scarico si sposta dal sito P sul sito E bloccando il legame del successivo aminoacil tRNA sul sito A che rimane libero di accogliere un nuovo aminoacil -tRNA che porta l'anticodone corretto ad appaiarsi al codone esposto dell'mRNA.

L'avanzamento di ogni tRNA attraverso il ribosoma può essere così schematizzato: **citoplasma** → **sito A** → **sito P** → **sito E** → **citoplasma** (a eccezione del tRNA iniziatore, che si attacca direttamente al sito P e non transita mai in A). Tale processo si ripete fino a che la traduzione termina una volta aggiunto un codone di stop.

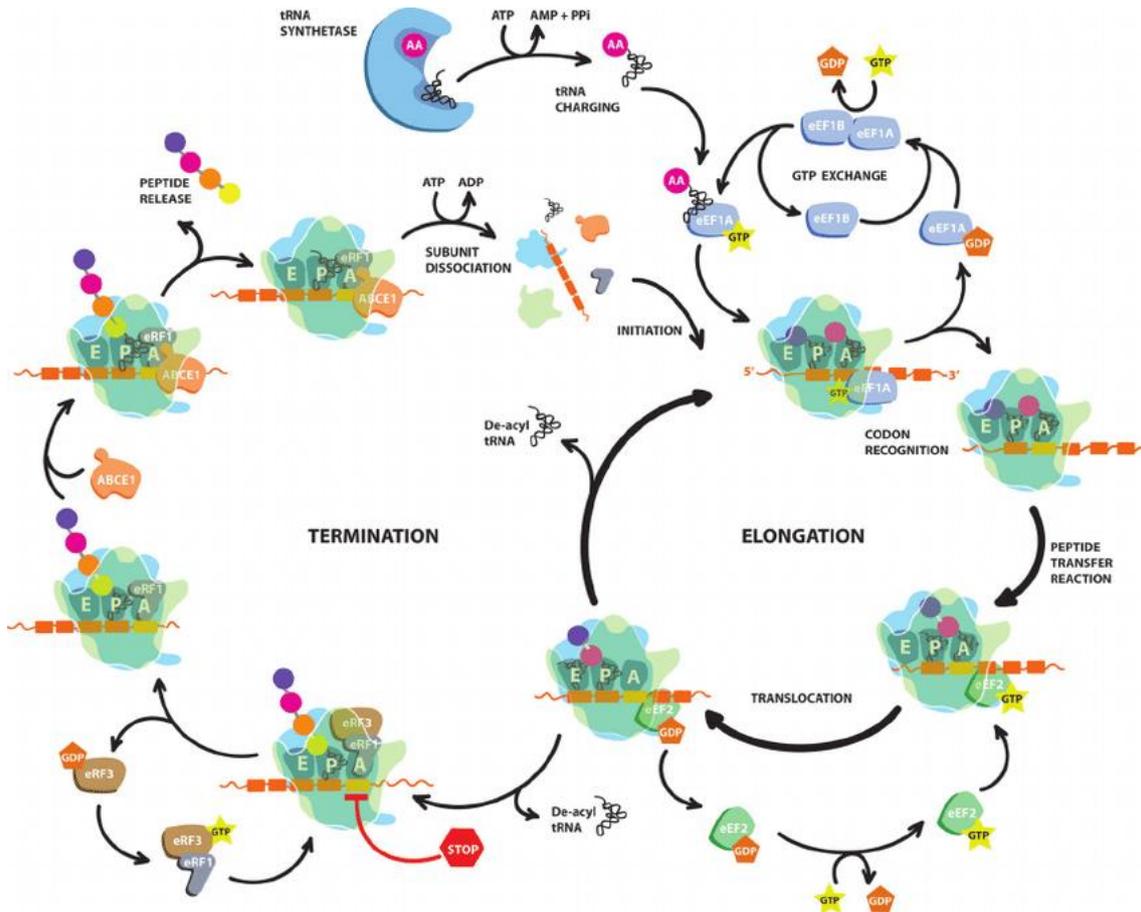
Terminazione

L'allungamento della catena polipeptidica continua finché viene terminato il polipeptide codificato dal mRNA. Tale completamento viene segnalato nel mRNA da uno dei codoni di stop (UAG, UAA, UGA).

Il ribosoma è in grado di riconoscere i codoni di stop solo grazie all'intervento di proteine specifiche dette *fattori di rilascio RF* (Releasing Factor), che riconoscono i codoni di stop (negli eucarioti è l'eRF che riconosce tutti e tre i codoni di stop) e danno il via agli eventi specifici di terminazione della traduzione:

- rilascio del polipeptide dal tRNA al sito P del ribosoma;
- rilascio del tRNA dal ribosoma;
- dissociazione delle due sub-unità ribosomiali dall'mRNA.

Il ribosoma incontra il codone di stop grazie all'aiuto del legame col fattore di rilascio eRF che innesca una serie di eventi specifici che conducono alla separazione dei vari componenti e quindi al rilascio del polipeptide completato: il polipeptide e il proprio tRNA sono rilasciati dal ribosoma e quest'ultimo si stacca dal mRNA. Successivamente gli aminoacidi iniziali (Met negli eucarioti e fMet nei procarioti) vengono poi rimossi dal polipeptide e il processo di traduzione risulta così quindi terminato, la proteina è pronta a esplicare la sua funzione.

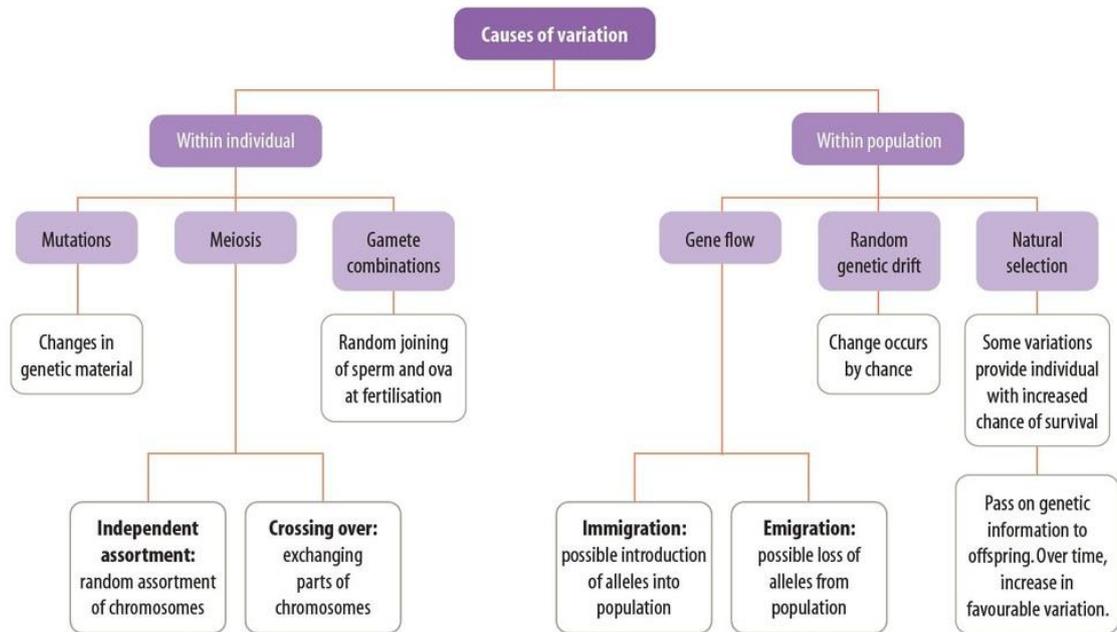


Più ribosomi possono tradurre contemporaneamente per lo stesso mRNA (*poliribosomi* formati da 8-10 ribosomi), ciò permette di riprodurre una quantità elevata della stessa proteina.

Variabilità genetica: Mutazioni

Introduzione

Grazie al Progetto Genoma Umano sappiamo che è solo una differenza dello 0,1% del DNA a determina la variabilità della popolazione. Questo 0.1% è responsabile della variabilità fenotipica e determina una risposta individuale all'ambiente.



Con il termine *mutazione* ci si riferisce a delle variazioni stabili ed ereditabili del materiale genetico (in termini di struttura o nr. dei cromosomi), che possono avere effetti positivi o negativi. Sono più frequenti di quanto si pensasse, possono avvenire spontaneamente o indotte da vari agenti mutageni (fisici, chimici, ambientali).

Considerando che il DNA umano contiene circa 3 miliardi di coppie di basi non sorprende il che quando in una cellula questa enorme quantità di dati viene copiata vengano introdotti degli errori. Al contempo innumerevoli sono gli agenti mutageni con cui in vario modo veniamo in contatto. A differenza di quelle indotte, le *mutazioni spontanee* sono molto rare ma sono le più importanti nel processo evolutivo. Le mutazioni spontanee avvengono a seguito di errori che “sfuggono” ai meccanismi riparatori: durante la replicazione del DNA, nel crossing-over della meiosi, per destabilizzazione propria (forma vacillante delle basi) o causata dagli elementi trasponibili (trasposomi).

Le mutazioni che avvengono nelle cellule da cui ha origine una nuova vita (cellule germinali) sono chiamate *mutazioni germinali* e sono le uniche possono essere trasmesse mediante i gameti alla progenie e si originando un individuo mutato sia nelle cellule somatiche sia in quelle germinali. Le mutazioni che avvengono in qualunque altra cellula del corpo (cellule somatiche) si definiscono *mutazioni somatiche* e non sono ereditabili.

Le mutazioni sono responsabili della variabilità degli esseri viventi, all'interno delle popolazioni, senza la quale tutti gli individui sarebbero uguali tra loro.

Il *tasso di mutazione* indica la velocità con cui si verifica una determinata classe di mutazioni (es. mutazioni spontanee) in funzione del tempo (considerando come unità di tempo la generazione) ed è calcolata come frazione del numero di mutazioni di coppie di basi o gene o genoma per generazione. Indica la probabilità che una mutazione si verifichi nel tempo; nell'uomo il tasso di mutazione spontanea per un singolo gene è $10^{-4} - 10^{-5}$ / gene / generazione. La *frequenza di mutazione* indica il numero di eventi di una specifica mutazione all'interno di una popolazione nel momento dell'osservazione espresso come nr. di cellule o di individui mutati per il nr. che compone la relativa popolazione.

Possiamo dividere le mutazioni in:

- *Macro-mutazioni o aberrazioni cromosomiche* o macrolesioni, consistono in una variazione della struttura generale o del numero dei cromosomi (mutazioni strutturali e numeriche) che possono arrivare a interessare l'intero genoma (mutazioni genomiche).
- *Micro-mutazioni (mutazioni puntiformi)* o microlesioni, sono mutazione geniche (relative a un gene) causate dalla alterazione nella composizione delle basi azotate. La gravità dell'eventuale danno provocato dipende dai cambiamenti a carico delle proteine prodotte.

Mutazioni cromosomiche

Le *mutazioni strutturali* dei cromosomi comportano dei cambiamenti a carico dell'intero cromosoma o parte di esso (es. mutazioni geniche) senza implicare variazioni del numero dei cromosomi o di interi assetti cromosomici di un genoma.

Sono modificazioni che originano da una o più rotture determinando la formazione di estremità tronche senza telomeri. Ciò rende tali segmenti "appiccicosi" (possono quindi attaccarsi all'altro troncone o alle estremità normali di altri cromosomi) ed esposti all'attività di degradazione operata dalla esonucleasi.

Si distinguono in:

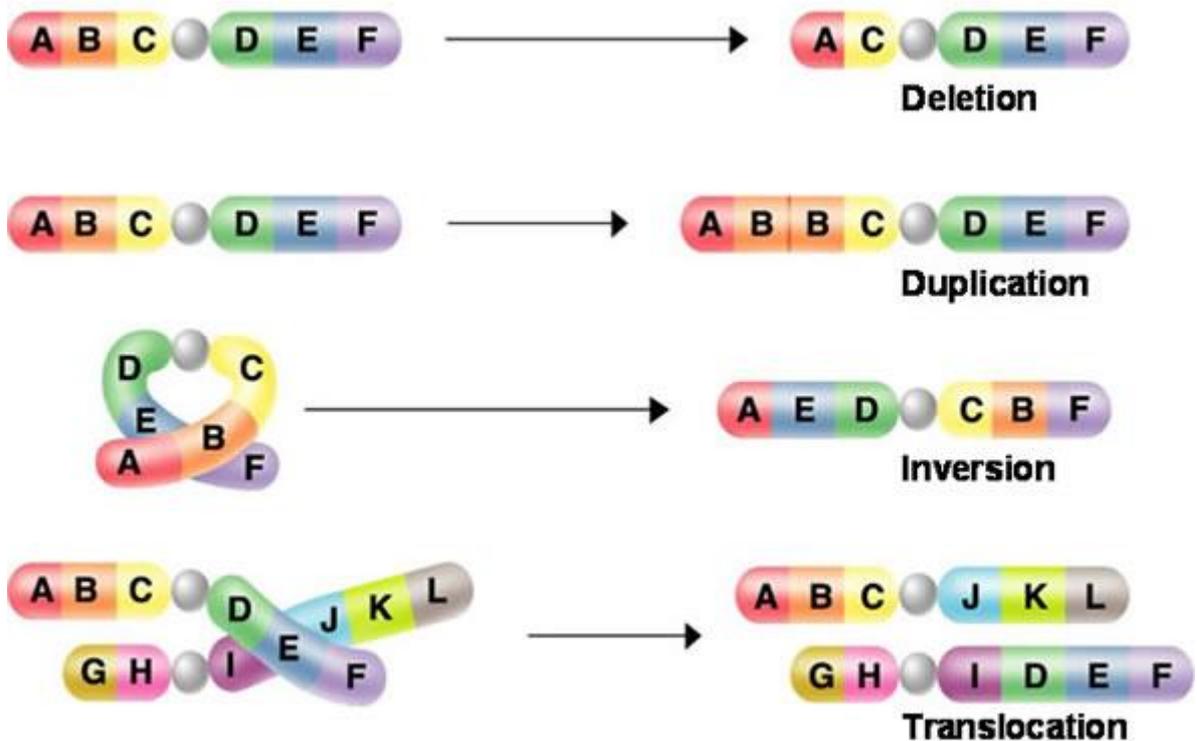
- **Delezione**, perdita irreversibile (a differenza delle altre) di un tratto di un cromosoma in seguito a una rottura che può essere indotta da diversi agenti eziologici (temperatura, radiazioni in particolare quelle ionizzanti, sostanze chimiche, microrganismi, errori nella ricombinazione. Si definisce **deficienza terminale** la delezione che avviene all'estremità del cromosoma (una rottura), **deficienza intercalare** (la più comune) quando

la delezione avviene all'interno del cromosoma (due rotture). Le conseguenze delle mutazioni per delezione dipendono dai geni interessati. Negli organismi diploidi gli effetti sono di norma attenuati per la presenza sul cromosoma omologo di una copia dei geni mancanti. Però se nel cromosoma omologo si hanno ad esempio dei geni recessivi portatori di effetti deleteri, le conseguenze possono essere anche molto gravi. Con *pseudodominanza* si definisce la delezione di un allele dominante in un eterozigote rende manifesto a livello fenotipico l'allele recessivo. Se la delezione riguarda il centromero determinerà un cromosoma acentrico con conseguente perdita dal genoma dell'intero cromosoma. Nell'uomo le delezioni di tratti cromosomici sono spesso causa di molte malattie negli eterozigoti mentre negli omozigoti una delezione è piuttosto estesa può risultare letale (es. la malattia Cri-du-chat causata dalla delezione di una parte del braccio corto del cromosoma 5). È possibile individuare le delezioni tramite l'analisi del cariotipo;

- Duplicazione, raddoppio reversibile di un tratto di un cromosoma che si verifica quando un suo frammento si lega all'omologo causando una doppia presenza di geni per lo stesso locus. Un evento che può causare l'insorgenza di duplicazioni è il *crossing-over ineguale*, che avviene quando l'appaiamento fra omologhi riguarda un tratto ripetuto causando un piccolo sfalsamento nell'appaiamento dei cromosomi omologhi durante la meiosi in grado di dare origine a gameti con una duplicazione o una delezione. Di norma esistono tre tipi di duplicazioni: tandem (tratti duplicati disposti l'uno vicino all'altro), tandem inversa (ordine dei geni nel segmento duplicato risulta al contrario di quello originale), tandem terminali (segmenti duplicati posti su una delle estremità del cromosoma). Le duplicazioni hanno svolto un ruolo fondamentale nello sviluppo delle famiglie geniche, insieme di geni correlati che si sono evoluti da un gene ancestrale comune mediante il processo di duplicazione allelica e che codificano per un gruppo di proteine che, a loro volta, si sono altamente conservate nel corso dell'evoluzione e svolgono funzioni simili (es. famiglia dei geni globinici, che codificano le catene polipeptidiche dell'emoglobina);
- Inversione; cambiamento reversibile nella disposizione di un tratto cromosomico che si stacca, ruota di 180° e si riunisce al resto del cromosoma (come risultato l'ordine dei geni risulta invertito). Se l'inversione comprende il centromero è detta inversione pericentrica mentre quando il segmento invertito si trova su un braccio del cromosoma è detta inversione paracentrica. Nelle inversioni il materiale genetico non viene perduto ma possono esserci delle conseguenze fenotipiche quando i punti di inversione (punti di

rottura) sono all'interno di un gene o in regioni che controllano l'espressione di un gene alterandola. Esse variano fra omozigote ed eterozigote. Nell'inversione omozigote la meiosi avviene senza problemi di duplicazioni o delezioni, nell'eterozigote un crossing-over può portare a gravi conseguenze genetiche. I cromosomi omologhi infatti tentano di appaiarsi con la maggiore corrispondenza possibile tra le basi; ma a causa del tratto invertito su un omologo, l'appaiamento richiede la formazione *anelli o anse di inversione* (comprendono i tratti invertiti) e i gameti risultanti da cromatidi ricombinanti in tali regioni non sono vitali (a causa dello sbilanciamento dei geni); se invece non si ha crossing-over nell'anello tutti i gameti risultanti sono vitali e avranno un corredo cromosomico completo (due con l'ordine normale, e due con l'ordine invertito).

- Traslocazione, modifica reversibile della posizione di un segmento cromosomico a seguito di una insolita alterazione della loro forma (non vi è perdita o aumento di materiale genico). Possiamo distinguerne due tipi: intracromosomica (spostamento di un tratto di cromosoma all'interno dello stesso cromosoma) e intercromosomica (spostamento di un tratto da un cromosoma all'omologo). Se lo spostamento tra gli omologhi avviene in un'unica direzione si parla **di** traslocazione non reciproca, se in entrambe le direzioni traslocazione reciproca. Negli omozigoti le traslocazioni reciproche sembrano essere le più frequenti, la meiosi avviene normalmente. Negli eterozigoti per traslocazioni reciproche invece le diverse parti di cromosomi omologhi si appaiano come meglio riescono e nella meiosi durante la profase risulta una configurazione a croce con formazione di solo due gameti vitali, per cui tale situazione è denominata semisterilità.



Le *mutazioni cromosomiche numeriche* (definite anche in maniera meno corretta mutazioni genomiche) possono interessare uno o più cromosomi interi (aneuploidia o eteroploidia) o l'intero assetto cromosomico (euploidia).

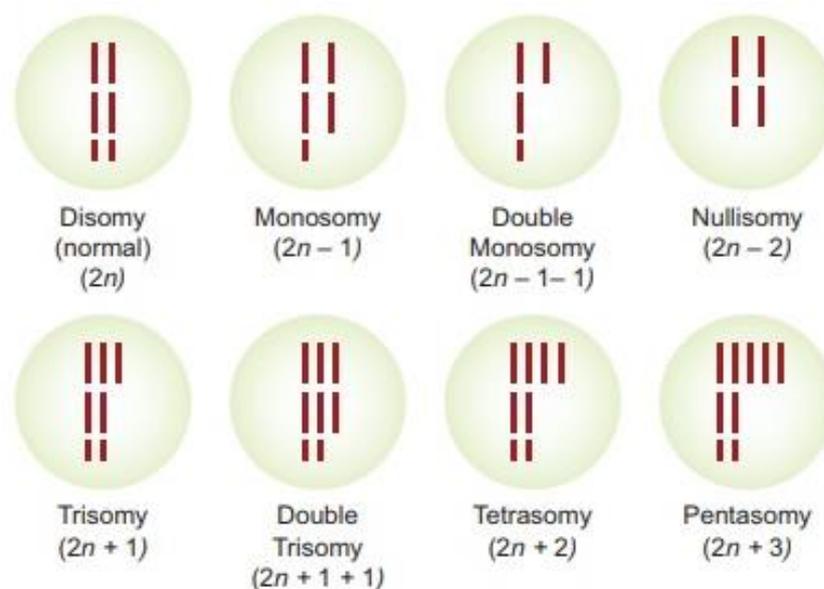
Un organismo eucariotico può andare incontro a delle mutazioni che portano a variazioni del numero di interi cromosomi o di sue parti di causando una condizione è chiamata *aneuploidia* o *eteroploidia* a sua volta suddivisa in iperploidia e ipoploidia. La causa più comune è la non-disgiunzione di una o più coppie di cromosomi omologhi o cromatidi fratelli durante la meiosi I o la meiosi II, che nella maggior parte degli animali risulta letale.

Negli organismi diploidi vi sono cinque differenti categorie di variazioni aneuploidi:

Nullisomia ($2n-2$), ipoploidia con perdita di due cromosomi omologhi in seguito a non disgiunzione alla meiosi dello stesso cromosoma in entrambi i genitori, da ciò deriva un gamete privo di copie di quel cromosoma.

1. Monosomia ($2n-1$), ipoploidia con perdita di un solo cromosoma in seguito a una non disgiunzione alla meiosi in un genitore che origina un gamete privo di copie di quel cromosoma e una copia di tutti gli altri. La perdita di due (come nel mais) o tre cromosomi singoli viene definita rispettivamente monosomia doppia ($2n-1-1$) e tripla ($2n-1-1-1$).

2. Trisomia ($2n+1$), iperplodia che si verifica quando una non disgiunzione alla meiosi in un genitore porta alla produzione di un gamete con due copie dello stesso cromosoma e una di tutti gli altri, si hanno quindi tre copie dello stesso cromosoma e due di tutti gli altri. In taluni casi si ha l'aggiunta di 2 copie del cromosoma e pertanto una trisomia doppia ($2n+1+1$).
3. Tetrasomia ($2n+2$), rara iperplodia in seguito a una non disgiunzione dello stesso cromosoma alla meiosi di entrambi i genitori, ciascuno dei quali origina due copie di quel cromosoma e una di tutti gli altri, la cellula presenta quindi quattro copie di un determinato cromosoma e due copie di tutti gli altri.
4. Pentasomia ($2n+3$), iperplodia rara risultante in una aggiunta di tre cromosomi derivanti da altre coppie cromosomiche (genitori), la cellula possiede cinque copie di quel cromosoma e due degli altri.



Nell'uomo la monosomia per un autosoma si riscontra raramente mentre le trisomie degli autosomi sono responsabili di circa la metà delle anomalie cromosomiche che causano morte di norma molto precoce.

- Trisomia 21 (sindrome di Down), è la più comune tra le trisomie e l'unica in cui si ha sopravvivenza fino all'età adulta, presenta tre copie del cromosoma 21, un cromosoma molto piccolo e con pochi geni rispetto agli altri. Le cause che portano alla non disgiunzione rimangono ancora sconosciute ma la ricerca dimostra che il rischio che insorga questa sindrome aumenta con l'aumentare dell'età della donna. La copia parziale

o totale supplementare del cromosoma 21 deriva principalmente dalla madre e solo in ca. il 5% dei casi dal padre.

- Trisomia 13, caratterizzata dalla presenza di tre cromosomi 13 che causano la Sindrome di Patau i cui i soggetti in genere muoiono prima dei tre mesi di vita.
- Trisomia 18, si hanno tre copie del cromosoma 18 che causano la Sindrome di Edwards principalmente in bimbe (ca. 80% dei casi), il 90 % muore entro i 6 mesi di vita.

L'aneuploidia (eteroploidia) dei *cromosomi sessuali* è molto più frequente di quella degli autosomi per via del meccanismo di “compensazione di dose” che inattiva i cromosomi X in eccesso. Rientrano fra le aneuploidie dei cromosomi sessuali:

- Trisomia X, detta anche Sindrome della superfemmina (XXX), donne con arti lunghi e QI nella media.
- Sindrome 47, XYY o **sindrome** di Jacobs o disomia del cromosoma Y detta anche sindrome del supermaschio in quanto con altezza media 188 cm, lieve ritardo mentale, spesso con denti e relative radici grandi ma con livelli di testosterone normali.
- Sindrome di Klinefelter (47, XXY) che comporta disturbi dell'apprendimento, arti lunghi, testicoli piccoli e sterilità.
- Monosomia (45, X0) o sindrome di Turner, le conseguenze variano tra più comuni sono collo corto e con pterigium colli (piega cutanea che si estende dal margine laterale del collo alle spalle), attaccatura delle orecchie bassa, bassa attaccatura dei capelli nella parte posteriore del collo, bassa statura e mani e piedi gonfi.

Quando una cellula o un organismo è caratterizzato da un numero di assetti cromosomici pari o multiplo esatto del corredo aploide (n) si parla di *euploidia* (x , $2n$, $3n$, $4n$). Le condizioni aploide (n) e diploide ($2n$) si verificano regolarmente una in seguito all'altra e lo stesso numero di cromosomi viene mantenuto di generazione in generazione. Le mutazioni invece che interessano il numero di interi assetti cromosomici risultano solitamente letali nella maggior parte di specie animali, Possiamo distinguerle in:

- Monoploidia (x), l'individuo normalmente diploide presenta un solo assetto cromosomico. La condizione di monoploidia differisce da quella naturale di aploidia (n) in quanto si verifica quando un organismo è in condizione di poliploidia. Un monoploide può essere un aploide in un vero diploide ossia quando sia il numero di cromosomi monoploide sia aploide sono uguali.

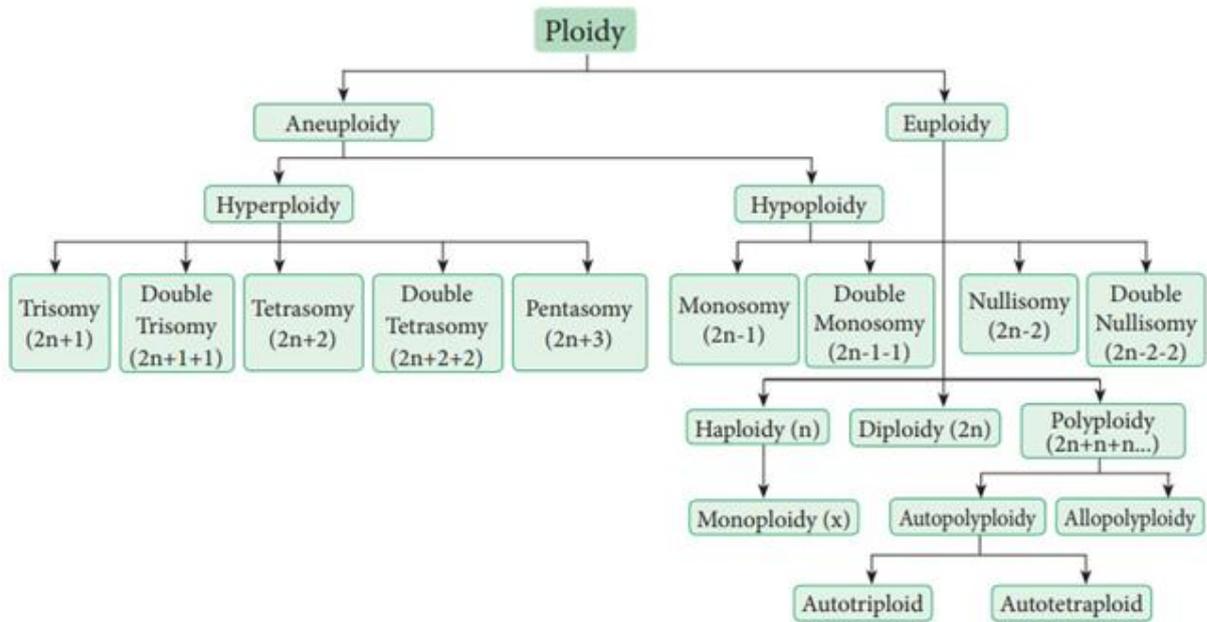
- Poliploidia ($2n + n + n$), l'individuo presenta un numero di assetti cromosomici superiore al normale sempre a seguito di una non disgiunzione dei cromosomi. Quando ci sono tre, quattro, cinque o sei serie di cromosomi di base, vengono chiamati rispettivamente triploidia (3x) tetraploidia (4x), pentaploidia (5x) ed esaploidia (6x). In generale la poliploidia è molto comune nelle piante (in cui ha rappresentato un fattore importante nell'origine di nuove specie) e più rara negli animali nei quali un livello di ploidia più alto porta alla morte. Le poliploidie si dividono a loro volta in poliploidie con un numero di assetti cromosomici parie dispari. I poliploidi con assetti pari hanno maggiori probabilità di essere almeno parzialmente fertili in quanto c'è la possibilità che i cromosomi omologhi si appaino durante la meiosi.

Se la non disgiunzione avviene durante la meiosi I, metà dei gameti non avrà alcun assetto cromosomico mentre l'altra metà ne avrà due. Se la non disgiunzione avviene alla meiosi II, due gameti avranno due assetti cromosomici, uno un solo assetto e uno nessuno. La fusione di un gamete con due assetti cromosomici con uno con assetto normale genera uno zigote con tre assetti quindi triploide. La fusione tra due gameti con due assetti cromosomici ciascuno, origina uno zigote tetraploide.

Da uova non fecondate infine si originano in genere Individui monoploidi

Nelle *specie vegetali* troviamo due tipi di poliploidia:

- 1) Autopoliploidia, l'organismo possiede più di due serie aploidi di cromosomi derivati dalla stessa specie e possono a loro volta essere autotriploidi (con tre serie di propri genomi, possono essere prodotti artificialmente e sono altamente sterili a causa della formazione di gameti difettosi, esempi banane coltivate sono generalmente triploidi e sono prive di semi con frutti più grandi dei diploidi, anguria senza semi, mela, barbabietola da zucchero, pomodoro) e autotetraploidi (con quattro copie del proprio genoma, possono essere indotti raddoppiando i cromosomi di una specie diploide, esempi segale, uva, erba medica, arachidi, patate e caffè).
- 2) Allopoliploidia, l'organismo possiede due o più serie fondamentali di cromosomi derivati da due specie differenti ma strettamente imparentate e può essere sviluppato da incroci interspecifici e la fertilità viene ripristinata mediante il raddoppio dei cromosomi con il trattamento con colchicina.



Le mutazioni cromosomiche nell'uomo causano circa la metà di aborti spontanei e morti neonatali, inoltre pare che circa il 15% delle fecondazioni porti mutazioni cromosomiche e che l'11% circa dei maschi con gravi problemi di infertilità siano portatore di mutazioni cromosomiche. Nell'uomo inoltre un certo numero di tumori è associato a mutazioni cromosomiche, sia per quanto riguarda il numero dei cromosomi, dovuto a non disgiunzione o ad un cambiamento strutturale causato da delezioni, duplicazioni, inversioni o traslocazioni. Un esempio è la leucemia mieloide_cronica in cui una parte del braccio lungo del cromosoma 22 è traslocato sul cromosoma 9 e una piccola parte del cromosoma 9 risulta traslocata sul cromosoma 22. Si tratta di un tumore sempre fatale nel quale i geni oncogeni inducono la trasformazione incontrollata di una cellula differenziata in una cellula tumorale.

Molte informazioni che oggi abbiamo sulle variazioni della struttura dei cromosomi sono state possibili grazie al caratteristico bandeggio visibile al microscopio dei cromosomi politenici, cromosomi giganti presenti nelle cellule somatiche di alcuni insetti (es. *Drosophila melanogaster*), Sono cromosomi e derivanti da vari cicli di replicazione che producono molte copie (anche centinaia) di cromatidi fratelli che rimangono uniti; di consentono di aumentare il volume cellulare e il livello di espressione genica.

Mutazioni geniche

Una mutazione genica è una alterazione che riguarda *una o più copie di basi* di un singolo gene; ciò porta alla formazione di nuovi alleli detti alleli mutanti. Si ha quindi una

modificazione strutturale oltre che conseguentemente funzionale (fenotipo) del gene originario, detto selvatico o wild type, che da quel momento si replicherà nella forma mutata. I maggiori effetti si avranno se la mutazione avviene a carico dei geni che codificano per le proteine. Al contempo va considerato che tali mutazioni sono la maggior causa della variabilità della specie, fattore indispensabile per la sopravvivenza.

Alcuni geni mutano più frequentemente di altri e per questo sono detti instabili o mutabili. Sia le mutazioni geniche spontanee sia quelle indotte insorgono a causa di una variazione nella sequenza di basi del DNA.

Una mutazione genica avviene quindi a livello della sequenza di basi di un gene in un qualsiasi punto del DNA e si classificano in:

- 1) mutazioni *per sostituzione di base*;
- 2) mutazioni *per inserzione/delezione* dette anche mutazioni per scivolamento di fase o frameshift.

- 1) La mutazione per sostituzioni di base si definisce per transizione quando si ha la sostituzione di una purina con un'altra purina o di una pirimidina (T, C) con un'altra pirimidina, se invece una purina è sostituita da una pirimidina o viceversa si definisce per transversione. In genere le transizioni sono più frequenti delle transversioni. Tale mutazioni possono avvenire se ad esempio per un errato appaiamento durante la replicazione del DNA e si suppone che le basi subiscano un cambiamento tautomerico (a causa della leggera instabilità delle basi e della loro capacità di assumere forme rare): la nuova base si trova in una forma rara che forma dei legami idrogeno diversi e può determinare un appaiamento errato che origina, in seguito al ciclo replicativo successivo, un mutante. L'azione di correzione di bozze fa sì che molti appaiamenti errati vengano riconosciuti, excisi e sostituiti con le basi corrette. Non tutti sono d'accordo su questo modello della tautomeria come base delle mutazioni. Tramite le nuove tecniche di analisi strutturali basate su raggi X e spettroscopia NMR, si è infatti visto che le basi erroneamente appaiate si trovano in una forma normale (non in tautomerica) ma vacillante. Pertanto l'appaiamento avviene in maniera sbagliata per via di un alterato posizionamento spaziale degli atomi che formano i ponti idrogeno. Ciò sarebbe possibile grazie alla flessibilità della molecola del DNA e alle possibili conformazioni alternative delle basi. Inoltre nella *depurinazione* si ha rottura del legame tra la base azotata purinica e il deossiribosio e l'adenina o la guanina si stacca dal nucleotide creando un sito apurinico. Se tale danno non viene riparato durante la replicazione, in tale sito può essere inserita una base a caso che funge da nuovo stampo

dando origine a una coppia di basi con appaiamento errato e quindi a una mutazione. La *deamminazione* invece consiste nella perdita di un gruppo amminico di una base azotata che nel caso della Citosina la trasforma in Uracile. Il sistema di riparo agisce rimuovendo questi Uracile ma qualora ciò non accadesse, ciò fa sì che durante la replicazione al posto della coppia di basi pirimidiniche (Citosina-Guanina) venga inserita una coppia di basi puriniche (Timina-Adenina) per transizione.

- 2) Durante la replicazione del DNA avvengono spontaneamente delle inserzioni o delezioni di una o poche coppie di basi a causa di estrusioni erronee di basi di una o dell'altra elica di solito in corrispondenza di sequenze ripetute di una base; l'extrusione sull'elica stampo determina una mutazione per delezione, mentre sull'elica sintetizzata crea una mutazione per inserzione. Se la base o la sequenza inserita è identica a quella precedente, si parla di duplicazione. Se queste inserzioni/delezioni avvengono in un gene strutturale avremo delle *mutazioni frameshift* (scivolamento di fase) come risultato si ottiene uno scorrimento del modulo o cornice di lettura (frame) dal sito mutato in poi; si ha uno slittamento di lettura del mRNA di una base determinando l'incorporazione di un aminoacido errato nella proteina. Si usa però correntemente il termine frameshift anche quando le inserzioni/delezioni avvengono in siti non codificanti. Questo tipo di mutazioni risultano le più dannose proprio perchè comportano la perdita o l'aggiunta di uno-due nucleotidi.

Mutazioni puntiformi

Quando il cambiamento riguarda una o poche basi; si parla più propriamente di mutazioni puntiformi (point mutations) anche se attualmente si è soliti indicare come mutazioni puntiformi r quelle che coinvolgono 1-50 o anche più nucleotidi. Molte mutazioni puntiformi sono probabilmente senza effetto, in tal caso si dice che sono neutre, infatti gran parte del DNA in un genoma eucariotico non codifica prodotti proteici ed è incerto se il cambiamento di una singola base nucleotidica in tale regione possa influire sulla salute di un organismo. Una singola mutazione puntiforme può però avere un notevole impatto sul fenotipo come accade ad esempio nell'anemia falciforme.

Le mutazioni puntiformi possono essere definite anche dal tipo di variazione che possono causare nella sequenza amminoacidica di una proteina:

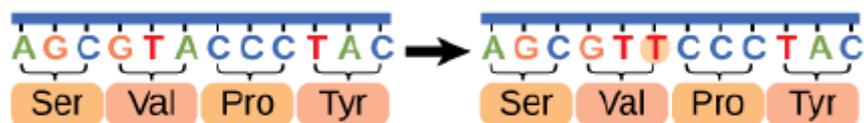
- Mutazioni missenso non conservativo, la sostituzione di una base azotata causa un cambiamento nel codone del mRNA per cui nella sequenza amminoacidica del relativo polipeptide. Tale mutazione se avviene in un punto critico della catena polipeptidica,

l'attività della proteina può risultare ridotta o addirittura inattiva e dare origine a patologie gravi (es. anemia falciforme).

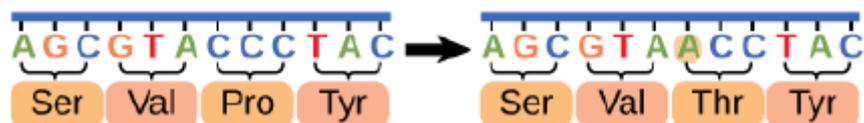
- Mutazioni Missenso conservativo o Sinonime o Neutre, la sostituzione della base comporta la codifica di un aminoacido con un altro con proprietà simili, non si presenta quindi alcuna alterazione nella funzionalità della proteina risultante.
- Mutazioni silenti, mutazioni missenso in cui la sostituzione della base comporta comunque la codifica dello stesso aminoacido, la proteina risultante è pertanto identica a quella originale.
- Mutazione nonsense, la variazione della tripletta nucleotidica risulta in grado di trasformare nel mRNA un codone codificante per un aminoacido in un codone nonsense (codone stop) che causa o la non esportazione del polipeptide o, se codificato, la terminazione della sintesi in un punto non corretto con produzione di una proteina trunca e quindi solitamente non funzionale o nociva.

Point Mutations

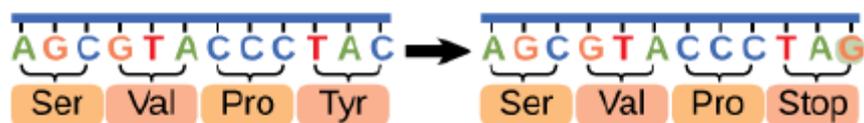
Silent: has no effect on the protein sequence



Missense: results in an amino acid substitution

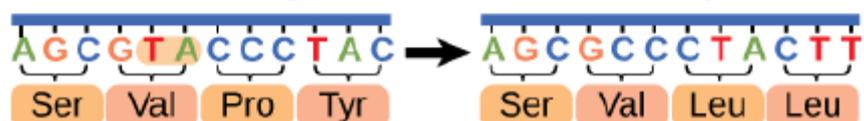


Nonsense: substitutes a stop codon for an amino acid



Frameshift Mutations

Insertions or deletions of nucleotides may result in a shift in the reading frame or insertion of a stop codon.



Un ruolo importante nelle mutazioni in particolare quelle spontanee, per inserzione, delezione e frameshift è interpretato dagli elementi trasponibili.

Elementi trasponibili o trasposomi

Fino ai primi anni cinquanta si pensava che ogni sequenza genetica avesse una localizzazione cromosomica fissa modificabile solo a seguito di rari eventi di riarrangiamento cromosomico. Grazie agli esperimenti sul mais di McClintock l'esistenza di elementi mobili è stata dedotta dalla proprietà tipica di questi elementi genetici di indurre mutazioni spontanee in corrispondenza dei nuovi siti di inserzione.

Gli elementi trasponibili (jumping genes, transposon) sono elementi genetici generici in grado di “saltare” in modo autonomo da una localizzazione cromosomica a un'altra (trasposizione). Gli elementi trasponibili possono essere definiti come sequenze moderatamente ripetitive di DNA o RNA capaci di inserirsi nel genoma in posizioni diverse e anche in genomi diversi.

Gli elementi trasponibili fanno parte del *mobiloma* costituito da tutti gli elementi genetici mobili di una cellula (Mobile Genetic Elements - MGE), i quali possono muoversi all'interno o tra genomi diversi. In base al meccanismo con cui si spostano e al tipo di sequenza, essi vengono suddivisi in diverse categorie: trasposoni o elementi trasponibili, plasmidi, batteriofagi e ribozimi auto-splicing (RNA-Enzimi ossia molecole RNA con funzioni catalitiche). Negli eucarioti la categoria maggiormente rappresentata è quella degli elementi trasponibili, mentre nei procarioti possono essere rappresentate anche le altre categorie, le quali permettono scambio di materiale genetico tra genomi diversi.

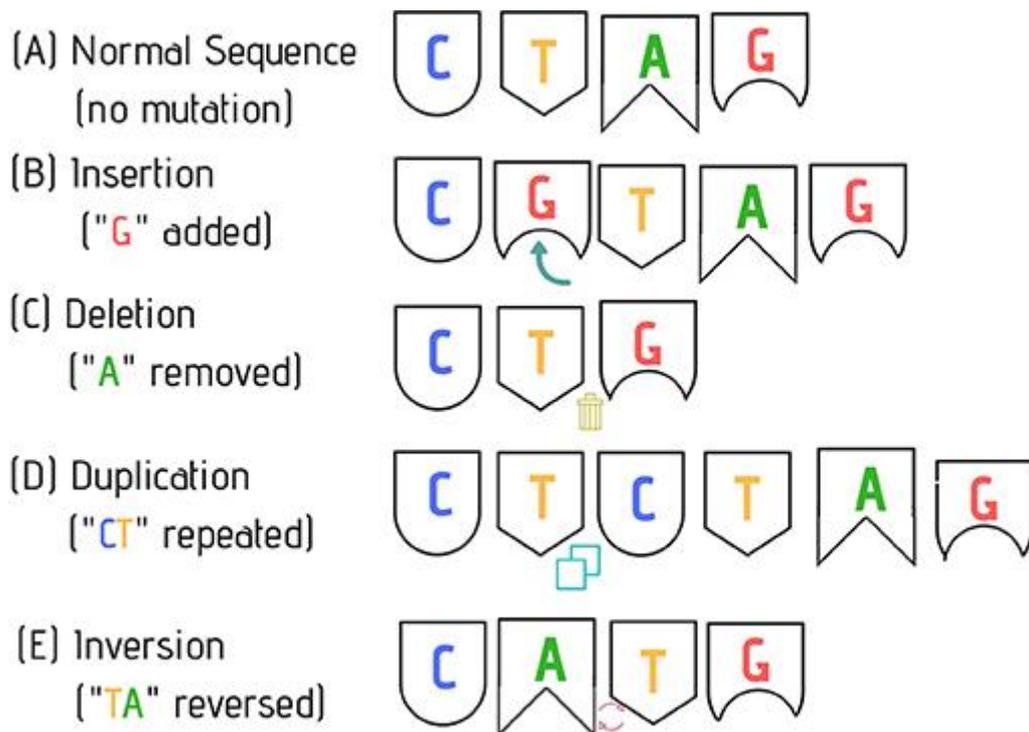
Gli elementi trasponibili (trasposomi) costituiscono più del 40% del genoma umano.

Tali elementi possono essere considerati anche come elementi parassitari, alcuni di essi infatti sono considerati imparentati con alcune famiglie dei cosiddetti retrovirus.

La presenza degli elementi trasponibili nella cellula viene generalmente individuata a seguito dei cambiamenti che essi determinano nell'espressione e nell'attività dei geni nei quali o nelle vicinanze dei quali si inseriscono (mutazioni per inserzione) nonché dell'intero genoma (mutazioni per inserzioni, delezioni, inversioni o traslocazioni). Infatti oltre a poter provocare l'inattivazione di un gene, l'inserimento di un elemento trasponibile può essere alla base di interazioni regolative complesse, dovute al riarrangiamento delle sequenze che controllano l'espressione di un gene e/o all'effetto esercitato dai conseguenti segnali di trascrizione sull'espressione di geni adiacenti. Le sequenze regolative presenti nell'elemento trasponibile

possono infatti alterare l'espressione delle sequenze adiacenti al sito di inserimento provocando sia l'attivazione di promotori criptici normalmente silenti sia l'inattivazione o l'alterata espressione di promotori attivi.

Gli elementi trasponibili promuovono anche il verificarsi di estesi riarrangiamenti del genoma. Copie di un elemento inserite in siti diversi forniscono regioni di omologia al cui interno possono verificarsi eventi di ricombinazione; tali scambi possono provocare delezioni, inserzioni, duplicazioni, inversioni o traslocazioni (frameshift).



Oggi sappiamo che In tutti gli organismi studiati, una larga percentuale delle mutazioni spontanee è rappresentata da mutazioni da inserzione.

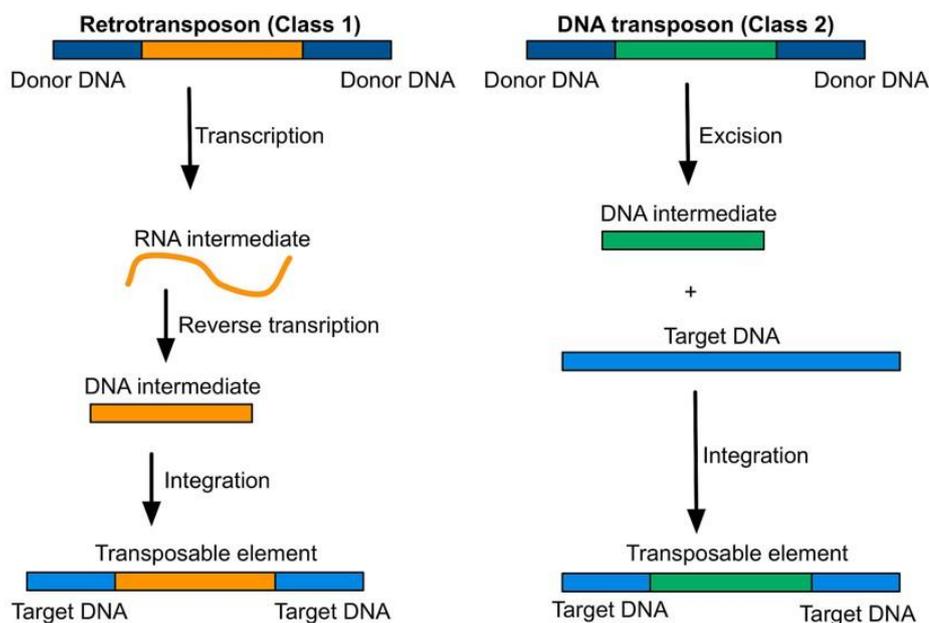
La trasposizione svolge un ruolo rilevante nell'evoluzione del genoma sia nei procarioti sia negli eucarioti. L'effetto principale consiste essenzialmente nell'aumentare la variabilità genetica provocando una larga serie di mutazioni e di riarrangiamenti.

I meccanismi di trasposizione sono essenzialmente distinguibili in due tipi:

Trasposizione conservativa (class 2), l'elemento trasponibile si muove per escissione dal sito occupato e simultanea integrazione in un nuovo sito. Tale trasposizione viene effettuata dai trasposomi a DNA che appunto si spostano con un meccanismo di tipo "taglia e incolla";

Trasposizione replicativa (class 1), l'elemento trasponibile non si sposta dal sito occupato ma si duplica ed è la sua copia che si inserisce in un nuovo sito. Diversamente dalla trasposizione

conservativa, quella replicativa comporta quindi un aumento del numero di copie dell'elemento per ogni evento di trasposizione. Questo tipo di trasposizione viene eseguita da trasposomi replicativi a RNA detti Retrotrasposomi o retrovirus like element che appunto creano una copia di se stessi in RNA (in cui si trascrivono autonomamente) che fa da stampo per la sintesi di un nuovo DNA che si muove e inserisce in un altro punto tramite un meccanismo “copia e incolla”. Alcuni trasposomi a RNA vengono trascritti e non tradotti mentre altri portano alla sintesi di una proteina.



L'identificazione e la caratterizzazione degli elementi trasponibili da organismi diversi, sia procarioti sia eucarioti, ha portato a stabilire che, indipendentemente dalla loro provenienza, essi condividono alcune caratteristiche generali comuni:

- Traspongono in maniera autonoma;
- Codificano per enzimi (trasposasi) che catalizzano il loro inserimento in nuovi siti "bersaglio";
- Controllano con meccanismi diversi la propria frequenza di trasposizione;
- Richiedono l'integrità delle sequenze terminali come requisito indispensabile per la trasposizione, che si svolge in maniera precisa e mediata dal riconoscimento delle estremità da parte della trasposasi;

- Ogni elemento trasponibile è fiancheggiato direttamente da corte sequenze ripetute di lunghezza caratteristica per ogni diverso elemento e di composizione differente per ogni sito di inserzione. La formazione di queste ripetizioni è dovuta all'attività endonucleolitica della trasposasi che taglia i due filamenti del DNA in punti sfalsati (ai lati del sito di inserzione). La riparazione dei tagli porta alla duplicazione della specifica sequenza originariamente presente in singola copia nel sito bersaglio;
- Molti elementi traspongono con frequenza maggiore in corrispondenza di particolari sequenze, che costituiscono così bersagli preferenziali. La frequenza di trasposizione è caratteristica di ogni elemento (es. nei procarioti 10^{-3} - 10^{-5} per elemento per generazione) e in molti casi la frequenza può variare in funzione della topologia del DNA e in risposta a precisi stimoli ambientali.

Le mutazioni provocate dagli elementi trasponibili sono spesso caratterizzate da instabilità dovuta alla proprietà tipica di molti di essi di essere escissi dal sito da loro occupato. Un'escissione precisa è un evento raro e porta al ripristino del fenotipo selvatico, mentre un'escissione imprecisa porta spesso all'origine di un nuovo allele mutante. Numerosi sono gli esempi di geni eucariotici in cui l'inserimento o l'escissione imprecisa di un elemento trasponibile provoca un nuovo profilo di espressione temporale e/o spaziale del gene stesso. Gli elementi trasponibili sono variamente e largamente utilizzati nelle tecniche di manipolazione genetica.

Mutazioni di splicing del mRNA

Le mutazioni di splicing del mRNA, sono di quattro tipi e coinvolgono sequenze importanti per lo splicing del pre-mRNA:

- 1) Mutazioni nel sito marcatore di inizio e in quello di fine sequenza intronica possono portare all'inclusione dell'introne nel trascritto maturo oppure a uno splicing non corretto;
- 2) mutazioni di brevi sequenze consenso a monte e a valle del sito di inizio o di fine splicing o una sequenza consenso del sito di biforcazione (branch-site);
- 3) mutazioni in una sequenza ESE o ESS e possono essere considerate mutazioni silenti;
- 4) mutazioni che creano nuove sequenze consenso all'interno di un introne e qualora esso o sue parti vengano incluse nel trascritto o in un esone, si verifica l'exon skipping (che quindi non viene codificato).

Mutazioni condizionali

Le mutazioni condizionali manifestano i propri effetti solo in determinate condizioni ambientali. Ad es. mutazioni sensibili alla temperatura; che agiscono cioè solo al di sopra (o di sotto) di determinate soglie di temperatura e possono interessare anche proteine fondamentali come DNA polimerasi e RNA polimerasi la cui mutazione può causare un danno letale.

Mutazioni per reversione e soppressione

Spesso gli effetti di una mutazione dannosa possono essere invertiti da una seconda mutazione. Oltre a mutazioni puntiformi che causano un cambiamento genotipico in direzione selvatico → mutante (mutazioni in avanti), esistono infatti mutazioni puntiformi, dette *per reversione* (o reversioni, revertant) che agiscono genotipicamente e fenotipicamente in direzione inversa ossia mutato → parzialmente mutato/selvatico.

Gli effetti (e non la struttura) di una mutazione genica possono essere invertiti del tutto o attenuati anche mediante una mutazione postuma di un sito diverso da quello della prima mutazione, in questo caso si parla di *mutazione soppressore* (*suppressor*). Essa quindi non comporta una reversione strutturale della mutazione originaria, ma un mascheramento o compensamento degli effetti causati da quest'ultima sopprimono un cambiamento funzionale dovuto a una mutazione nel sito A, producendo un'ulteriore mutazione nel sito B.

Queste mutazioni soppressore (*suppressor*) si dividono in due categorie: le intrageniche, che avvengono nello stesso gene della mutazione originale (ma in un sito diverso), e le intergeniche, che si sviluppano in un gene diverso da quello della prima mutazione.

Uno degli esempi più conosciuti di mutazione soppressore è rappresentato dalla mutazione dei geni per i tRNA che sopprimono (e perciò vengono definiti *geni soppressori*) gli effetti di mutazioni nonsense di altri geni. I geni soppressori, dunque, non agiscono cambiando la sequenza nucleotidica di un gene mutato ma alterando il modo in cui viene letto l'mRNA (modificano la sequenza amminoacidica tradotta). In *E. coli* sono noti geni soppressori specifici per ciascuno dei tre codoni di stop in grado di interpretarli come codoni ognuno per il relativo amminoacido.

Ogni gene soppressore risulta specifico per gli effetti di un solo tipo di mutazione puntiforme a prescindere da qualunque sia il gene mutato.

In generale in una cellula normale una mutazione nonsense viene riconosciuta soltanto da un fattore di rilascio che termina la sintesi della proteina, in caso di mutazione soppressore si crea un amminoacil-tRNA che può riconoscere il codone mutato in stop e inserire un amminoacido continuando così la sintesi proteica. Le mutazioni missenso possono essere soppressa tramite

l'inserzione dell'amminoacido originale o di un altro amminoacido chimicamente simile è accettabile per la proteina. Il risultato delle soppressioni è la produzione di una proteina che presenta sostituzione di uno o più amminoacidi e che a, seconda del cambio nella sequenza, può avere attività parziale o completa. Viene repressa di norma solo una piccola parte delle mutazioni puntiformi.

Mutazioni Indotte e agenti mutageni

Le mutazioni indotte sono causate da agenti mutageni e avvengono con una frequenza molto superiore rispetto a quelle spontanee. I genetisti utilizzano mutageni al fine di elevare la frequenza di mutazione e ottenere un numero significativo di individui mutanti da studiare.

Gli *agenti mutageni* agiscono causando mutazione genetica tramite un complesso di reazioni chimico-fisiche (mutagenesi) in grado di comportare variazioni della sequenza, della disposizione spaziale del del DNA e della struttura e numero degli stessi cromosomi.

Gli agenti mutageni possono essere:

- Agenti fisici (radiazioni)
- Agenti chimici
- Agenti Ambientali.

I *Mutageni fisici* (radiazioni) si suddividono in:

- Radiazioni ionizzanti, sono ad altissima energia e con una lunghezza d'onda corta (es. raggi X e raggi gamma). Tali taggi esplicano la loro azione mutagenica inducendo la ionizzazione dell'acqua o di altre sostanze causando la formazione di radicali liberi. Un esempio è quello del radicale ossidrilico ($\bullet\text{OH}$) che è in grado di inattivare varie molecole cellulari, in particolare il DNA, e di attraversare facilmente diversi materiali (caratteristica che lo rende un mutagene molto pericoloso). I raggi X sono la causa delle più importanti mutazioni cromosomiche nell'uomo (rottture di cromosomi, riarrangiamenti cromosomici e mutazioni puntiformi) mentre alte dosi possono causare la morte cellulare (da qui il loro utilizzo nella cura del cancro). Gli effetti clinici di questi danni cellulari si possono manifestare anche a distanza di molti anni.
- Radiazioni non ionizzanti, sono a bassa energia (microonde, raggi infrarossi, raggi UV) e in grado di essere assorbite dalle basi azotate e quindi di indurre la formazione di dimeri (covalentemente legati) di pirimidine nel DNA. Ciò aumenta il rischio che durante la replicazione la DNA Polimerasi incorpori nucleotidi errati in tale posizione.

Le basi più colpite dai raggi UV sono timina e citosina con conseguente formazione di dimeri di timina che distorcono l'elica ostacolando la duplicazione del DNA. A dosi elevate questi raggi possono risultare letali per le cellule.

I *Mutageni Chimici* comprendono classi di composti chimici caratterizzate dal loro meccanismo di azione che, in linea generale non ha specificità di azione, ma produce effetti simili a quelli delle radiazioni (penetrano nelle cellule e alterano la struttura del DNA). Tali mutageni possono essere suddivisi in:

1. Mutageni Diretti, in quanto possiedono una struttura molecolare che gli consente di interagire direttamente con il DNA (sono quindi altamente reattivi) e sono a loro volta classificati in analoghi delle basi, agenti che modificano le basi, agenti intercalanti;
2. Mutageni Indiretti, non interagiscono direttamente con il DNA ma possono originare a molecole reattive;
3. Promutageni, precursori che diventano attivi (mutageni diretti) solo una volta introdotti e metabolizzate nell'organismo.

Gli *Analoghi delle basi* sono mutageni chimici diretti con una struttura molecolare molto simile a quella delle basi azotate di DNA e RNA, per cui in fase di replicazione del DNA possono essere incorporate negli acidi nucleici al posto delle basi normali inducendo mutazioni. Essi possono cambiare nella propria forma tautomerica anche dopo esser stati incorporati causando mutazione per sostituzione di coppie di basi. Non tutti gli analoghi delle basi sono mutageni, un esempio è l'Azidotimidina (AZT), analogo della timina usato per curare l'AIDS.

Gli *agenti che modificano le basi* sono mutageni chimici diretti che modificano la struttura chimica e quindi le proprietà delle basi inducendo così cambiamenti anche in assenza di replicazione del DNA. Un esempio è l'Acido Nitroso HNO₂ che agisce come agente deamminante e quindi in grado di trasformare la citosina in uracile (che come si appaia con l'adenina), per cui viene prodotta una mutazione per transizione da C-G a T-A durante il processo replicativo.

Altri esempi di questo tipo di mutageni sono:

- Idrossilamina (NH₂-OH) che aggiunge un gruppo OH alla citosina (si produce quindi una transizione da CG a TA).

- Metilmetasulfonato (MMS), un agente alchilante che introducendo gruppi alchilici - CH₃, CH₂-CH₃ sulle basi e determina per metilazione transizioni (Una guanina metilata si comporta come una adenina, una timina metilata come una citosina).

Gli *agenti intercalanti* sono mutageni chimici diretti che agiscono inserendosi tra due basi di una o di entrambe le eliche del DNA. La loro incorporazione distorce la struttura del DNA provocando *l'inserzione o delezione di basi durante la replicazione del DNA o lo spostamento di lettura del codice in un gene strutturale* (mutazione frameshift).

Le mutazioni causate da agenti intercalanti possono essere revertite da un trattamento con lo stesso agente. Esempi di agenti intercalanti sono Acridina, Proflavina, Bromuro di Etidio.

Ai *mutageni chimici indiretti* appartengono quegli agenti chimici che sono in grado di formare specie reattive dell'ossigeno (mutageni ossidativi) o che interagiscono con la sintesi, la replicazione e il corretto mantenimento della struttura del DNA. Un esempio di tali agenti sono le diossine tra cui la TCDD risulta la molecola dotata di più spiccata tossicità esplicando una ampia gamma di effetti specie- e tessuto-specifici quali induzione a trasformazione neoplastica; tossicità a carico del sistema immunitario, del fegato, della pelle.

I *Protomutageni* sono composti relativamente polari (e quindi chimicamente poco reattivi) che possono essere attivati metabolicamente a forme più reattive in grado di interagire con i centri nucleofili del DNA. Il protomutageno più studiato è il benzene, uno dei composti chimici più usati nei paesi industrializzati, che metabolizzato primariamente nel fegato che lo trasforma in diversi metaboliti idrossilati ad anello aperto che vengono poi trasportati anche al midollo osseo, dove ha luogo un metabolismo secondario in cui vengono danneggiate le macromolecole cellulari attraverso la formazione di legami covalenti e l'induzione di danno ossidativo in grado di provocare diverse patologie quali anemia aplastica, leucemia, mieloma multiplo.

I diversi elementi dell'ambiente attuale contengono innumerevoli agenti *Mutageni Ambientali*:

- Aria: benzene, idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e loro derivati, idrocarburi idrogenati ecc.
- Acqua: pesticidi, idrossifuranoni, trialometani. idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e loro derivati ecc.
- Suolo. idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e loro derivati, pesticidi, metalli pesanti ecc.

- Cibo: aflatossine, amine aromatiche, idrocarburi policiclici aromatici, prodotti finali della glicazione avanzata (AGEs) ecc.

Tutti i mutageni sono cancerogeni ma non tutti i cancerogeni sono mutageni. Tanto più è piccolo il gruppo chimico che viene trasferito, tanto più quell'agente è reattivo e quindi pericoloso.

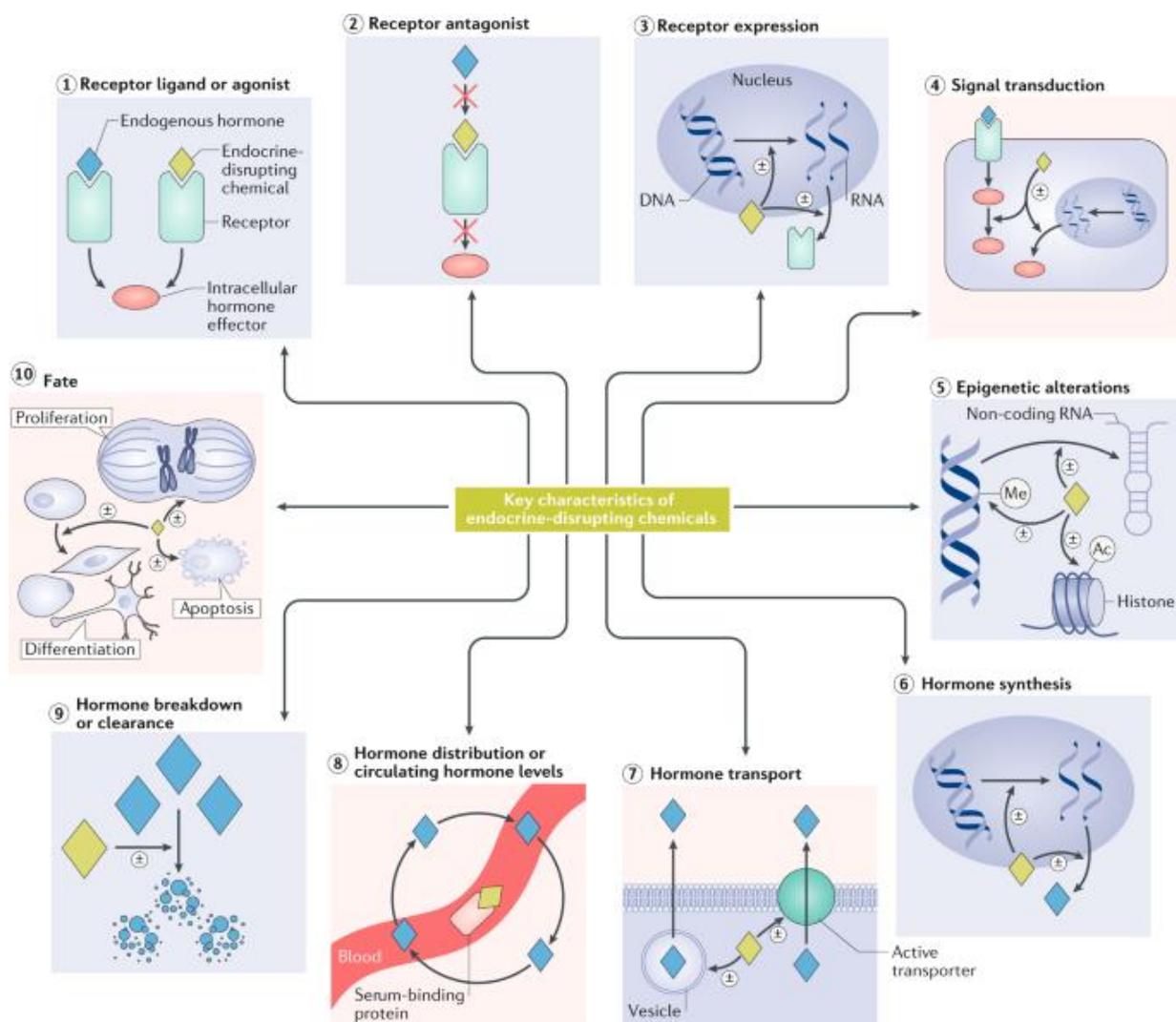
Mutagen	Risk factors	Health behavior that prevents exposure
Sunlight 	Increased exposure to sunlight leading to thymine dimers in DNA	<ul style="list-style-type: none"> • Wear sunscreen • Avoid excess sun exposure • Reapply sunscreen every 2 h • Wear clothes/hat that cover skin
X-ray radiation 	<ul style="list-style-type: none"> • Multiple X-rays • Close proximity to X-rays 	<ul style="list-style-type: none"> • Limit the number of X-rays to only ones that are necessary • Wear protective lead vest over areas not being X-rayed • Use alternative imaging devices
Tobacco products 	<ul style="list-style-type: none"> • Smoking • Chewing tobacco • Second-hand smoke 	<ul style="list-style-type: none"> • Avoid smoking/tobacco products • Avoid being near smoke
Chemicals 	Increased exposure to carcinogenic/mutagenic chemicals	<ul style="list-style-type: none"> • Limit exposure • Dispose of chemicals properly • Wear protective gear
Nitrites	Increased consumption of processed meats, such as hot dogs, sausages, and bacon	Limit consumption of processed meats and grilled meats

Interferenti Endocrini (IE)

Gli interferenti endocrini (IE) possono anch'essi agire sul DNA rappresentando una minaccia per la salute umana e per l'ambiente. Perturbatori o distruttori endocrini sono costituiti da un grande ed eterogeneo gruppo di sostanze chimiche che si possono trovare nell'ambiente come contaminanti persistenti (quindi facilmente concentrabili negli organismi viventi), in molti prodotti di consumo di uso comune ma anche come sostanze naturali. Tali interferenti riescono ad alterare il normale funzionamento del sistema endocrino in quanto possono "spegnere",

"accendere" o "modificare" i segnali inviati dagli ormoni. Questi composti, spesso molto comuni nella vita quotidiana, oltre all'incremento del rischio di patologie riproduttive (infertilità, endometriosi, aborto, criptorchidismo, intersessualità, ipospadia, diminuzione della qualità del seme umano ecc.), possono generare alcuni tipi di tumori ormono-dipendenti (in particolare a seno e testicoli), possono essere causa di disturbi comportamentali nell'infanzia, forse anche del diabete e dell'obesità, ma sicuramente interferiscono con lo sviluppo cerebrale. Le conseguenze negative generate dagli IE possono essere incrementate dall'effetto sommatoria (effetto cocktail) causato dalla possibile assunzione/esposizione multipla e cronica a diversi interferenti endocrini (Cumulative Risk Assessment).

Esempi di IE sono: alcuni PCB (PoliCloroBifenili), alcune Diossine, Perfluorottano Sulfonato (PFOS) e Acido Perfluorottanoico, Sale Ammonico (PFOA), Fitofarmaci soprattutto i pesticidi, Ftalati come il DEHP (Dietilesilftalato), Bisfenolo A (BPA), alcuni (Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) FRA CUI benzopireni e benzofluoranteni, alcuni Metalli presenti nell'ambiente come inquinanti.



Sistemi di riparazione del DNA

Introduzione

I sistemi di riparo del DNA sono dei meccanismi di correzione che le cellule procariotiche ed eucariotiche hanno sviluppato per rimediare a certi danni al DNA e quindi sono finalizzati al mantenimento dell'integrità del genoma e della relativa informazione genetica.

Sebbene mutazioni di diverso grado siano alla base dell'evoluzione, la sopravvivenza degli organismi sarebbe minacciata se questi danni potenzialmente mutageni e citotossici, non venissero riparati. Il processo di riparazione del DNA è pertanto costantemente attivo nella cellula in quanto indispensabile per la sua sopravvivenza: protegge il DNA da alterazioni funzionali e mutazioni nocive. Ogni giorno le normali attività metaboliche e i fattori ambientali possono causare almeno 500,000 singole lesioni strutturali del DNA in ogni cellula.

Non tutte le lesioni mutazionali possono essere riparate in maniera adeguata, di conseguenza senza i sistemi di riparazione le lesioni mutazionali si accumulerebbero e alla fine sarebbero letali per la cellula e l'organismo.

Tutti questi sistemi di riparo sfruttano l'attività di enzimi per operare le correzioni. Alcune lesioni mutazionali vengono riparate direttamente mentre in altri casi la zona danneggiata viene excisa e successivamente sostituita con un nuovo tratto di DNA neosintetizzato.

Tipi di danno e riparazione

Tipi di *danno*:

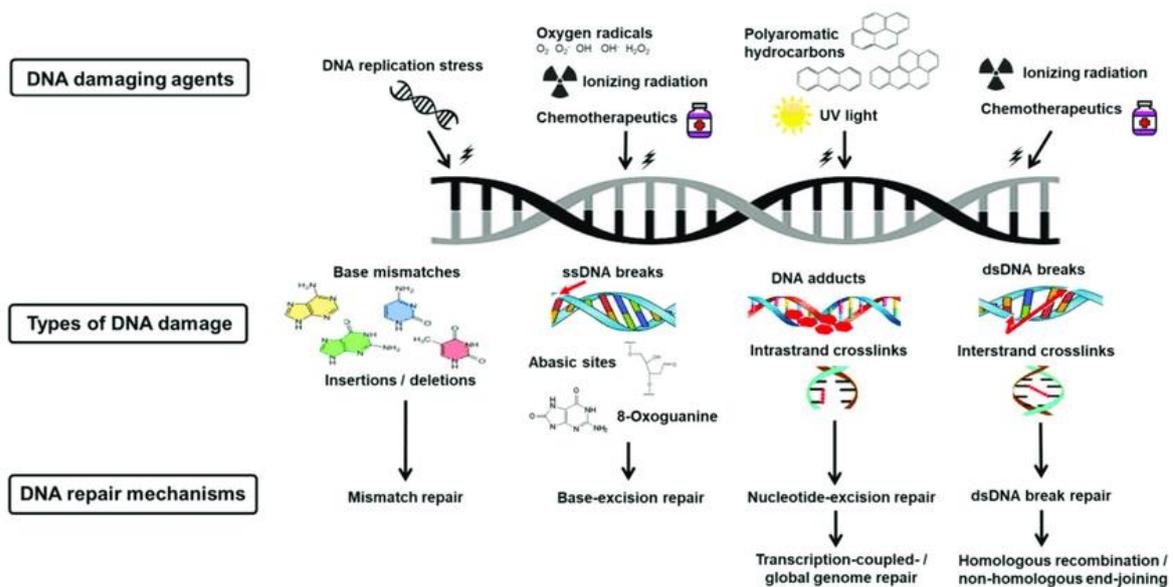
1. ossidazione di basi e generazione di interruzioni nei filamenti di DNA ad opera di specie reattive dell'ossigeno (ROTS);
2. alchilazione di basi (generalmente metilazione);
3. idrolisi di basi (es. depurinazione e depirimidinazione);
4. mismatch, ossia appaiamento errato di basi avvenuta durante la replicazione del DNA.

La cellula reagisce al danno del DNA:

- aggirando il danno
- riparando il danno
- rimuovendo il danno

Con l'*invecchiamento* l'azione riparativa tende a perdere gradualmente di efficacia andando incontro a tre possibili stati:

- 1) Senescenza, in cui vi è un rallentamento del turnover e alterazioni biochimiche che possono condurre a patologie;
- 2) Apoptosi, morte cellulare programmata che può impedire l'instaurarsi malattie e ancor più l'involuzione allo stadio successivo;
- 3) Carcinogenesi.



Quando il danno riguarda solo **uno dei due filamenti** l'altro può essere usato come stampo per guidare la correzione tramite:

- Sistemi di riparo diretto (Fotoriattivazione e Transmetilazione)
- Sistemi per escissione (NER-BER-MMR):

Il sistema di riparazione diretto per *fotoriattivazione* o riparazione dipendente dalla luce, entra in azione a una determinata lunghezza d'onda quando i raggi UV formano dei dimeri di timina e pirimidina (CPD, uno dei principali danni indotti sul DNA dai raggi ultravioletti UV), tramite legami covalenti, riportandoli alla forma originaria monomericamente tramite l'azione dell'enzima fotoliasi (utilizza l'energia della luce per tagliare questi legami), presente sia nei procari che sia negli eucarioti inferiori ma non nell'uomo (fotoreversione enzimatica) o per fotoreversione spontanea a una lunghezza d'onda di 200-300nm (fotoreversione non enzimatica).

(CPD uno dei principali danni indotti sul DNA dai raggi ultravioletti (UV))

La *Transmetilazione* è un sistema di riparazione diretto che interviene in caso di danni da alchilazione in seguito all'azione di agenti alchilanti, i quali modificano i nucleotidi trasferendo gruppi alchilici, metilici o etilici in siti reattivi delle basi o dei fosfati. Questi gruppi possono essere rimossi e trasferiti su un altro substrato da enzimi specifici come l'enzima O6-metilguanina metiltransferasi che agisce sulla O6-metilguanina, base metilata altamente citotossica e non si appaia con la Citosina ma con la Timina.

Il riparo *per escissione* comporta appunto un'escissione di basi azotate (BER) o di nucleotidi indicato (NER) mentre i sistemi MMR intervengono per correggere errori di replicazione sfuggiti alla correzione di bozze.

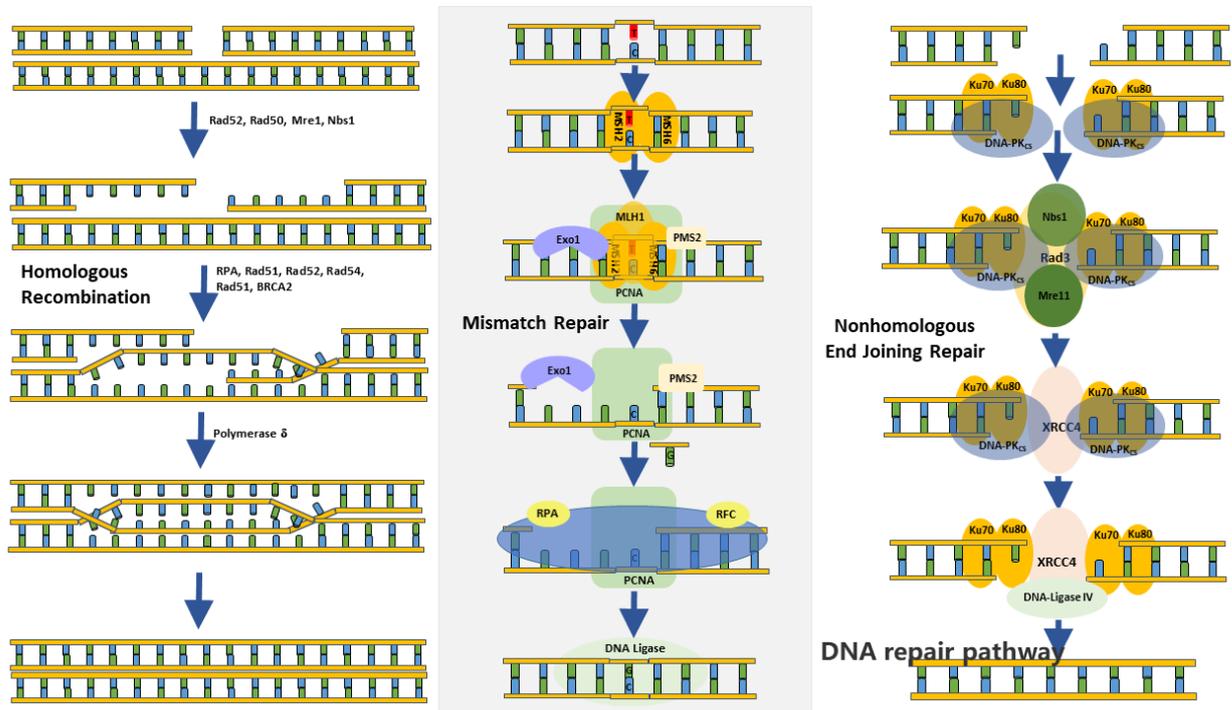
- Riparazione per escissione di base (Base Excision Repair BER): riparazione del danno di un singolo nucleotide, causato da ossidazione (es. Guanina in 8-oxo-guanina, analogo dell'adenina), alchilazione (perlopiù metilazione), idrolisi, deaminazione (es. della Citosina in Uracile) tramite un meccanismo enzimatico che parte dall'attivazione di una DNA-glicosilasi, la quale riconosce la base alterata e rompe il legame N-glicosidico, successivamente una AP-endonucleasi 1 (AP sta per sito a-purinico o a-pirimidinico o, più in generale, a-basico) elimina la base azotata lasciando il fosfato e il deossiribosio che vengono tolti da una liasi consentendo così alla DNA-polimerasi di legare il nuovo nucleotide infine incorporato nel filamento dalla ligasi. L'attività di rimozione e polimerizzazione simultanea della DNA polimerasi viene denominata "nick translation".
- Riparazione per escissione di nucleotidi (Nucleotide Excision Repair NER) presente sia nei procarioti che negli eucarioti, riparazione di un danno che coinvolge filamenti di 2-30 nucleotidi (lesioni voluminose come distorsioni dell'elica dovute alla formazione di dimeri di timina causati da luce UV).. Il complesso XPC-hHR23B (o Rad23B) riconosce il sito da riparare, le elicasi XPB e XPD srotolano l'elica, XPG e XPF (endonucleasi) tagliano ed eliminano l'oligonucleotide danneggiato, DNA-polimerasi sintetizza nuovamente il DNA nel sito del danno, DNA-Ligasi "ricuce" il filamento riparato. Una forma specializzata di NER, nota come riparazione associata alla trascrizione (Transcription-Coupled Repair TCR), dispiega enzimi NER ad alta priorità per geni che sono attivamente trascritti.
- Mismatch Repair (MMR), riparazione di errori di replicazione e ricombinazione genetica, sistema di riparo che interviene nella rimozione di basi erroneamente appaiate sfuggite alla correzione di bozze subito dopo la replicazione del DNA. Gli enzimi coinvolti in questo processo sono le proteine Mut studiate in E. Coli. Negli eucarioti questo meccanismo di riparo è simile ma ancora non del tutto chiarito. Gli enzimi coinvolti sono: MutS che riconosce il mismatch e vi si lega, MLH1 e PMS2 attivati dal complesso DNA-MSH6 e MSH2, che attiva a sua volta MutH il quale, in combinazione a una endonucleasi, taglia il frammento implicato dopo che la elicasi ha aperto la doppia elica, la DNA-polimerasi può ora aggiungere il frammento idoneo e la ligasi unirlo. Di questi quelli generalmente mutati e coinvolti nella cancerogenesi sono MSH2 e MLH1.

Nell'uomo sono stati identificati quattro “geni mutatori” implicati in questo processo in quanto la loro perdita causa un accumulo di mutazioni nel genoma: hMSH2, hMLH1, hPMS1 hPMS2.

La rottura del **doppio filamento** (Double-Strand-Break DSB), ossia di un cromosoma, rappresenta un tipo di danno al DNA particolarmente pericoloso per le cellule in divisione. Esistono due meccanismi capaci di riparare questo danno: Homologous End-Joining – HEJ (ricombinazione omologa o riparazione per ricombinazione o riparazione assistita da stampo o unione omologa delle estremità) e Non-Homologous End-Joining - NHEJ (saldatura delle estremità non omologhe, unione non omologa delle estremità).

- HEJ) La riparazione per ricombinazione (Homologous End-Joining) richiede la presenza di una sequenza identica (o quasi) che possa essere usata come stampo. Il complesso enzimatico che esegue tale processo è praticamente identico a quello del crossing-over durante la meiosi. Tale processo riparativo viene utilizzato principalmente durante la replicazione o a duplicazione avvenuta. Ciò consente l'impiego come stampo del cromatide fratello neosintetizzato portando a un completo ripristino del tratto rotto.
- NHEJ) Il Non-Homologous End-Joining può verificarsi a tutti gli stadi del ciclo cellulare, nelle cellule di mammifero risulta il principale meccanismo fino a quando la replicazione del DNA consente la riparazione HEJ. L'assenza dello stampo nella NHEJ determina infatti il rischio di perdita di sequenza e quindi tale riparazione può essere mutagenica (a seconda del tratto perduto le conseguenze saranno più o meno gravi); rappresenta pertanto più che altro un sistema di emergenza in cui la cellula, pur di ricostituire l'integrità del cromosoma accetta di perdere parte dell'informazione, Va però anche considerato che la comune assenza di “junk DNA (DNA spazzatura), un NHEJ mutagenico risulta probabilmente meno pericoloso di una riparazione con stampo di sequenze presenti in copia multipla che potrebbero produrre riarrangiamenti cromosomici indesiderati. Nel NHEJ intervengono il complesso Ku70/Ku80 e la protein chinasi DNA-PK che interagiscono tra loro e riconoscono le estremità della rottura a doppio filamento. Le estremità possono essere processate, seppur in maniera limitata, dal complesso MRN che presenta attività esonucleasica. Le proteine XRCC4 e DNA ligasi 4 infine ricongiungono le due estremità. Tale sistema enzimatico viene anche utilizzato nei linfociti B per riunire rotture generate dalle proteine RAG (Recombination

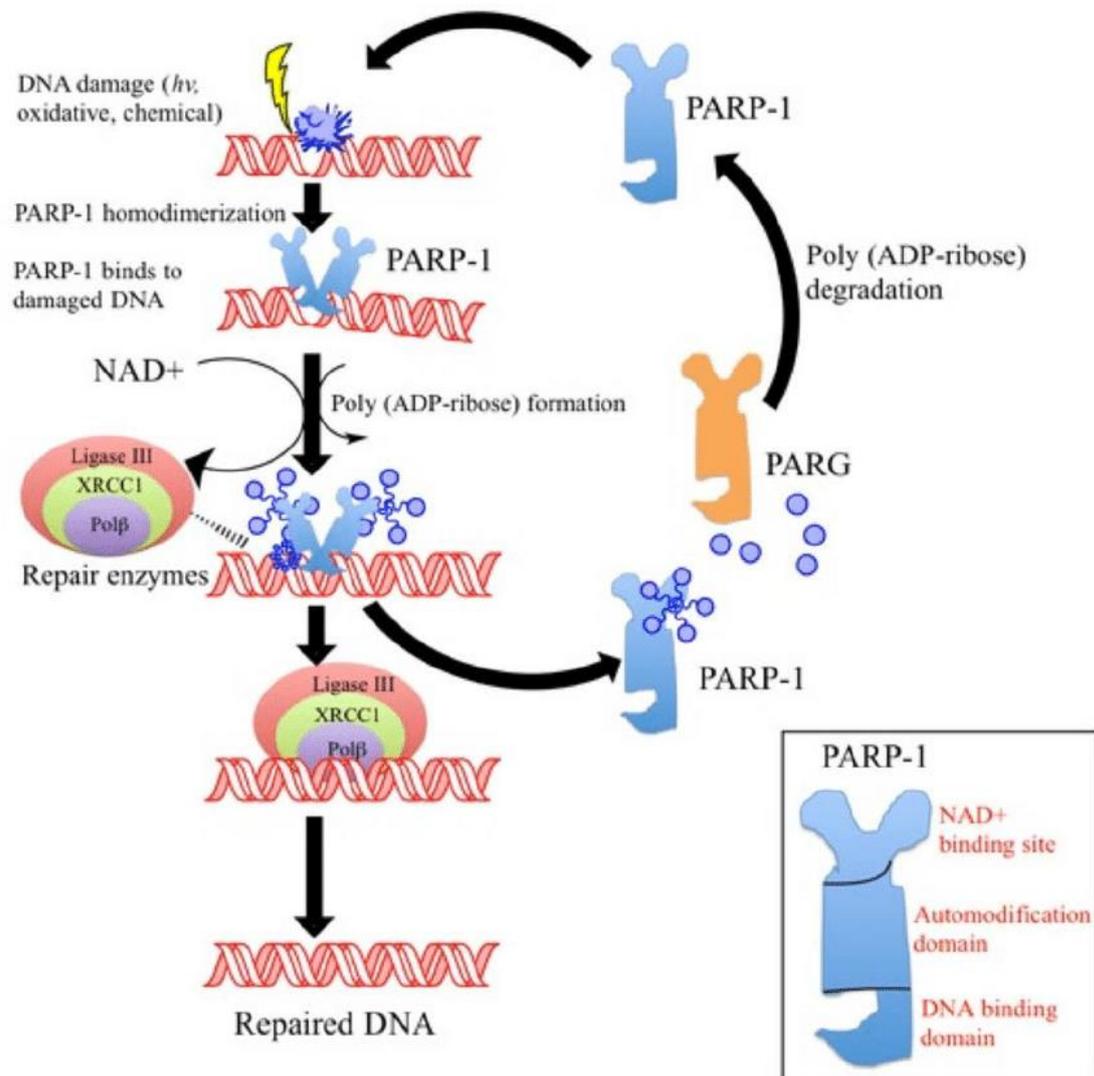
Activating Gene) durante la ricombinazione VDJ (passo cruciale nella produzione della diversità degli anticorpi da parte del sistema immunitario).



PARP1

La Poly [ADP-ribose] polymerase 1 (PARP-1) conosciuta anche come NAD⁺ADP-ribosyltransferase 1 o poly[ADP-ribose] synthase 1, è un enzima codificato nell'uomo dal gene *PARP1*. Tale enzima è il più abbondante della famiglia PARP (di cui ne utilizza il 90% del NAD⁺)

PARP1 agisce primariamente nella rilevazione dei danni al DNA e quindi facilita la scelta del percorso di riparazione. PARP1 contribuisce all'efficienza della riparazione mediante ADP-ribosilazione degli istoni che porta alla decompattazione della cromatina e interagendo/modificando più fattori di riparazione del DNA. PARP1 è pertanto implicato nella regolazione di diversi processi di riparazione del DNA, inclusi i percorsi di riparazione del DNA.



Sistema di riparo SOS

Gli enzimi replicativi sono in grave difficoltà quando una base dell'elica di DNA stampo non può codificare per la base complementare e se il danno non viene corretto può anche divenire letale. Il **sistema di riparo SOS** rappresenta il principale sistema di riparo di *E. coli*; in presenza di grossi danni al DNA agisce bloccando il processo replicativo. Tale sistema SOS è una sorta di risposta d'emergenza a un danno mutazionale, coinvolge più di 20 geni ed è controllato da due geni LexA, che è un repressore che regola la propria espressione e quella dei geni SOS, e RecA che è un regolatore dell'induzione della risposta SOS: si generano dei tratti di DNA a singolo filamento a cui si lega la proteina RecA che si attiva e stimola la proteina LexA ad autoscindersi mediante un taglio auto catalitico, in tal modo viene eliminata la repressione dei geni che trascrivono per la riparazione.

Checkpoint del ciclo cellulare

I checkpoint del ciclo cellulare eucariotico sono meccanismi di controllo che ne assicurano la corretta progressione: controllano di avere completato correttamente la fase precedente prima di iniziare la fase successiva. Ogni checkpoint funge da potenziale punto di stop del ciclo cellulare, qualora la valutazione non soddisfi condizioni favorevoli per l'avanzamento corretto del ciclo cellulare. Esistono diversi tipi di checkpoint, che si dividono in intrinseci, che agiscono in un ciclo cellulare imperturbato, ed estrinseci, che si attivano solo in risposta ad agenti esterni.

I checkpoint del ciclo cellulare eucariotico sono meccanismi di controllo che ne assicurano la corretta progressione: controllano di avere completato correttamente la fase precedente prima di iniziare la fase successiva. Ogni checkpoint funge da potenziale punto di stop del ciclo cellulare, qualora la valutazione non soddisfi condizioni favorevoli per l'avanzamento corretto del ciclo cellulare. Esistono diversi tipi di checkpoint, che si dividono in intrinseci, che agiscono in un ciclo cellulare imperturbato, ed estrinseci, che si attivano solo in risposta ad agenti esterni.

Variabilità genetica: Polimorfismi genetici

Descrizione

Il termine polimorfismo deriva dal greco poly (multiplo) e morph (forma) e in genetica descrive una variazione ereditabile nelle sequenze di DNA presente in una popolazione con una frequenza maggiore dell'1%. Al di sotto di tale soglia si è soliti parlare di variante rara (SNV – Single Nucleotide Variant). Diversamente dalla mutazione, il polimorfismo indica un evento che comporta varianti alleliche di un determinato gene che lascia però inalterata la funzionalità del gene stesso (implicano quindi necessariamente differenze di genotipo ma non di fenotipo). A tale regola fanno eccezione gli SNPs in quanto possono anche fungere da mutazioni puntiformi che cambiano solo un nucleotide per l'aggiunta, perdita o sostituzione di una base del DNA.

I polimorfismi si trovano normalmente nei pressi di un gene ricercato (gene candidato) e vengono ereditati con esso. Il *gene candidato* si ipotizza sia responsabile dello sviluppo di una determinata patologia e viene definito tali in base a due caratteristiche;

- 1) posizione nel genoma, determinata tramite l'individuazione di tratti genetici associati alla malattia, detti marcatori genetici e assenti negli individui sani;
- 2) funzione alterata del polipeptide derivante, possibile causa dell'insorgenza della patologia.

Per tale ragione risultano molto importanti per comprendere alcune variazioni del fenotipo, per l'individuazione di determinate predisposizioni anche patologiche fornendo ad es. informazioni sul modo in cui una determinata malattia si potrebbe sviluppare e sui rischi di sua trasmissione alle generazioni successive. In altre parole i polimorfismi possono fungere da *marcatori genetici*.

Marcatori genetici

I **marcatori genetici** sono geni noti (già mappati) che appunto marcano il territorio, ovvero il cromosoma. Parti di DNA che giacciono vicine in un cromosoma tendono a essere ereditate insieme, per questo i marcatori, possono essere utilizzati per determinare il modo con cui un gene (es. gene candidato) non ancora esattamente localizzato viene ereditato. Più marcatori si hanno a disposizione, più risulta facile localizzare la posizione di un nuovo gene.

Un marcatore genetico ideale presenta le seguenti *caratteristiche*:

- polimorfia, quanto più è alto il numero di alleli posseduti tanto più risulta utile nello studio genetico;
- indipendenza dall'ambiente da cui non deve essere influenzato;
- stabilità di espressione anche se nel caso del DNA ciò non risulta fondamentale in quanto noi non si analizzano i prodotti ma il materiale genetico;
- dispersione nel genoma ossia possibilmente localizzato su tutti i bracci di tutti i cromosomi in modo da coprire il più possibile l'intero genoma;
- ereditabilità con modalità mendeliana semplice;
- determinazione facile nell'analisi sperimentale, più lavoro di ricerca della posizione del gene si ha diventa onerosa e faticosa l'analisi che invece deve essere veloce ed economica;
- eterozigosi, al fine di poter evidenziare parentali e ricombinanti;
- riproducibilità, in tal modo lo stesso marcatore anche se utilizzato in diversi laboratori consente i dati confrontabili.

Esistono diversi *tipi* di marcatori genetici:

1. Marcatori Morfologici, es. caratteri mendeliani (forma della foglia, colore della cariosside, presenza o assenza di corna), non vengono più utilizzati in particolare nell'uomo.

2. Marcatori Biochimici o Proteici, es. isoenzimi e gruppi sanguigni, utilizzati fino agli anni 70 poi hanno lasciato il posto ai marcatori molecolari.
3. Marcatori genetici Molecolari o Marcatori a DNA, sono la classe più recente di marcatori, consistono in sequenze variabili di DNA (non sempre codificante) facilmente identificabili in quanto di esse si conosce la posizione su un determinato gruppo di associazione (costituito da geni associati ovvero localizzati sullo stesso cromosoma e non segreganti indipendentemente) e la distanza da altri marcatori. Sono ereditati con modalità mendeliana che può essere monitorata mediante l'utilizzo di opportune tecniche. Questi sono i marcatori più utilizzati nella ricerca di un gene candidato.

RFLP

Restriction Fragment Length Polymorphism, polimorfismi di lunghezza di frammenti di restrizione, indicano la variazione di lunghezza di sequenze di nucleotidi a seguito dell'azione di enzimi di restrizione che vengono fatti reagire con il campione di DNA da analizzare. Gli enzimi di restrizione sono di origine batterica e sono nucleasi che i batteri utilizzano per contrastare ed eliminare l'invasione interna di DNA estraneo extracellulare. Tali enzimi agiscono tagliando il DNA tutte le volte che incontrano una determinata sequenze di taglio; se il sito di taglio viene alterato da una mutazione, essi non entrano in azione e si origina un RFLP. L'analisi degli RFLP risulta però essere un processo lungo e che richiede una grande quantità di DNA di alta qualità. Essa si basa infatti su una serie complicata di passaggi: separazione del DNA, costruzione di una sonda, frammentazione del DNA, corsa elettroforetica, southern blotting (metodo di trasferimento di acidi nucleici e proteine su carrier), ibridazione, autoradiografia, L'analisi di RFLP è stata la base per primi metodi di fingerprinting genetico e tramite essa è possibile anche individuare gli SNP.

STR (STRP) e VNTR

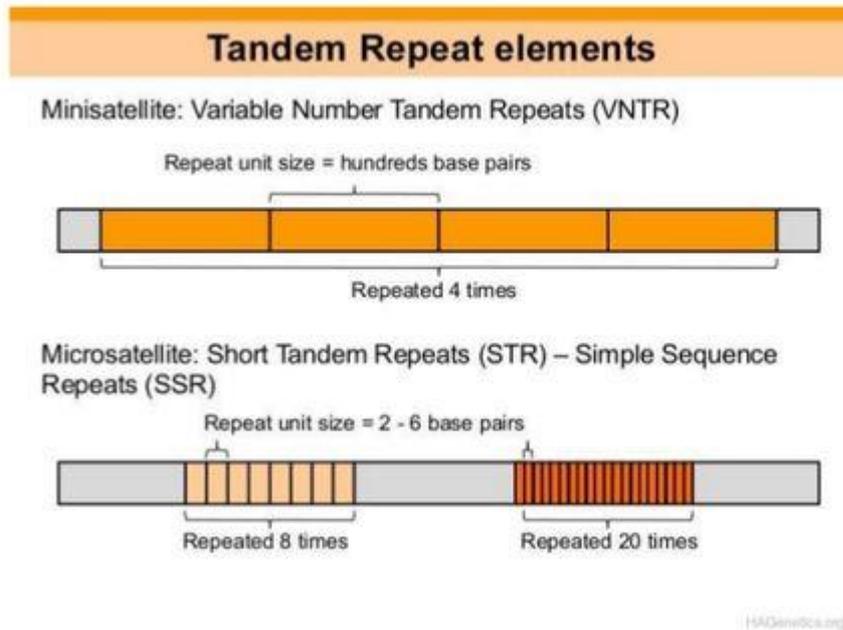
Short Tandem Repeat Polymorphism o *DNA Microsatelliti*, e Variable Number of Tandem Repeats, classe molto importante di DNA polimorfico che consiste in sequenze variabili ripetute in tandem (adiacenti fra loro) in zone non codificanti del DNA. La differenza tra le diverse varianti non è data da un cambio nucleotidico (come accade per RFLP e SNP) ma dalla ripetizione in tandem di specifiche sequenze nucleotidiche; ognuno di essi possiede alle estremità delle sequenze che sono uniche.

Gli *STR* sono costituiti da di 2-6 pb ripetute 20-30 volte (per un totale di circa 150 pb), gli *VNTR* da 10 -100. Le sequenze nelle regioni di DNA non codificante in individui diversi presentano mediamente una differenza (base alterata) ogni 200-300 nucleotidi.

Le sequenze ripetute del nostro genoma sono diverse e di varia origine e rappresentano circa il 44% del DNA. Quelle ripetute in tandem sono caratterizzate appunto dal trovarsi adiacenti l'una all'altra mentre le sequenze intersperse possono anche trovarsi in punti distanti tra loro (es. i retrotrasposoni). *STR* e *VNTR* sono invece “dispersi” nel genoma ossia localizzati su tutti i bracci di tutti i cromosomi e anche per questo sono ampiamente utilizzati come marcatori genetici nello studio di geni responsabili di un determinato fenotipo. Si calcola che esistano circa 50.000 differenti regioni microsatellite distribuite uniformemente lungo tutto il DNA a distanze tra loro ravvicinate, tali da permettere una mappatura di tutti i cromosomi.

I microsatelliti sono altamente variabili da individuo a individuo perciò nella popolazione esiste un numero elevato di alleli per ognuno di questi repeats e pertanto è statisticamente improbabile che tutti gli individui affetti da una determinata patologia ereditino la stessa variante di questo polimorfismo che potrà essere altresì presente in un soggetti sani. I microsatelliti maggiormente informativi sono quelli presenti in eterozigosi. Gli individui eterozigoti per un certo polimorfismo sono importanti in quanto permettono di stabilire la frequenza con cui i due alleli vanno incontro a ricombinazione rispetto a un certo marcatore qualsiasi. Per poter fare una diagnosi precoce (prenatale in alcuni casi) o comunque pre-sintomatica della malattia è indispensabile che il genitore, che può aver trasmesso al figlio l'allele patologico, sia eterozigote per il polimorfismo in stretta associazione con la malattia; esaminando i familiari è in genere possibile stabilire quale dei due alleli è associato con l'allele responsabile della malattia.

La tecnica per analizzare i microsatelliti è molto semplice e si basa su PCR seguita da elettroforesi su gel di agarosio e sequenziamento automatico.



SNPs

Single Nucleotide Polymorphism), variazioni polimorfiche di singoli nucleotidi, rappresentano il gruppo di marcatori più recenti, sono i più abbondanti e distribuiti nei genomi. Essi corrispondono a differenze di un singolo nucleotide nella sequenza di DNA tra individui appartenenti alla stessa specie e quindi vengono considerati come la base molecolare della maggior parte delle differenze tra individui della stessa specie. Per questo motivo attraverso specifiche tecniche di analisi vengono oggi ampiamente utilizzati soprattutto nelle indagini genetiche.

La maggioranza delle differenze tra individue deriva dagli SNPs. Essi sono i marcatori con la più alta densità all'interno del genoma, con una frequenza di circa 1 ogni 1000 pb, rappresentano ca. il 90% dei polimorfismi, sono presenti nel genoma umano in un nr. superiore a 4 milioni con una frequenza pari a 1/700 nucleotidi. Lo 0,1% di materiale ereditario che costituisce la “variabilità interindividuale” che è dovuta molto spesso a queste sostituzioni di singoli nucleotidi che compongono il nostro DNA, ossia agli SNPs.

Il 90% degli SNP è presente in tutti i popoli ma con frequenze variabili. Essi possono trovarsi in regioni del DNA non codificanti e codificanti, in quest'ultime la loro presenza può comportare la comparsa di anomalie dell'espressione e/o della struttura della proteina sintetizzata (come per mutazione puntiforme).

Il loro effetto informativo risulta notevole se li si considera nel loro complesso e non singolarmente. Gruppi di queste piccole variazioni infatti, sommandosi tra loro, sono causa di suscettibilità o di resistenza a molte malattie quali diabete, alzheimer, cancro, aterosclerosi.

Essendo delle variazioni che si mantengono pressoché stabili nel corso dell'evoluzione, è possibile seguire con una certa facilità la loro trasmissione attraverso le generazioni. Questo rappresenta un notevole vantaggio negli studi di popolazione mirati alla ricerca di una specifica malattia genetica.

Gli SNPs quindi oltre a rappresentare degli ottimi marcatori neutri di geni candidati (polimorfismi in senso stretto), possono avere un ruolo diretto nella predisposizione e causa alle malattie (mutazioni puntiformi).

Grazie alle nuove tecnologie di analisi genetica si è visto che gli SNPs svolgono un *ruolo* importantissimo nell'indurre la suscettibilità delle risposte dell'organismo nei confronti di stimoli esogeni ed endogeni, essi infatti sono in grado di:

- condizionare le risposte dell'organismo es. regolando l'espressione genica e quindi determinando una maggiore o minore produzione di una proteina;
- indurre delle variazioni a carico della funzionalità della proteina stessa, es. possono causare la sintesi di una proteina inattiva o parzialmente funzionante;
- causare la predisposizione a un certo tipo di patologie;
- influenzare la suscettibilità di un organismo ad un determinato alimento una volta ingerito, ricoprendo quindi un ruolo determinante nelle intolleranze alimentari;
- influenzare la risposta ai patogeni, agli agenti chimici, ai farmaci.

Oggi gli SNPs vengono studiati principalmente tramite i microarray di DNA (chip a DNA).

La maggior parte degli SNPs sono stati indentificati durante le fasi del progetto genoma umano e del successivo progetto Hap-Map ottenendo così dei loro database:

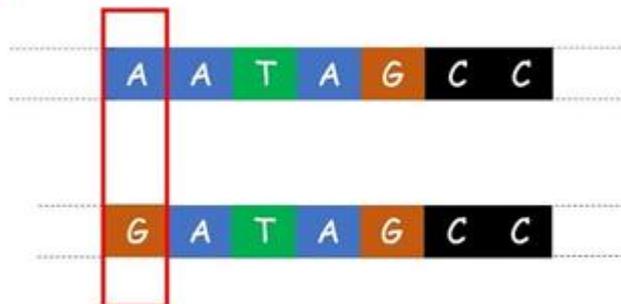
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/index.html>

•Human Genome Variation Database (HGVBbase) <http://hgvbbase.cgb.ki.se/>

TSC: The SNP Consortium <http://snp.cshl.org/>

Gli SNPs sono indicati anche con la sigla RS (RefSNPs) seguita da un codice numerico.

SNP or Mutation?



Still confused then watch this

Frequenza dei polimorfismi genetici e Medicina Predittiva

Le *frequenze* dei polimorfismi genetici all'interno di una popolazione sono controllate da diversi fattori di cui il più importante sembra essere la selezione naturale: se la frequenza di due o più polimorfismi rimane costante, si parla di polimorfismo bilanciato e ciò deriva una selezione equilibrante (balancing selection).

Oltre il 30% dei loci del genoma mostrano varianti polimorfiche nella popolazione ma solo una piccola parte delle variazioni nella sequenza di DNA è causa di malattia, la maggior parte aumenta la variabilità genetica.

Le nuove conoscenze di cui oggi disponiamo riguardo il genoma umano, hanno permesso lo sviluppo della cosiddetta “*Medicina Predittiva*”, in grado cioè di fornire una stima del rischio di un individuo di sviluppare una determinata patologia. nell'arco della sua vita, basandosi sulle informazioni genetiche dell'individuo stesso (analisi di linkage). Si può così effettuare screening prenatale e neonatale di diverse patologie frequenti nella popolazione e l'individuazione di portatori sani e quindi predire il rischio di figli affetti; ciò risulta importante nei casi di malattie a insorgenza tardiva, malattie monogeniche e malattie poligeniche.

Studi associazione e analisi genetica

Negli *studi di associazione* si valuta a livello di popolazione se esista una associazione statisticamente significativa tra un determinato fenotipo e un particolare allele (o genotipo) al fine di individuare i geni coinvolti nella determinazione fenotipica: si confrontano gruppi di individui della stessa popolazione che presentano caratteristiche fenotipiche differenti (es. capelli chiari vs capelli scuri o una malattia) analizzandoli per una batteria di marcatori genetici

(su tutto il genoma nei recenti studi di associazione genome-wide GWAS Genome-Wide Association Study). Differenze statisticamente significative nella frequenza di alleli (o genotipi) tra i gruppi potrebbero indicare che quel marcatore si trova in corrispondenza di un gene rilevante per il fenotipo indagato.

Gli studi di associazione sono importanti ad es. quando la ricerca riguarda malattie multifattoriali, rendono possibile la costruzione di un Aplotipo ossia di set di varianti alleliche (diversi tipi di polimorfismo) che caratterizza un cromosoma o porzione di esso che tendono a essere trasmessi assieme (come un segmento unico), posto in prossimità di un locus di interesse (o all'interno del loci stesso), coincidenti con uno di riferimento:

Un'analisi genetica aiuta a identificare una mutazione in un particolare gene o cromosoma ed è in grado quindi di fornire notizie precise su un determinato corredo genetico. Un vantaggio dell'analisi genetica risiede nel fatto che le mutazioni genetiche sono spesso trasmesse all'interno della famiglia pertanto i risultati ottenuti per un individuo possono rivelare informazioni genetiche circa altri membri della famiglia, in particolare in relazione al loro rischio genetico di contrarre la malattia.

Grazie pertanto allo sviluppo di nuovi metodi diagnostici e prognostici, lo studio dei polimorfismi, localizzati nei pressi di geni candidati e quindi associati a una aumentata suscettibilità verso specifiche patologie, è possibile elaborare i relativi piani di cura e prevenzione altamente personalizzati e quindi efficaci.

Lo studio dei polimorfismi trova ampio spazio e campo di applicazione anche nella *farmacogenetica*, che studia come la variabilità genetica inter-individuale è in grado di alterare il metabolismo (e quindi gli effetti) di un determinato farmaco. Il profilo genetico di un individuo risulta pertanto importante nel determinare anche il metabolismo dei farmaci e la variabilità di risposta agli stessi al fine di giungere a una terapia individuale, basata sull'utilizzo di farmaci e relativi dosaggi specifici per ogni individuo.

Un ulteriore esempio è il test che permette di identificare trentacinque polimorfismi di due geni per la P450 che sono coinvolti nel metabolismo ossidativo di alcuni farmaci come i FANS. Alcune varianti alleliche di questi geni determinano una ridotta o assente attività enzimatica della P450 per cui questi farmaci non vengono metabolizzati in tempi brevi determinando così un aumento della tossicità negli individui che presentano questa variante allelica; conoscere questa predisposizione permette di dosare il farmaco in maniera tale da evitare gli effetti tossici o collaterali.

Lo studio sul genoma ha fatto emergere un aspetto molto importante, che è alla base di scienze di ultima generazione, la *Nutrigenetica* e la *Nutrigenomica*, che mettono in relazione le caratteristiche genetiche di un individuo con la sua alimentazione e mirano a elaborare una nutrizione personalizzata, basata sulle caratteristiche del proprio genoma.

Un determinato polimorfismo può quindi essere associato a una specifica malattia o a una risposta a un farmaco ma anche a un alimento e a specifici stili di vita, risultando pertanto una importante discriminante fra possono quindi essere associati alla salute e malattia.

Lo studio dei polimorfismi trova applicazione in diversi *ulteriori ambiti* quali:

- Medicina legale, utilizzato soprattutto per il riconoscimento, tramite il profilo genetico, del grado di parentela, per l'identificazione di vittime di catastrofi e persone scomparse nonché autori di crimini;
- Zootecnia e agricoltura, settori in cui si possono effettuare modifiche genetiche (es. OGM), con i relativi pro e contro, arrivando all'inserimento di geni batterici, come nel caso del mais, per produrre tossine contro insetti oppure nella produzione di molecole di interesse, quali insulina o l'alfa1antitripsina, da parte di individui transgenici come batteri e mammiferi.

Tecniche di analisi biomolecolari

Introduzione

Quanto fin qui descritto nei precedenti capitoli è possibile grazie a un insieme di moderne tecniche biomolecolari specifiche per ciascun tipo di applicazione.

La nuova tecnologia di analisi dei polimorfismi consente di analizzare e manipolare il patrimonio genetico di un organismo. Risulta infatti possibile studiare la struttura e l'espressione di un gene e dei suoi elementi di controllo, inoltre partendo da un fenotipo di interesse se ne può identificare i geni responsabili.

Tecniche di notevole importanza nello studio dei polimorfismi sono: PCR (Polymerase Chain Reaction), Elettroforesi su gel di Agarosio. Sequenziamento. Microarray di DNA (Chip a DNA).

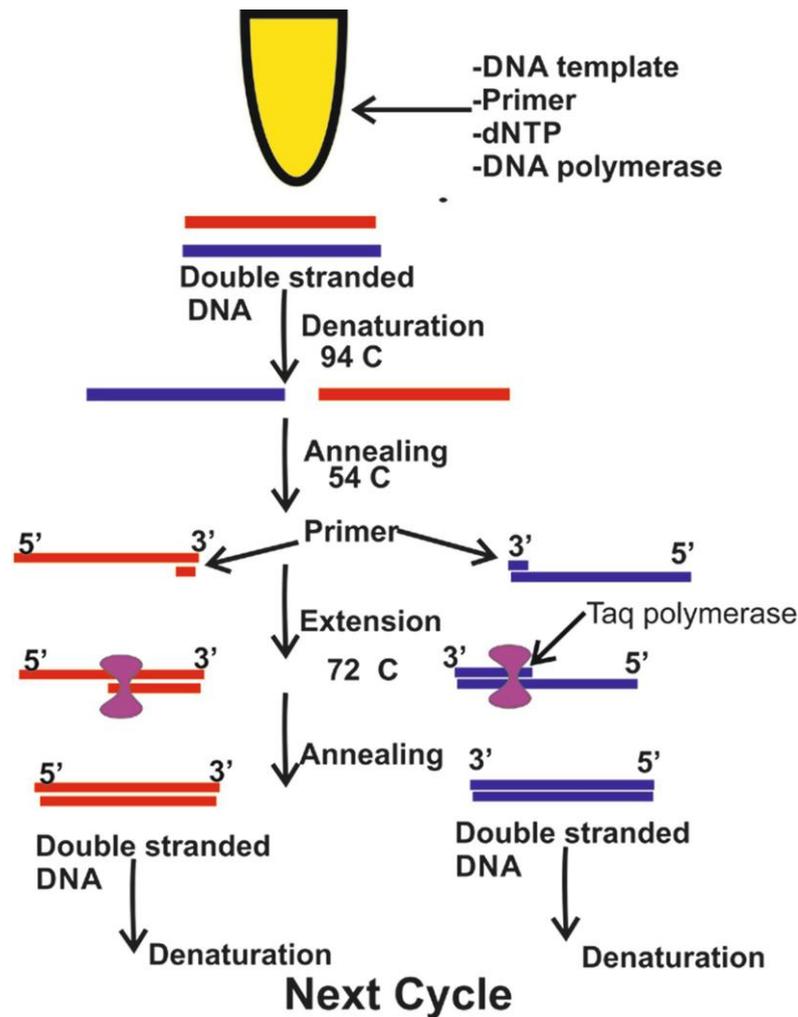
PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) è una metodica altamente sensibile creata nel 1985 dal Biochimico statunitense Kary Mullis, che gli valse il premio Nobel per la chimica nel 1993, e la sua prima applicazione fu uno studio prenatale sull'anemia falciforme. E' una metodica molto semplice che offre la possibilità di ottenere, a partire da un campione di DNA ridotto, un numero elevato di copie di una determinata sua regione di interesse, mediante un processo di amplificazione enzimatica in vitro.

Ogni ciclo si compone di tre fasi;

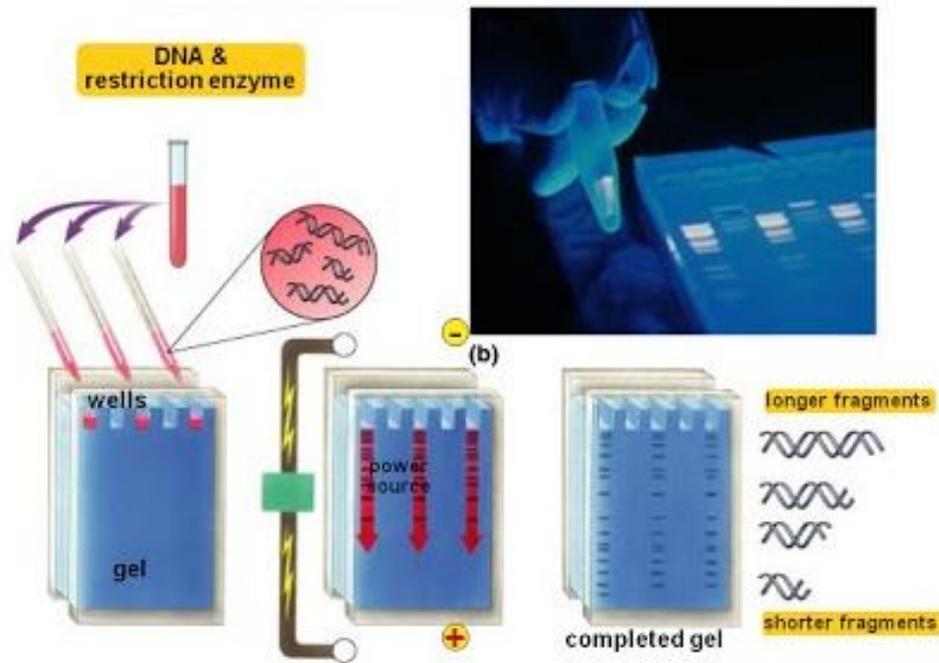
- 1) Denaturazione iniziale del DNA, i due filamenti della doppia elica che servono da stampo si separano mediante incubazione della soluzione a 95° per un tempo di circa 5 minuti,
- 2) Appaiamento dei Primers (Annealing), ottenuto tramite il raffreddamento della soluzione a una temperatura di 37 - 55 °C che consente a ciascuno dei primers di ibridizzarsi con la sequenza
- 3) specifica sul template di DNA;
- 4) Estensione, la soluzione viene riscaldata a 72° per circa 10 minuti ottenendo l'optimum di temperatura per la Taq Polimerasi e quindi la sintesi di DNA.

Le tre fasi si ripetono per diversi cicli (35-40) e a ogni ciclo il numero di copie della sequenza specifica compresa tra i due primers raddoppia. il DNA genomico del campione e il DNA neo-amplificato fungono entrambi da filamento stampo per i cicli successivi, pertanto la PCR procede in maniera esponenziale. Negli ultimi cicli l'efficienza della reazione si riduce sempre di più in quanto la quantità di enzima diventa insufficiente per estendere il grande numero di ibridi primer-stampo e allo stesso tempo l'elevata concentrazione di singole catene del filamento stampo favorisce la riassociazione delle catene per complementarità con conseguente sottrazione delle stesse alla reazione di PCR.



Elettroforesi su gel di Agarosio

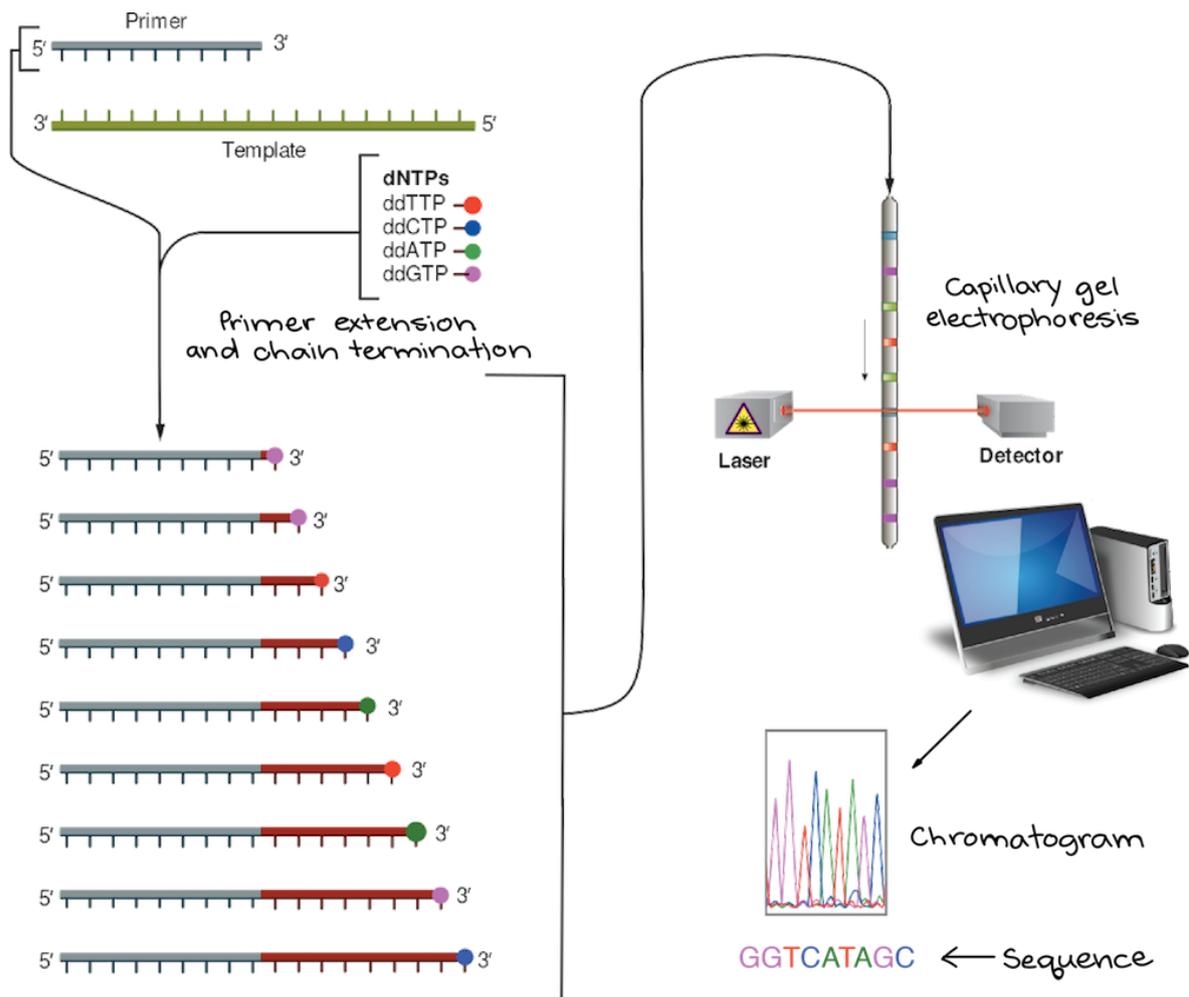
Agarose gel electrophoresi), tramite il meccanismo di elettroforesi, I campioni (ionizzati in base al pH della soluzione), sottoposti all'azione di un campo elettrico vengono fatti correre insieme a uno standard (marcatore di peso molecolare noto). Nel passare attraverso i pori del gel le molecole di DNA subiscono un "effetto setaccio", in base alla loro dimensione e una volta separate vengono visualizzati mediante opportuni metodi di colorazione (Bromuro di Etidio) o di rivelazione. Il pattern di migrazione viene poi specificatamente fotografato e quindi studiato comparando con lo standard di riferimento oppure il gel viene introdotto e analizzato in un sequenziatore automatico.



Sequenziamento (DNA Sequencing)

Le molecole di DNA si distinguono principalmente per la loro particolare sequenza di coppie di basi da cui l'importanza di identificare tale sequenziamento.

Tutti i protocolli per il sequenziamento prevedono la generazione, mediante elettroforesi su particolari gel o matrici, di una serie di molecole di DNA a filamento singolo ognuna con una lunghezza superiore di una sola base rispetto alla precedente. Nella matrice si evidenzia, tramite specifiche reazioni colorimetriche, una "scala" graduate di bande di lunghezze crescente che consentono di "leggere" i nucleotidi ottenendo così la sequenza del DNA. Oggi il gel viene introdotto in un sequenziatore automatico, scannerizzato e, tramite fascio di luce laser, viene prodotta un'immagine a monitor sotto forma di bande fluorescenti di colori diversi che consente l'immediata identificazione grafica degli alleli presenti per ciascun individuo e quindi specifiche mutazioni puntiformi e polimorfismi.



Microarrays

I Microarrays di DNA (geni chip, chip a DNA, biochip o matrici ad alta densità) sono dei piccoli supporti solidi suddivisi in celle (vetrino da microscopia di dimensioni 75x25x1mm, chip di silicio, sottili membrane di nylon) sui quali vengono immobilizzate, in posizioni prefisse e note, migliaia di sequenze di DNA fungendo così da sonde (probe). Tali array permettono di esaminare simultaneamente la presenza di moltissimi geni all'interno di un campione di DNA (che spesso può rappresentare anche l'intero genoma o trascrittoma di un organismo).

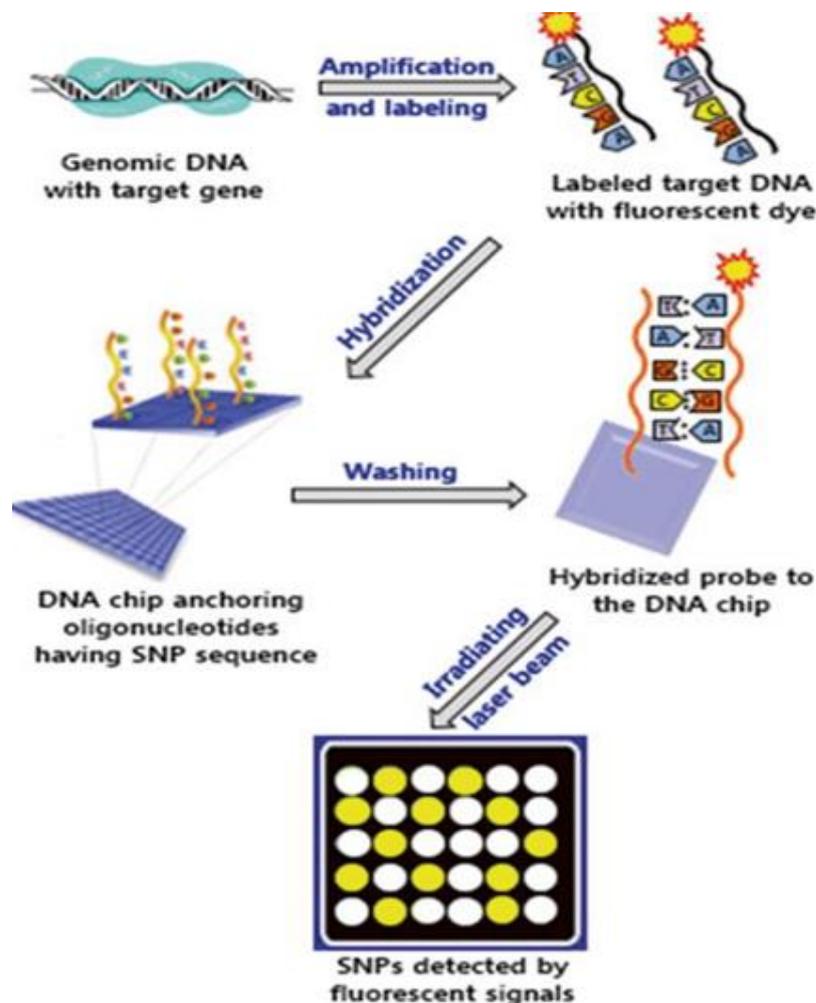
Il Microarray si basa sull'ibridazione inversa molecolare (il segmento del DNA target viene marcato e scisso e in seguito unito a un segmento di diversa origine) fra sequenze nucleotidiche complementari ossia fra le sonde fisse e la sequenza di acido nucleico bersaglio mobile in soluzione e marcata con un fluorocromo. Quando due sequenze complementari si "riconoscono" si formano legami idrogeno fra basi complementari e se la complementarità è completa la doppia elica viene mantenuta anche innalzando di poco la temperatura. Mediante una luce laser si evidenzia la fluorescenza che viene rilevata ed elaborata sotto forma di un'immagine dai sistemi informatici collegati, i quali in tal modo misurano con precisione la

quantità di sonda legata in ciascuna posizione del vetrino e generano un profilo di espressione genica per ogni tipo cellulare.

La misura dell'espressione genica mediante microarray riveste un notevole interesse sia nel campo della ricerca di base sia nella diagnostica medica in particolare di malattie a base genetica dove l'espressione genica di cellule sane viene comparata con quella delle cellule malate.

Il DNA bersaglio può essere anche un cDNA (DNA complementare) ossia **DNA** a doppia elica sintetizzato a partire da un campione di RNA messaggero maturo. In tal modo i microarray permettono l'analisi dell'espressione genica monitorando in una sola volta gli RNA prodotti da migliaia di geni. Gli mRNA vengono prima estratti dalle cellule, convertiti in cDNA tramite l'enzima trascrittasi inversa per poi proseguire nel solito procedimento di marcatura e ibridazione inversa con sonda fissa e nota.

Le principali applicazioni dei microarray sono l'analisi dei polimorfismi SNP, il confronto di popolazioni di RNA di cellule diverse, lo screening di sequenze senso e antisense nella ricerca degli oligonucleotidi usati in campo farmaceutico, utilizzo in nuove metodologie di sequenziamento del DNA.



Epigenetica, Nutrigenetica e -omica

Epigenetica

Descrizione

L'epigenetica rappresenta una scienza in continua evoluzione dall'inizio del nuovo secolo grazie a innumerevoli studi scientifici. C.H. Waddington e D.L. Nanney hanno definito l'epigenetica: "*Lo studio dei cambiamenti dell'espressione genica, reversibili o irreversibili, che non dipendono da mutazioni del DNA e che possono essere anche ereditabili (eredità di tipo mitotico o, se riguardanti le cellule germinali, di tipo meiotico); l'assetto del DNA resta tale ma varia l'espressione genica*". L'epigenetica rappresenta quindi una branca della genetica che si occupa dei cambiamenti fenotipici ereditabili da una cellula o un organismo, in cui non si osserva una variazione del genotipo. Intendiamo infatti oggi per **epigenetica** lo studio della diversità fenotipica che non comporta differenze del relativo genotipo.

Nell'uomo sono presenti circa 200 tipi di cellule diverse per forma, funzione, struttura. I tipi cellulari condividono quasi tutti lo stesso genoma ma rispondono a stimoli interni ed esterni in modo estremamente diverso quindi presentano una identità diversa pur avendo lo stesso genoma ossia possiedono epigenomi che permettono di effettuare programmi di espressione genica differenti. Se il genoma è l'insieme delle istruzioni che consentono la costruzione e il funzionamento di un organismo vivente, l'*epigenoma* è l'insieme dei processi che consentono a

GENOMA = DNA



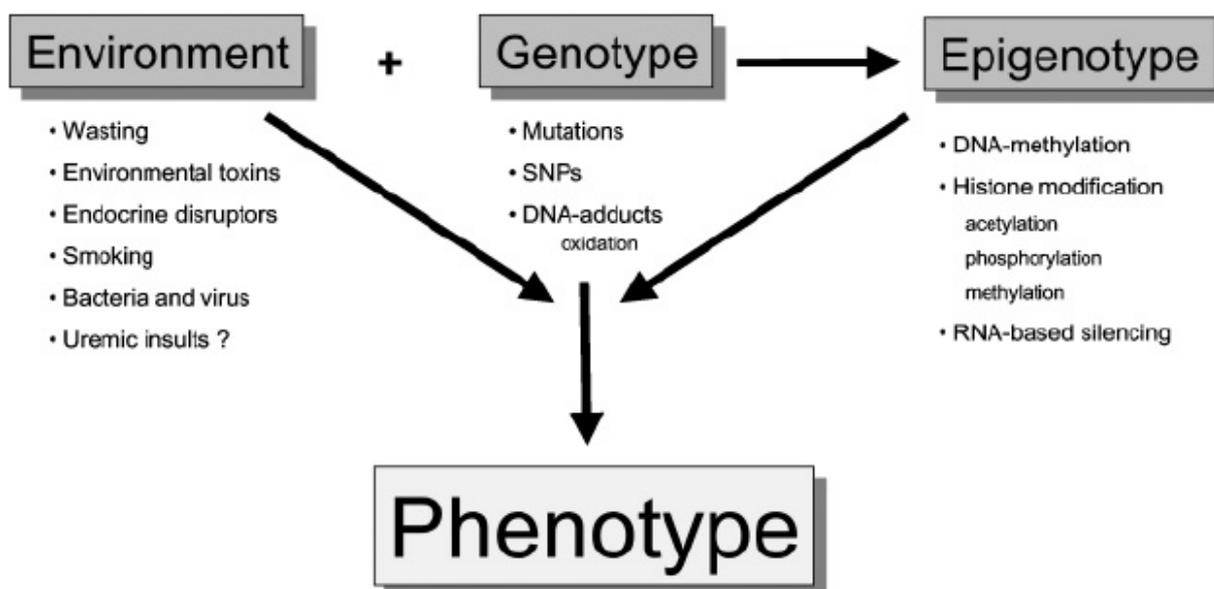
EPIGENOME = sopra al DNA



queste istruzioni di essere lette nei tessuti giusti e nel momento opportuno, anche in risposta a stimoli che provengono dall'ambiente. Con epigenoma si intende quindi l'insieme dei fenomeni che comportano e regolano questo tipo di modifiche del DNA ossia della sua espressione e non della sua sequenza. In un certo senso, l'epigenoma rappresenta il software di controllo del "hardware genoma", ossia il flusso di informazioni, provenienti dall'ambiente o dall'interno dell'organismo, che interagisce con le informazioni codificate nei geni.

La *segnatura epigenetica* descrive i meccanismi, reversibili o irreversibili, ereditari o non ereditari, attraverso i quali l'espressione di un gene viene favorita o inibita; è l'epigenoma a regolare quale gene debba essere attivato o silenziato e questo è di grande interesse sia

nell'ambito della prevenzione (es. delle patologie cronico-degenerative) sia terapeutico. Le modifiche epigenetiche sono quindi specifiche “impronte” che coinvolgono meccanismi molecolari in grado di alterare o determinare l’attività di un gene ma non la sua sequenza nucleotidica definita nel DNA. Il fenotipo è quindi determinato non dal genotipo in sé, ma dalla sovrapposizione a esso di “un’impronta” che ne influenza il comportamento funzionale. Il meccanismo epigenetico che porta dal genotipo al fenotipo è sotteso a un complesso network di concatenati fattori e reazioni chimico-fisiche.



Va innanzitutto considerato che circa il 90 % del DNA è coinvolto nella espressione genica e non nella codificazione di proteine; non è quindi assolutamente da considerarsi, come si faceva in passato, “DNA spazzatura”. La stessa sintesi proteica avviene secondo complessi riarrangiamenti del DNA che escludono la semplificazione 1 gene → 1 proteina. I geni si esprimono concertandosi in “complessi” o “batterie” relazionandosi con altre porzioni di DNA. I fattori ambientali giocano un ruolo essenziale all’interno di questo equilibrio dinamico definito “omeoresi”: equilibrio tra fattori endogeni ed esogeni che porta all’espressione fenotipica finale. Le potenzialità rappresentate dal genotipo si possono quindi esprimere concretamente solo mettendosi in relazione con l’ambiente (cellulare ed extracellulare); per ogni ambiente sarà così possibile una diversa e specifica manifestazione fenotipica.

È stato dimostrato che la cellula può vivere e funzionare bene anche se il nucleo viene rimosso. Il vero cervello della cellula risulta così essere la membrana; essa reagisce e risponde alle influenze esterne adeguandosi in modo dinamico a ogni cambiamento dell’ambiente. Questo significa che la trasmissione genetica, a cui la scienza ha sempre riconosciuto il ruolo primario

nella trasmissione delle malattie, è responsabile della nostra salute e malattia soltanto marginalmente ossia per circa il 5%. I nostri geni sono anche sotto il controllo del sistema di credenze e convinzioni trasmesso dal sistema familiare e dalle influenze ambientali principalmente nei primi 6 anni di vita. Se in seguito a una percezione ho sviluppato una convinzione inconscia, la mia biologia si “aggiusta” su quella particolare convinzione. Credenze e programmi inconsci sono quindi in buona parte responsabili della nostra salute, di come ci sentiamo e percepiamo il mondo. In altre parole sperimentiamo ciò che crediamo. In tutto ciò le emozioni positive rivestono un ruolo primario in primo luogo relativamente alla plasticità encefalica, ossia la capacità del cervello di riorganizzarsi e rigenerare le proprie cellule, e all’attivazione dei lobi frontali. La zona dei lobi frontali e prefrontali del cervello pensante assume in quest’ottica un nuovo ruolo. Questa parte della neocorteccia, che riguarda alcune forme di ragionamento e l’attivazione di certi tipi di emozioni positive, ha dimostrato di poter intervenire a ridimensionare e inibire le reazioni istintive e spesso eccessive dell’amigdala legate agli antichi programmi di sopravvivenza. Aumentando le nostre capacità di riconoscimento (consapevolezza), ad es. con l’ausilio di pratiche come la meditazione, si accresce l’attivazione dei lobi frontali, il che può favorire certi tipi di emozioni positive. Questi nuovi percorsi neuronali vanno a sostenere abitudini più sane e consapevoli e potenziano i lobi frontali. Modificare con la consapevolezza il nostro sistema di convinzioni e credenze, così che la mente possa svolgere un ruolo positivo e creativo di sostegno alla persona, può pertanto influenzare la nostra intera biologia e il DNA. Al contempo si conferma invece il ruolo negativo dello stress cronico (distress). Va infine considerata la possibile trasmissione epigenetica transgenerazionale (con quindi conseguenze anche sulla prole).

Esistono quindi diversi fattori in grado di modulare l’espressione genica:

- stato psico-emotivo
- inquinanti ambientali
- nutrienti e integratori

Alcuni processi cellulari, modulabili epigeneticamente da nutrienti, sono fondamentali per la salute cellulare nonché per prevenire e combattere i processi degenerativi:

- *autofagia*: processo fisiologico che, contrastando l’accumulo età-dipendente di proteine e organelli alterati, rinnova il citoplasma favorendo la depurazione dei tessuti (drenaggio naturale) e quindi la longevità; si manifesta grazie all’attivazione di proteine come le sirtuine e può essere stimolata anche dalla restrizione calorica.
- *apoptosi cellulare programmata*: evento fisiologico di morte cellulare programmata, ben distinto dalla necrosi cellulare, che garantisce l’omeostasi tissutale portando alla eliminazione

delle cellule in cui le funzioni degli acidi nucleici si svolgono in modo anomalo, contribuisce inoltre al mantenimento del numero di cellule proprio di un sistema, consente quindi la rigenerazione tissutale e il disegno della corretta architettura dei tessuti in via di sviluppo (è favorita dall'espressione di proteine pro-apoptotiche come Bax e dall'azione dell'enzima caspasi).

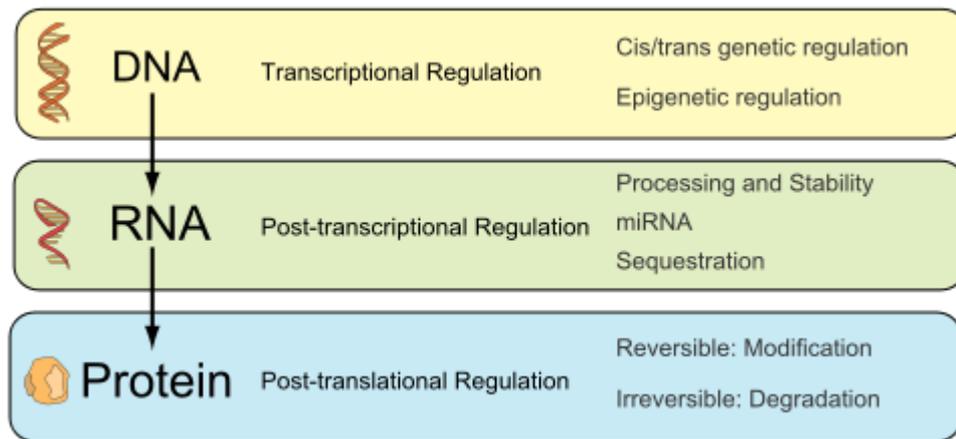
Dall'equilibrio e dalla giusta regolazione reciproca dei processi di autofagia e apoptosi risulta il corretto mantenimento della omeostasi o la malattia. Una inibizione o un ostacolo a questi processi di rinnovamento cellulare, come quello operato dalle mTOR, può portare a processi antagonisti ossia a una reazione infiammatoria cronica di basso livello che si accompagna a fenomeni di necrosi e a malattie cronico-degenerative.

mTOR (mammalian target of rapamycino) o enzima protein-chinasi fosforila gli aminoacidi serina e treonina e integra tutte le informazioni provenienti dai nutrienti (glucidi, lipidi, proteine, fibre, acqua, vitamine e minerali) e dai fattori di crescita, ovvero proteine capaci di stimolare la proliferazione e il differenziamento cellulare (IGF-1, IGF.2), diventando in questo modo il centro di controllo della crescita, del metabolismo e della longevità delle cellule sane; regola la crescita, la proliferazione, la motilità e la sopravvivenza delle cellule, la sintesi e la trascrizione proteica.

Meccanismi Epigenetici

Comprendere la diversità dei tessuti umani risulta quindi fondamentale nello studio della malattia e richiede il collegamento tra informazioni genetiche, identiche nella prevalente parte delle cellule di un individuo, e meccanismi epigenetici che potrebbero avere ruoli specifici per ogni tessuto. La metilazione del DNA nei tessuti umani presenta una situazione complessa, con modelli di metilazione specifici per il tessuto.

La regolazione dell'espressione genica negli Eucarioti agisce a vari livelli.



La regolazione epigenetica consiste in cambiamenti della struttura della cromatina in seguito a:

- Associazione con proteine e RNA non codificanti;
- Metilazione;
- Varanti istoniche all'interno del nucleosoma;
- Modificazioni post traduzionali delle code istoniche.

ncRNA - RNA non codificante è un trascritto genico che non va incontro a traduzione; il gene che codifica per tale RNA non codifica per una proteina ma semplicemente per una molecola di RNA (e non un mRNA). RNA non codificante può svolgere diverse funzioni: RNA ribosomiale (rRNA), RNA transfer (tRNA), RNA componente di complessi enzimatici implicati nei processi di trascrizione, replicazione, splicing e in altri processi riguardanti l'espressione genica.

Tra gli RNA non codificanti vi sono i *Long Non Coding RNA (lncRNA)*, trascritti lunghi più di 200 nucleotidi, che sembrano essere coinvolti in molti meccanismi biologici (splicing, stoccaggio di mi-RNA, processi trascrizionali e post-trascrizionali) e tutta una serie di patologie a essi associate. In particolare, riferendosi ai meccanismi epigenetici, essi sono in grado di reclutare DNA-metiltransferasi e modificare in questo modo il pattern epigenetico a vari livelli. Questo limite alquanto arbitrario di 200 nucleotidi distingue ncRNA lunghi da piccoli RNA non codificanti (Short o Small non coding RNA - sncRNA) come microRNA (miRNA), piccoli RNA interferenti (siRNA), RNA che interagiscono con Piwi (piRNA) e altri RNA corti.

RNA interference (RNAi) rappresenta un fenomeno naturale (avviene sia in piante e animali) di regolazione dell'espressione genica mediato da alcuni frammenti di RNA in grado di

interferire e “spegnere” l'espressione genica. La RNAi si distingue da altri fenomeni di silenziamento genetico, dal momento che in *Caenorhabditis elegans* (verme nematode fasmidario) e nelle piante è stata osservata essere in grado di diffondere da cellula a cellula e di essere ereditabile. Ciò è stato osservato anche nei mammiferi ma con minore efficienza e solo nei primi stadi dello sviluppo embrionale. E' stato ipotizzato che RNAi possa stabilizzare i genomi regolando le sequenze ripetute come gli elementi mobili (trasposoni) prevenendone la loro trasposizione ed espressione e quindi i potenziali problemi genomici derivabili.

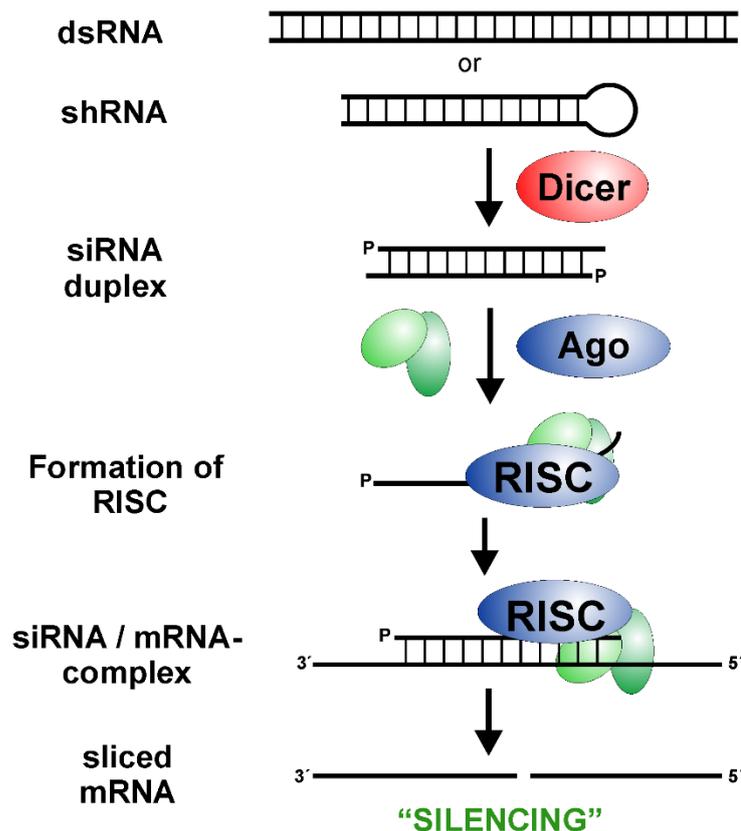
Si distingue tra meccanismi coinvolgenti molecole a doppio filamento, RNA interference in senso stretto, mediate da molecole come short interfering RNA (siRNA), e fenomeni coinvolgenti RNA a singolo filamento.(miRNA, piRNA).

I *siRNA* (*Short or Small Interfering RNA*) sono molecole di natura esogena, (proveniente dall'esterno della cellula tramite vettori) a doppio filamento lunghe 21- 25 nucleotidi di cui due protrudenti all'estremità 3'. I siRNA derivano da precursori ds RNA più lunghi che vengono riconosciuti e tagliati dall'enzima endonucleasi Dicer (coinvolto anche nel processamento dei miRNA). In seguito a tale processamento i siRNA sono incorporati nel complesso multiproteico RISC (RNA Induced Silencing Complex) che guida il legame tra il siRNA e lo specifico mRNA con conseguente degradazione di quest'ultimo. L'effetto finale di tale processo è il silenziamento dell'espressione di un determinato gene. In questo caso si parla di silenziamento post-trascrizionale (PTGS - Post Transcriptional Gene Silencing). In alcuni casi i siRNA possono regolare l'espressione genica anche attraverso l'inibizione della trascrizione inducendo modificazioni epigenetiche del DNA (TGS - Transcriptional Gene Silencing).

Le funzioni principali dei siRNA sono di difesa contro le infezioni considerate virali e di regolazione degli elementi trasponibili (tramite l'appaiamento perfetto con i trasposoni).

I siRNA sono quindi coinvolti anzitutto nel pathway della RNA interference, conducendo all'interferenza dell'espressione di specifici geni con sequenze nucleotidiche complementari, degradando l'mRNA dopo la trascrizione impedendo la traduzione, silenziando elementi genetici mobili, modellando la struttura della cromatina ecc.

I siRNA possono derivare anche dagli shRNA (Short or Small Hairpin RNA), piccole molecole di RNA artificiale a forma di forcina per capelli. L'espressione di shRNA, a scopo medico, nelle cellule viene tipicamente ottenuta mediante il rilascio di plasmidi o attraverso vettori virali o batterici.



I *miRNA* (*micro-RNA*) sono piccole molecole (lunghe circa 20-22 nucleotidi) a singolo filamento non codificanti sintetizzate in forma non matura, da specifici geni appartenenti a introni (la loro trascrizione avviene sotto controllo della RNA polimerasi), e subiscono un processo di maturazione in parte nel nucleo e in parte nel citosol.

I miRNA sono principalmente attivi nella regolazione dell'espressione genica, a livello trascrizionale e post-trascrizionale, inducendone un silenziamento. I miRNA vengono inglobati nel complesso multiproteico di silenziamento indotto da RNA (RISC - RNA Induced Silencing Complex) il cui legame al mRNA target, tramite sovrapposizione per complementarità parziale nella regione 3', ne comporta una repressione della traduzione o la degradazione della molecola tramite:

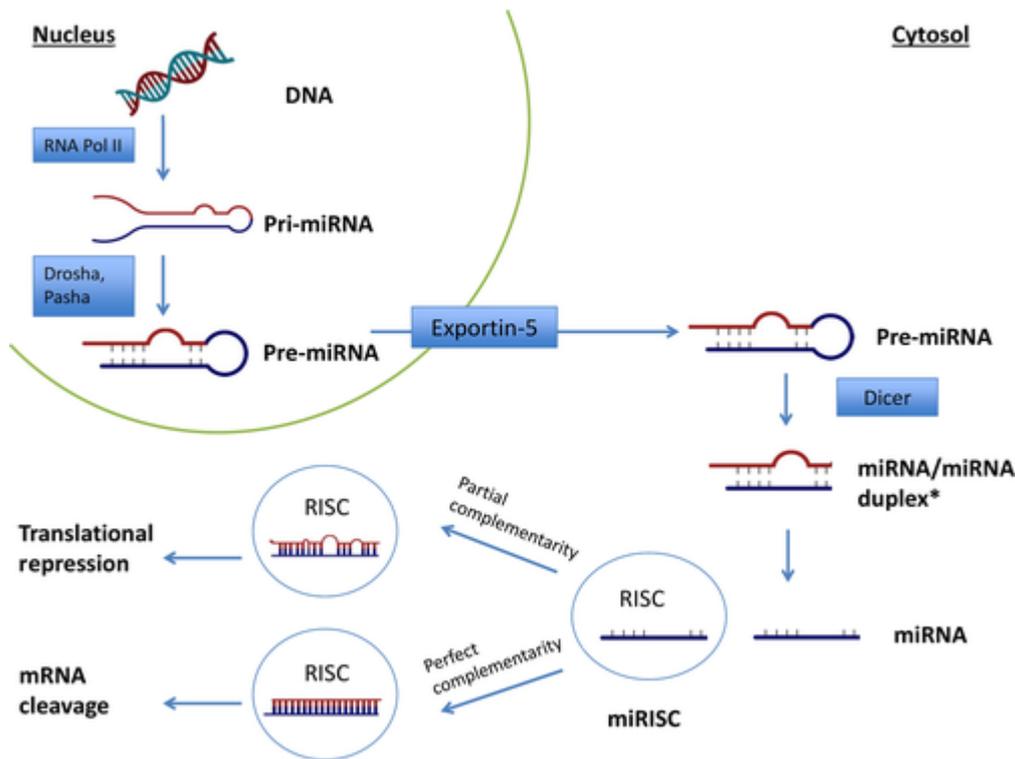
1. taglio della molecola di mRNA;
2. destabilizzazione della molecola di mRNA per accorciamento della coda di poli(A);
3. diminuzione dell'efficienza di traduzione del RNA messaggero

I miRNA ricordano i siRNA (small interfering RNA) ma ne differiscono perché derivano da regioni di RNA che si ripiegano autonomamente a formare corte forcine, mentre i siRNA derivano da sequenze di dsRNA più lunghe. I miRNA sono abbondanti in tutti i tipi di cellule

dei mammiferi. Non agendo per complementarità perfetta (come invece tendono a fare gli siRNA) possono inibire la traduzione di numerose diverse sequenze di mRNA e ciascuno di essi può avere diversi mRNA bersaglio.

Attualmente sono stati descritti nelle cellule umane ca. 2000 miRNA che, a loro volta, regolano l'espressione di numerosi RNA messaggeri bersaglio riducendone i livelli di espressione. I miRNAs sono di fatto essenziali per il normale sviluppo di tutti i tessuti in quanto controllano i più importanti processi biologici quali la crescita cellulare, il differenziamento, il metabolismo e l'apoptosi. In *Drosophila* il miR-14 previene la morte cellulare ed è richiesto per un normale metabolismo dei lipidi, miR-125b e il miR let-7 controllano la proliferazione cellulare, miR-181 è coinvolto nello sviluppo della linea ematopoietica dei linfociti B, miR-15a e miR-16-1 promuovono la sopravvivenza delle cellule immunitarie B, miR-375 è coinvolto nella secrezione dell'insulina e il miR-143 promuove lo sviluppo degli adipociti.

I miRNA sono implicati in numerose patologie e possono essere usati a scopo terapeutico. Essendo siRNA e miRNA infatti in grado di svolgere un ruolo epigenetico tramite il processo di silenziamento trascrizionale indotto dal RNA (RITS) e quindi nel controllo dell'espressione genica, risultano essere obiettivi importanti per l'uso terapeutico. I microRNA possono infatti diventare dei bersagli terapeutici o essere utilizzati come farmaci per un largo spettro di patologie. In recenti studi nei topi, la somministrazione di oligoribonucleotidi modificati complementari alla sequenza del microRNA (antagomir) ha inibito l'espressione del microRNA con promettenti risvolti terapeutici. Inoltre in futuro potranno essere utilizzati anche come marker prognostici di patologie.



Nutrigenetica e Nutrigenomica

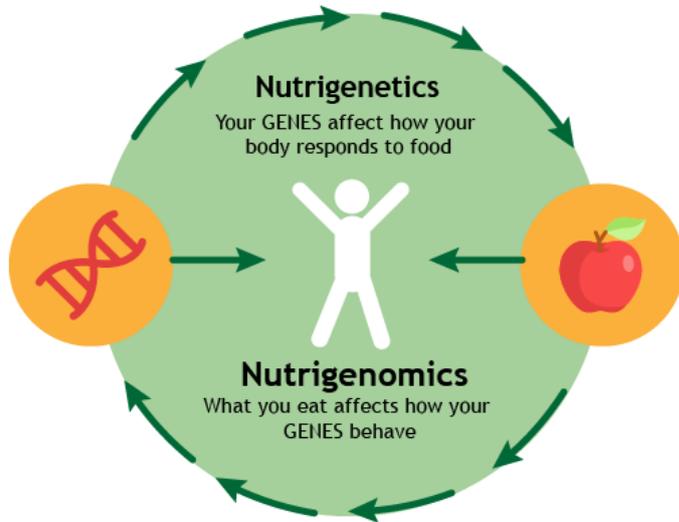
Introduzione

Il rapporto tra cibo e medicina è stato da sempre oggetto di studio. La conoscenza delle esigenze alimentari umane è cresciuta enormemente dall'inizio del XX secolo. I prodotti alimentari sono diventati sempre più funzionalizzati e realizzati su misura per gruppi specifici. Il progetto Genoma e il progetto SNPs hanno chiarito che tra i genomi dei singoli individui esistono milioni di piccole differenze che condizionano fortemente le caratteristiche dei tessuti, degli organi e delle cellule umane e che determinano la predisposizione di un soggetto a rispondere ad una determinata dieta con influenze più o meno positive.

Descrizione

La *nutrigenetica* studia l'influenza della variabilità genetica ossia dei polimorfismi riguardo il metabolismo dei nutrienti.

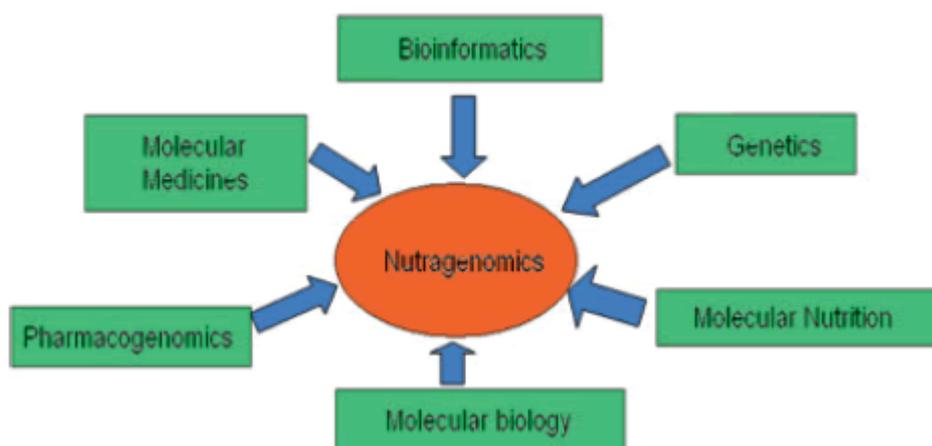
La *nutrigenomica* o *genomica nutrizionale* studia come i nutrienti influenzano l'attività del



genoma regolando in maniera “up” o “down” alcuni geni (includere le modifiche che l'alimentazione della madre apporta al metabolismo del feto e quindi al nascituro).

La nutrigenetica riguarda quindi principalmente l'interazione tra i geni di un individuo e la sua dieta. La nutrigenomica studia l'effetto del cibo e dei suoi costituenti sull'espressione genica. Ciò significa che la

nutrigenomica è la ricerca che si focalizza sull'identificazione e la comprensione dell'interazione a livello molecolare tra sostanze nutritive e altri bioattivi alimentari con il genoma. I nutrienti, oltre che esplicitare un effetto nutritivo, influenzano l'espressione di geni, la sintesi o la demolizione di proteine, attivando o inibendo vie metaboliche. Compito della nutrigenomica è quello di esaminare tali processi. La nutrigenomica è quindi una scienza multidisciplinare che combina la genetica con la nutrizione cercando di svolgere un attivo ruolo preventivo in difesa dell'organismo tramite appunto l'applicazione di tecniche genomiche a problemi nutrizionali e alimentari.

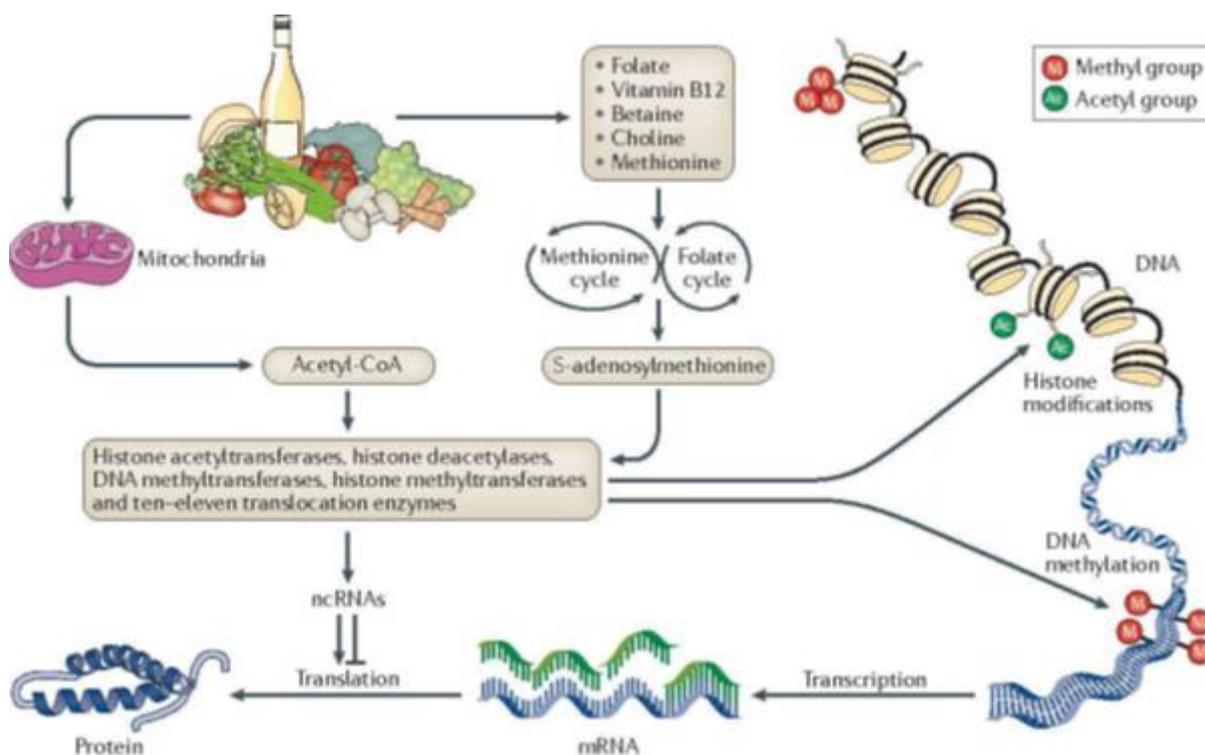


La scienza nutrigenomica possiede in definitiva aperto una nuova frontiera e ha creato un nuovo approccio scientifico imperniato sulla prevenzione e sulla diagnosi genetica combinate insieme.

Nutrigenetica e nutrigenomica possono essere utilizzate per guidare le decisioni riguardanti l'integrazione dei nutraceutici nelle diete personalizzate. Ciò è prezioso soprattutto per aiutare a superare specifici deficit nutrizionali associati ad anomalie genetiche. L'emergere di nutrigenetica e nutrigenomica ha offerto enormi opportunità per la traduzione del progresso scientifico in benefici per il consumatore. Una corretta e mirata nutrizione unita alla diversità genotipica di ciascun individuo ha chiarito le linee guida per la prevenzione a un vasto numero di patologie e ha permesso lo sviluppo di nuove terapie sperimentali coadiuvanti la cura e il miglioramento di malattie complesse. Nell'ultimo decennio si sono moltiplicati gli studi e le ricerche in campo nutrigenetico e nutrigenomico attraverso l'elaborazione di test genetici volti a svelare le mutazioni responsabili di alcune delle più comuni e gravi patologie, quale diabete, ipercolesterolemia, intolleranze alimentari e il cancro, ma anche attraverso un'attenta indagine sui benefici che alcune categorie di alimenti apportano se introdotti preferenzialmente nella dieta. Il continuo studio dell'impatto della composizione genetica umana sul cibo e degli effetti dei costituenti alimentari sull'espressione genica rafforza le basi genetiche delle diete personalizzate.

Effetti della dieta sui principali processi epigenetici

La regolazione epigenetica dell'espressione genica può verificarsi a livello della trascrizione, tramite metilazione del DNA e/o modificazioni dell'istone, e livello della traduzione tramite RNA non codificanti.



Nutraceutici

Il nutraceutico è una sostanza alimentare che aiuta a mantenere la salute e prevenire le malattie. Il termine nutraceutico è stato introdotto nel 1989 dal medico americano Stephen L. DeFelice. I nutraceutici sono fondamentali per il concetto scientifico di dieta personalizzata, in cui fattori come l'età, la composizione corporea, lo stato nutrizionale e l'attività fisica vengono considerati insieme alla costituzione genetica quando si valutano le esigenze nutrizionali di un individuo. Quest'area di ricerca è strettamente legata alla nutrigenetica e alla nutrigenomica.

Il termine nutraceutico viene talvolta usato in modo intercambiabile con i termini “cibo funzionale” e “integratore alimentare” sebbene esistano distinzioni fra essi. Gli alimenti funzionali sono alimenti normalmente consumati nella dieta con benefici scientificamente comprovati per la salute. Gli integratori alimentari sono preparati ingeribili appositamente aggiunti alla dieta a beneficio della salute senza essere necessariamente derivati dagli alimenti. I nutraceutici sono prodotti con funzioni biologiche che derivano solo dagli alimenti e che in genere vengono consumati, come per gli integratori, in una forma che ricorda un medicinale. Queste distinzioni tuttavia sono complicate dal fatto che molte sostanze rientrano in tutte e tre le categorie (es. beta-carotene).

Una vasta gamma di prodotti viene commercializzata come nutraceutici, questi includono vitamine e minerali essenziali, acidi grassi polinsaturi e monoinsaturi e una varietà di prodotti a base di erbe (es. fitoestrogeni), cibi con aggiunta di nutrienti o "funzionalizzati" (es. latte con

aggiunta di vitamina D, yogurt probiotico e prebiotico, prodotti progettati per determinati gruppi, quali atleti, donne in gravidanza e in allattamento ecc.) e, secondo alcuni, anche alcuni alimenti geneticamente modificati.

Una critica fondamentale ai nutraceutici è legata al loro potenziale utilizzo come sostituto di dieta e stile di vita sani. L'aggiunta di nutraceutici alla dieta può essere un modo per sviluppare una dieta sana. Tuttavia aggiungere nutraceutici alla dieta è tutt'altro che banale. Lo sviluppo e l'uso dei nutraceutici rientrano in un più ampio dibattito sull'adattamento dell'apporto alimentare del genere umano al cambiamento delle condizioni ambientali, degli stili di vita e del crescente scambio globalizzato di prodotti e idee.

Obiettivi

Glossario 1

Nutrigenomica: Studio dell'effetto della dieta sulla stabilità del DNA e sull'espressione genica.

Nutrigenetica: Studio dell'effetto delle differenze genetiche tra individui nella loro risposta a specifici pattern dietetici

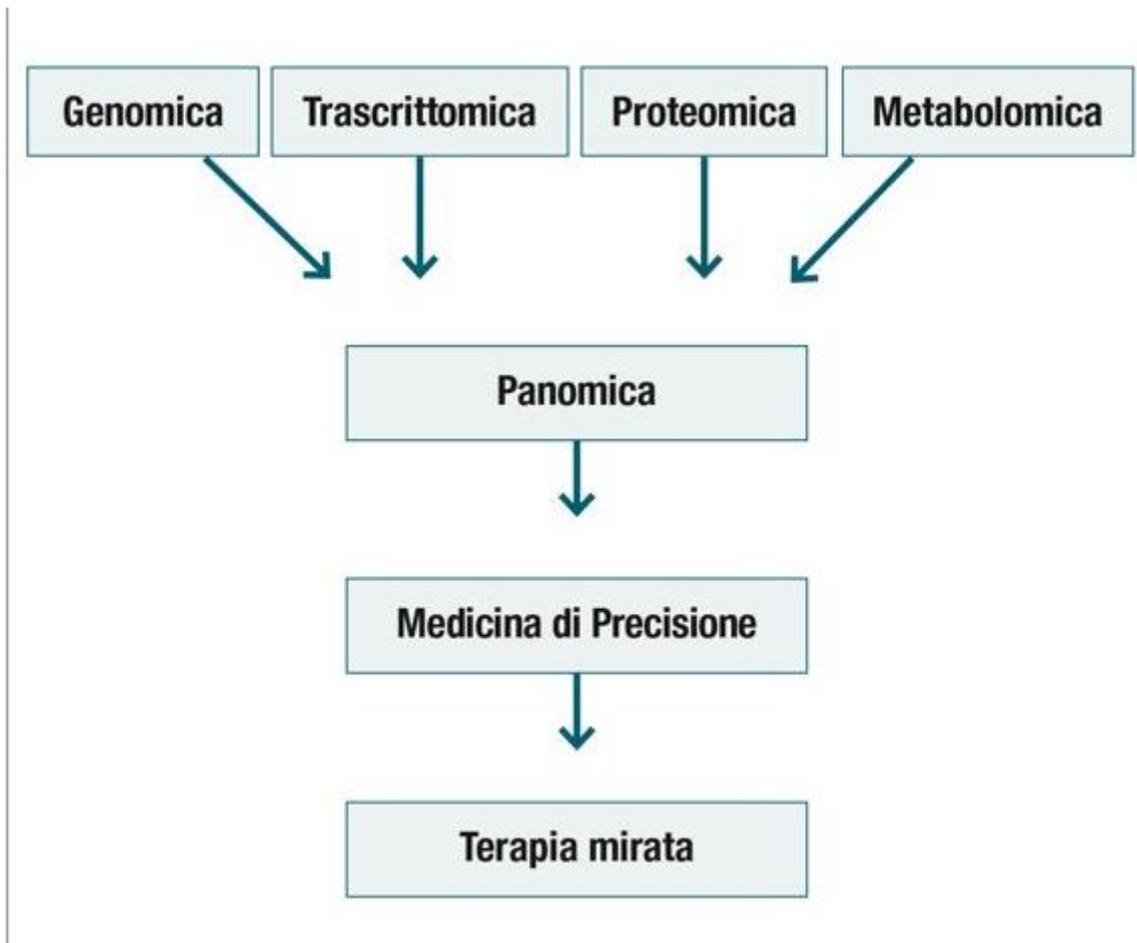
Nutritrascriptomica: Studio genomico dei livelli di espressione dell'mRNA in una cellula o in una popolazione di cellule in un determinato set di condizioni nutrizionali.

Nutriproteomica: analisi su larga scala di struttura e funzione di proteine e della loro interazione in una cellula per identificare i target molecolari dei componenti della dieta

Nutrimetabolomica: misurazione di tutti i metaboliti per definire la completa risposta metabolica di un organismo ad uno stimolo nutrizionale

6

La Nutrigenomica quindi, insieme alle altre scienze -omiche, mira a chiarire l'interazione tra geni e composti bioattivi provenienti da fonti esterne (alimentar, farmacologiche, ambientali). Gli SNP, o più in generale gli SNV (varianti di singolo nucleotide), termine che comprende sia alleli comuni sia a bassa frequenza, sono di gran lunga le variazioni genetiche più studiate nel campo della nutrizione e medicina di precisione.



Dieta ad personam (dieta personalizzata)

Elaborare una dieta ad personam (dieta personalizzata) ossia un regime alimentare adatta a un preciso soggetto in relazione ai suoi geni e in difesa del suo organismo, corrisponde a una dieta nutrigenetica.

Elaborare una lista degli alimenti in base alle seguenti caratteristiche:

- intolleranza genetica al lattosio;
- predisposizione alla celiachia (controllare graminacee, kamut, farro ecc.);
- utilizzo di crucifere;
- eliminare o diminuire i grassi saturi;
- limitare caffeina (per problemi cardiovascolari e osteoporosi);
- limitare zuccheri e aumentare le fibre ♦ aumentare antiossidanti.

Geni	Fattori Nutrizionali	Variante testata	Fenotipo intermedio	Patologie con cui è associata nella letteratura
5HTT (SLC6A4)	Adattamento allo stress	44bp ins	- Disturbi di sonno - Ansia - Irritabilità	- Depressione - Disturbo ossessivo compulsivo - Anoressia - Alcolismo
ACE	Sensibilità al sale	I / D	Iper-tensione	Malattie cardiovascolari
ADH5C	Sensibilità al alcool	rs14976	Livelli di HDL	Riduzione di malattie cardiovascolari
APOC3	Olio d'oliva (utilizzo)	C3375G	Livelli dei lipidi e TG	Malattie cardiovascolari
CYP1A2 *1F	Sensibilità caffeina	-163A>C	Metabolismo di caffeina lento	Infarto
VDR		0	Densità ossea	Osteoporosi
CYP1A2 *1F	Sensibilità cottura	-163A>C	Aumento nel danno al DNA	Tumori
GSTM1	Crucifere (utilizzo)	deletion	- Aumento nel danno al DNA - Aumento dei radicali liberi	- Tumori - Asma
IL6		G		- Malattie cardiovascolari
TNF	Inflamazione generale	G-308A	Livelli di colestrolo	- Diabete tipo 2 - Artrite - Allergie, asma - Osteoporosi
APOC3		C3375G		
LPL	Sensibilità grassi saturi	C3595G	Livelli dei lipidi e TG	Malattie cardiovascolari
MTHFR	Metabolismo Vitamine B	C677T	Livelli omocisteina	- Malattie cardiovascolari - Alzheimer - Depressione - Tumori - Osteoporosi
ACE	Sensibilità agli zuccheri e carboidrati raffinati	I / D		- Diabete tipo 2
PPARG		ProAla (12)	Glucosio ed insulina	- Sindrome metabolica
SOD2	Stress ossidativo - protezione dai radicali liberi	C-28T	- Livelli di radicali liberi - Danno al DNA	- Tumori
VDR	Metabolismo Vitamina D	C>T (tag1)	Densità ossea Resistenza all'insulina	- Osteoporosi - Diabete tipo 2
LCT	Sensibilità lattosio	-13920-CT	Metabolismo del lattosio	Intolleranza al lattosio
	Sensibilità glutine (morbo)			

Nel genoma umano, un numero elevato di geni viene coinvolto nell'obesità, ma il gene FTO (Fat mass and obesity-associated gene) è sicuramente uno dei più importanti. FTO è considerato il primo gene dell'obesità. Questo gene, ampiamente espresso in diversi tessuti fetali e adulti, si trova sul cromosoma 16 (16q12.2) e codifica per l'enzima diossigenasi dipendente dall'alfa-chetoglutarato. Questo enzima è coinvolto nella regolazione sia del controllo della termogenesi degli adipociti sia della loro differenziazione, contribuendo notevolmente all'accumulo di grasso corporeo. Esso inoltre contribuisce alla regolazione dell'omeostasi energetica e del metabolismo, aumentando anche l'assunzione di cibo. Fra le altre attività, infine, tale enzima è coinvolto nella riparazione del DNA e del RNA tramite demetilazione ossidativa. La variante FTO rs9939609 è una delle più note, 'è localizzata nel primo introne del gene, nel 2007, è stato associata per la primasa corporea. Studi hanno dimostrato che l'allele A di FTO rs9939609 è correlato sia a un indice di massa corporea sia a una circonferenza corporea maggiore. Inoltre, questo SNP è incluso tra i fattori etiologici genetici nello sviluppo sia della sindrome metabolica sia del diabete di tipo 2. Uno studio successivo ha evidenziato il fatto che i soggetti portatori di varianti alleliche di FTO rs9939973, rs8050136, rs1781749 e rs3751812 presentano un rischio inferiore di obesità seguendo un regime alimentare mediterraneo rispetto ai portatori del genotipo omozigote wild type.

OBESITY PANEL

GENE	FUNZIONE BIOLOGICA POSSIBILI	ALIMENTI/INTEGRATORI UTILIZZABILI
5HTT 44bp ins	VALUTAZIONE DELLO STRESS ALIMENTARE/AMBIENTALE CONTROLLO DELLA FAME	ALIMENTI E FORMULE VITAMINICHE E MINERALICHE SPECIFICHE PER ADATTATORE SS, LL, LS
DIO1 rs 2235544	VALUTAZIONE DELLA FUNZIONALITA' TIROIDEA VALUTAZIONE DEI METABOLISMI	UTILIZZARE ALIMENTI CHE FAVORISCONO LA FUNZIONALITA' TIROIDEA (es. alimenti ricchi di omega 3 e vitamina D , alimenti ricchi di beta- carotene , mentre ad es. evitare glutine, proteine della soia che possono ostacolare la funzionalità della ghiandola)
FTO rs9939609	VALUTAZIONE DELLA PREDISPOSIZIONE ALL'OBESITA'	DIETA MIRATA ATTIVITA' FISICA MIRATA
ADRB3 rs4994	VALUTAZIONE DELLA PREDISPOSIZIONE ALLA IPERLIPIEMIA, OBESITA' ADDOMINALE, INSULINO RESISTENZA RIDUZIONE DELLA SPESA ENERGETICA DEL TESSUTO ADIPOSO	ALIMENTI A BASSO INDICE GLICEMICO DIETA MIRATA
TCF7L2 rs7903146	VALUTAZIONE DELLA PREDISPOSIZIONE AL DIABETE	ALIMENTI A BASSO INDICE GLICEMICO DIETA MIRATA
ADRB2 Arg16Gly (A>G)	VALUTAZIONE DELLA PREDISPOSIZIONE A: IPERLIPIDEMIA, OBESITA', INSULINO RESISTENZA	ALIMENTI A BASSO INDICE GLICEMICO DIETA MIRATA

Ippocrate: *"Il cibo sia la tua medicina"*

La nutrigenomica non può prescindere dallo studio del microbiota e del relativo microbioma.

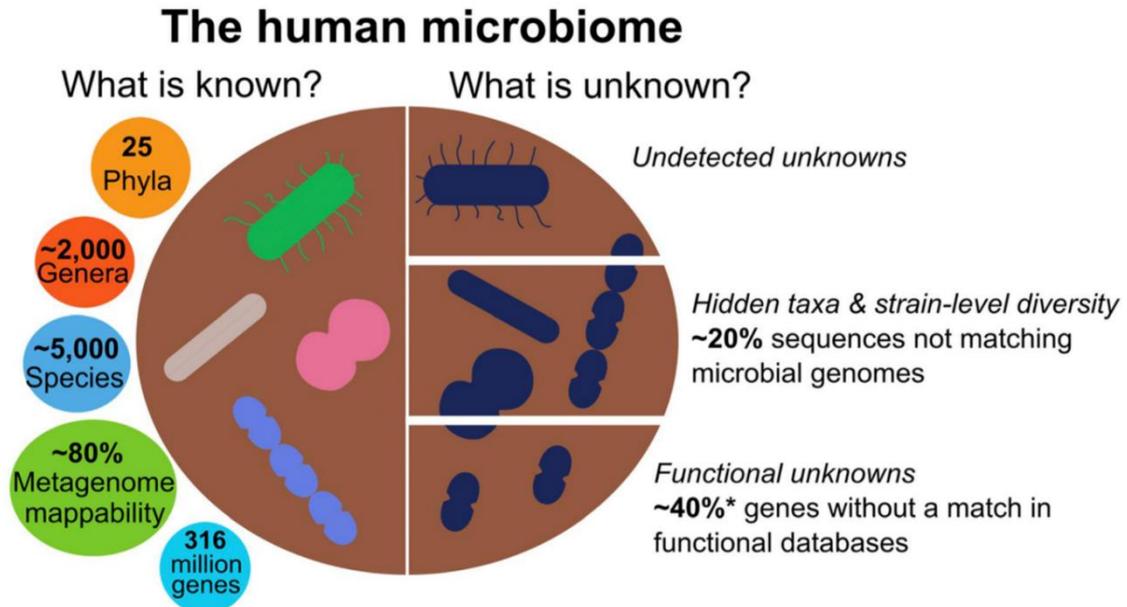
Microbiota e Microbioma

Descrizione

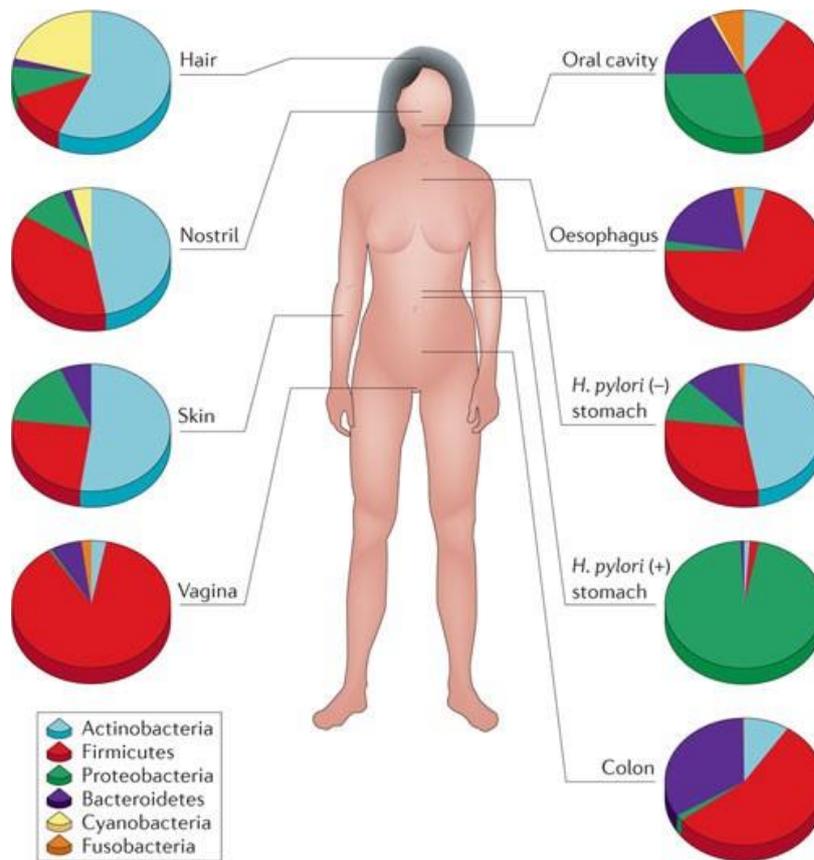
Gli esseri umani sono stati definiti organismi **olobionti** cioè entità biologiche risultanti dalla somma di contributi diversi: cellule umane e cellule microbiche, quest'ultime denominate microbiota e i relativi geni microbioma. L'*ologenoma* è l'insieme di genoma più microbioma. Il microbiota è rappresentato dall'insieme dei microrganismi (batteri, archei, eucarioti unicellulari ecc.) che convivono con l'organismo umano senza danneggiarlo (saprofiti) in condizioni di normale funzionamento del sistema immunitario. Fino a poco tempo fa la comunità scientifica ha sostenuto che, dal punto di vista numerico, gli organismi unicellulari che colonizzano l'*Homo sapiens* fossero in netta in maggioranza rispetto alle cellule umane:

circa 10.000 miliardi di cellule umane contro i circa 100.000 miliardi di cellule microbiche nel solo intestino (rapporto 1:10), Secondo un recente studio (Sender R., Fuchs S. et al, 2016), in una persona adulta di 70 Kg, il numero di cellule umane è dell'ordine di 3.0×10^{13} mentre i batteri presenti sono 3.8×10^{13} , con una massa totale di 0.2 Kg (rapporto ca. 1:1) ossia il nr. di cellule umane è ca. uguale al nr. di cellule microbiche.

Il microbiota umano è composto da una serie di ecosistemi presenti in varie regioni del corpo ognuno costituito da una o più comunità di diverse popolazioni di specie di organismi viventi che interagiscono reciprocamente tra loro e l'intero organismo realizzando un equilibrio dinamico. 316 milioni di geni complementare ai 40.000 del genoma umano con il quale si integrano realizzando un sinergismo mutualistico. Esiste una continua interazione tra noi e il microbioma che può fortemente influenzare il nostro stato di salute. Vari ricercatori i ritengono che questi microrganismi possiedano una tale influenza sulla nostra fisiologia che dovrebbero essere considerati parte integrante del stesso genoma. Di certo, comunque lo si voglia definire, molto della nostra fisiologia e della nostra salute dipende dal microbiota o microbioma, data l'impressionante quantità di sostanze da esso prodotte e/o metabolizzate.



Il microbiota colonizza praticamente ogni superficie dell'organismo umano in qualche modo in contatto con l'ambiente esterno: pelle (strati esterni e profondi), vie aeree, canale alimentare, vie urinarie.



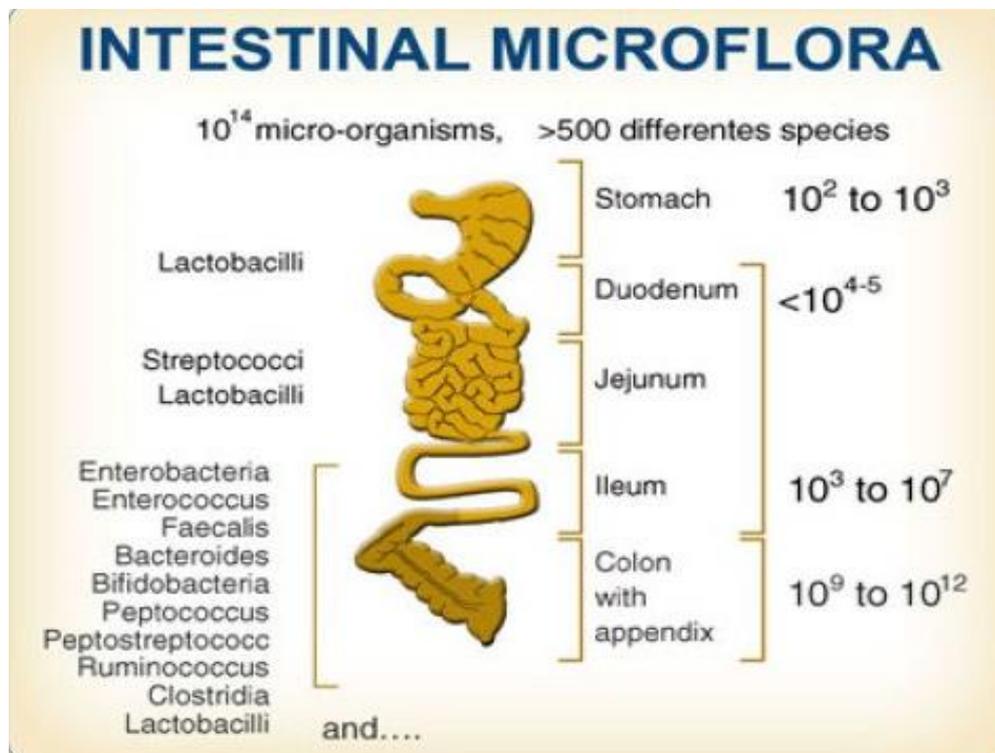
Nature Reviews | Genetics

L'apparato di gran lunga più ampiamente colonizzato è quello digerente: si stima che il colon da solo contenga più del 70% del microbiota totale. Ciò si deve sia alla sua estensione (l'intestino tenue è lungo circa 4-5 metri con una superficie di circa 300 metri quadrati) sia perché rappresenta un ambiente ideale per la colonizzazione di microrganismi contenendo tutti i tipi di substrato utili per la loro sopravvivenza e crescita.

La distribuzione e la composizione della microflora batterica è diversa nei diversi tratti del tubo gastroenterico. La carica microbica aumenta man mano che si avanza dallo stomaco verso il retto parallelamente alla componente anaerobica mentre diminuisce quella aerobica. Stomaco e duodeno sono relativamente poveri di germi, nell'intestino tenue il loro numero aumenta fino a raggiungere il massimo della colonizzazione, sia per numero sia per varietà, nel colon. Il tenue e le prime porzioni di colon sono colonizzate da specie batteriche aerobiche, nelle porzioni più distali del colon si trovano batteri anaerobi stretti o facoltativi che costituiscono la maggior parte del microbiota del sistema digerente.

La *flora batterica intestinale* è quindi composta principalmente da microrganismi anaerobi obbligati (che vivono esclusivamente in ambienti privi di ossigeno) e in misura minore da anaerobi facoltativi (che possono vivere con e senza ossigeno) e aerobi (che vivono solo in

presenza di ossigeno). A oggi ne sono state individuate ca. 35.000 specie diverse di cui le colonie più numerose sono rappresentate dalle specie Bacteroidetes e Firmicutes e, in misura minore, Actinobacteria, Fusobacteria e altre.



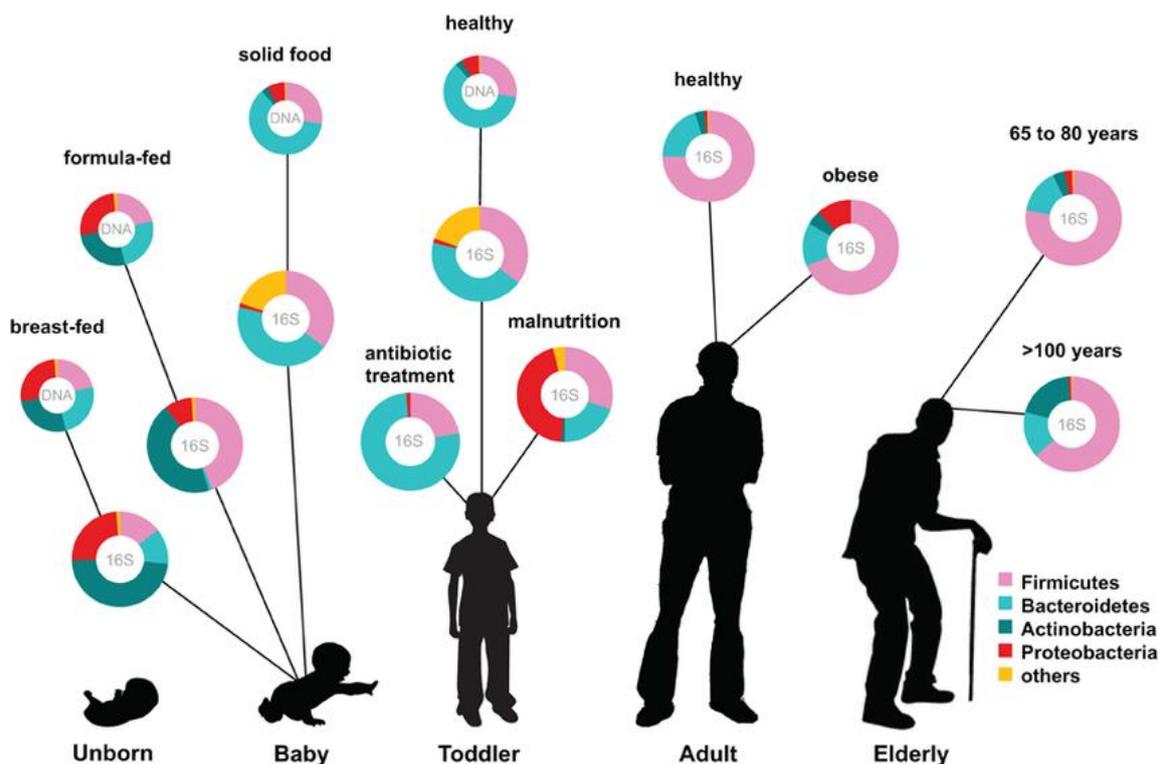
Ogni individuo possiede una sua specifica “*impronta digitale batterica*”, cioè un proprio profilo di specie. Esiste tuttavia un core di almeno 57 specie batteriche che può essere considerato comune a tutti. Nonostante le differenze infatti, alcuni ceppi batterici sono comuni alla maggioranza dell’umanità: Lactobacillus, Bifidobacteria, Escherichia, Bacterioides, Eubacteria, Clostridium.

Rispetto al genoma il microbioma risulta molto più dinamico, cambia da individuo a individuo e nello stesso individuo nel tempo continuando a evolvere in tutto il corso della vita in base ai cambiamenti che si susseguono nella composizione della flora batterica dovuti a numerosi fattori quali: tipo di parto e allattamento, antibiotici (in particolare nei nei primi 3 anni di vita), corredo genetico, alimentazione, età, patologie, terapie farmacologiche, situazione ormonale, stress, stile di vita, inquinanti ambientali, posizione geografica.

Il microbiota è assente nel feto, poco prima della nascita alcune specie di microrganismi acidofili provenienti dalla flora batterica intestinale materna colonizzano l’intestino del feto ma la vera e propria colonizzazione batterica inizia solo dopo la nascita (microbiota precoce); il microbiota del figlio è legato alla madre in quanto questa sua parte iniziale resterà immutabile

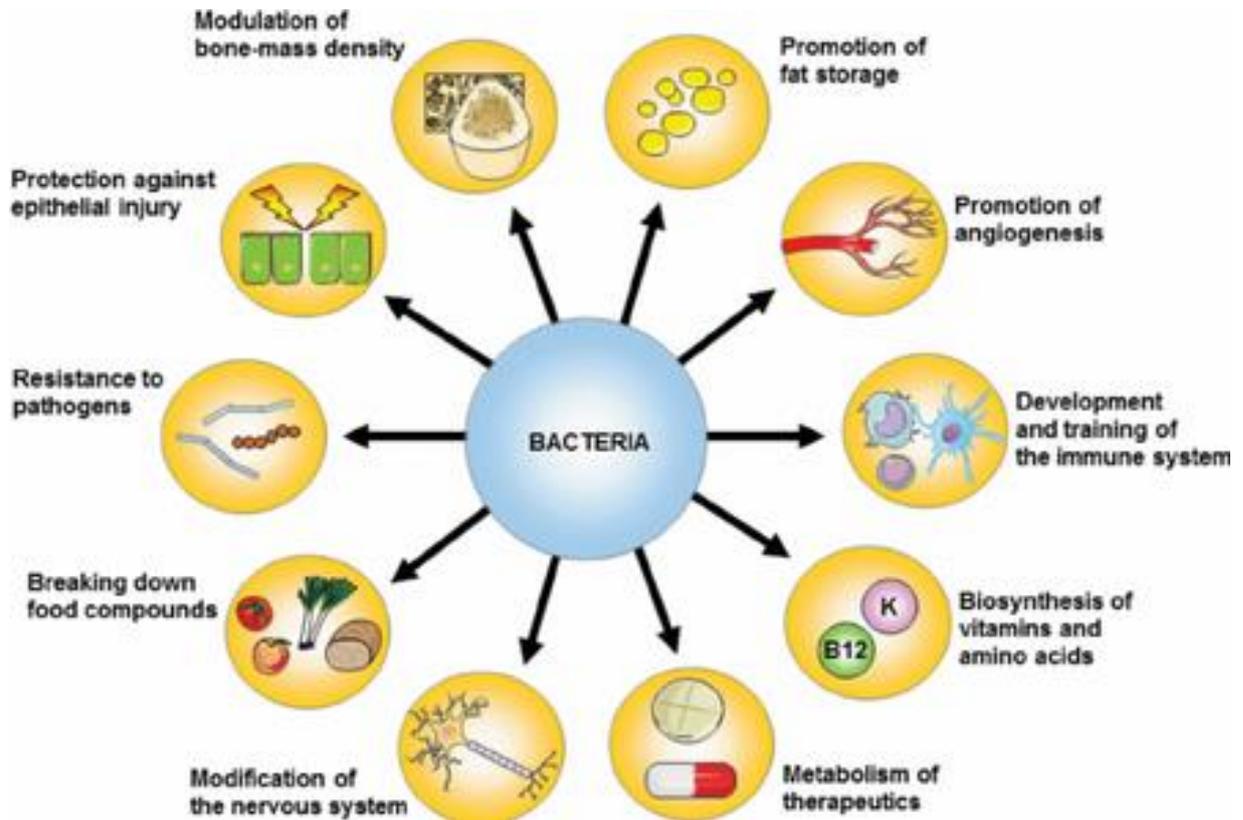
per tutta la vita. L'arricchimento del microbiota continua se il nascituro si allatta al seno. Il latte materno contiene una serie di oligosaccaridi del latte materno (HMO - Human Milk Oligosaccharides) che l'intestino del neonato non è in grado di metabolizzare e di cui si nutrono i batteri del suo intestino. Tali oligosaccaridi inoltre preparano il terreno per la successiva colonizzazione ad opera degli altri batteri intestinali che si verificherà con lo svezzamento. Tra questi i più importanti sono i Bacteroides che comprendono la maggior parte dei batteri che producono acidi grassi a catena corta (SCFA) a partire da fibre vegetali. Nei primi 4-36 mesi di vita, a seguito del contatto con i genitori, l'ambiente esterno e il cibo, il microbiota si sviluppa cambiando rapidamente. Ecco perché qualsiasi intervento sulla flora batterica in questa età, sia positivo sia negativo, assume un significato determinante in quanto lascia un segno indelebile su quello che sarà il microbiota dell'adulto (una specie di imprinting).

A seguito del parto cesareo il microbiota risulta molto più simile a quello della pelle della madre (presenza di Stafilococchi) ed è molto più facile che il bambino presenti immaturità del sistema immunitario e disturbi digestivi. Il microbiota di neonati partoriti con parto cesareo e/o di allattati artificialmente oltre ad apparire profondamente diverso impiega più tempo a stabilizzarsi; il microbioma acquisito diviene stabile a 1-2 anni. Esso arriva allo stato di massimo sviluppo tra i 20 ed i 40 anni di età per poi iniziare un lento processo di involuzione con il sopraggiungere della vecchiaia in cui il microbiota presenta bassa biodiversità, aumento dei Patobionti proinfiammatori e dei Batteri proteolitici (e del con conseguente fenomeno della putrefazione), diminuzione dei Batteri saccarolitici. Negli anziani diminuiscono i Bifidobatteri, aumentano i Staphylococcus, Enterobacteriacee, Bacteroides, Streptococcus, Clostridium

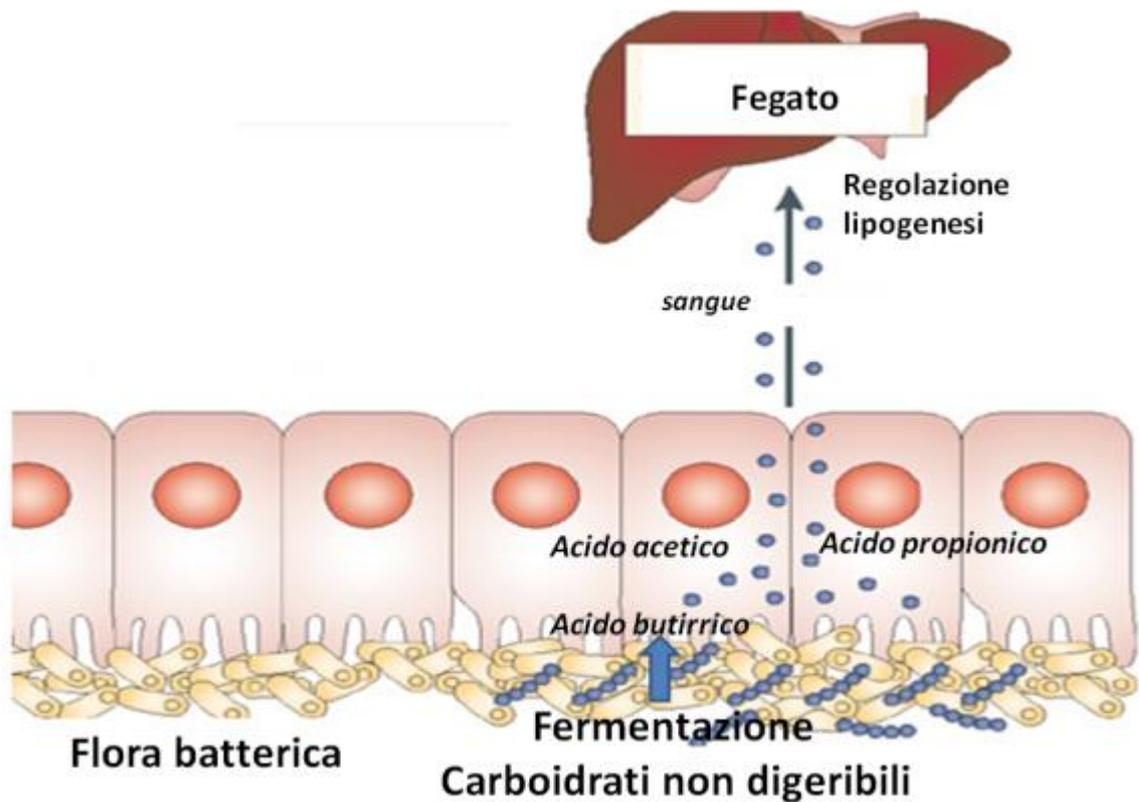


Funzioni del Microbiota

In genere i vari germi presentano funzioni diverse e complementari, anche batteri della stessa specie però possono svolgere funzioni molto diverse. Addirittura all'interno della stessa specie possiamo ritrovare ceppi molto patogeni e ceppi assolutamente salutari, Un esempio interessante è l'Escherichia coli Nissle 1917: oltre a non essere patogeno, risulta essere l'unico in grado di contrastare direttamente ed efficacemente i numerosi ceppi patogeni della sua stessa specie.



Nel suo ruolo *epigenetico* il microbiota influenza l'espressione di un'ampia gamma di geni dell'ospite. Attraverso il tessuto mucoso intestinale alcune specie di batteri possono influenzare l'espressione di geni coinvolti nell'assorbimento dei nutrienti o nella funzione immunitaria. Alcune sostanze generate dai batteri intestinali possono entrare nel flusso sanguigno: ad esempio, gli acidi grassi a catena corta (prodotti dalla fermentazione dei polisaccaridi) possono regolare l'espressione genica della lipogenesi nel fegato e le tossine come i lipopolisaccaridi (LPS) possono influenzare i geni correlati all'infiammazione.



Dal punto di vista *metabolico*, il microbiota svolge un importante ruolo nell'assimilazione dei carboidrati non digeribili (fibre vegetali: pectine, oligofruzzosi, inulina, cellulosa, amido resistente e betaglucani) tramite la fermentazione operata dagli enzimi batterici da cui derivano acidi grassi a catena corta, quali acido acetico, propionico, valerico, isobutirrico e butirrico (oltre ai gas CO₂, CH₄, H₂), che prevengono l'atrofia della mucosa e potrebbero avere effetti positivi nella prevenzione del cancro al colon. Studi recenti hanno evidenziato che gli acidi a catena corta, dopo essere stati assorbiti a livello intestinale, esercitano ruoli fisiologici anche nel fegato e nei tessuti extraepatici.

L'acido acetico, utilizzabile come substrato per lipogenesi e gluconeogenesi e come regolatori dell'introito e del metabolismo energetico (Lin et al. 2012), è un precursore del colesterolo e favorisce la produzione del colesterolo LDL. L'acido propionico annulla l'effetto ipercolesterolemizzante dell'acetato inibendo l'HMG-coenzima-A-sintetasi e l'HMG-coenzima-A-riduttasi.

Si è dimostrato che l'acido butirrico esercita diversi ruoli, sia a livello intestinale sia extra-intestinale, correlati in parte alla regolazione epigenetica dell'espressione genica (azione nutrigenomica):

- è il principale substrato energetico delle cellule epiteliali;

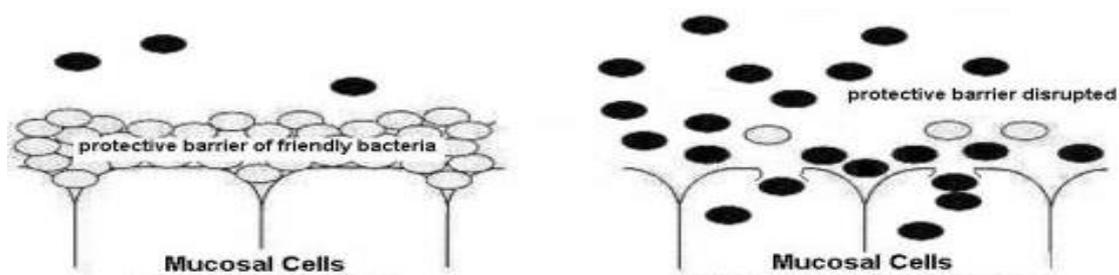
- regola il trasporto di fluidi;
- protegge i colonociti (le cellule del colon)) dallo stress ossidativo;
- influenza la motilità lungo il tratto gastrointestinale;
- modula la proliferazione cellulare e il differenziamento cellulare;
- regola l'espressione genica;
- esercita effetti migliorativi su molte patologie metaboliche come ipercolesterolemia, insulino-resistenza e patologie ischemiche.

Sulla base di numerosi studi si è così ipotizzato che l'effetto protettivo esercitato dalle fibre alimentari contro l'insorgenza di alcuni tumori intestinali sia dovuto non solo alla riduzione del tempo di transito intestinale, che riduce l'esposizione della mucosa intestinale a carcinogeni, tossine batteriche e amine biogene, ma anche alla produzione di acido butirrico.

Il microbiota inoltre effettua la decomposizione di alcune sostanze cancerogene (nitrosamine), la produzione di sostanze antibatteriche (ac. lattico, ac. solfidrico, H₂O₂, batteriocine) e la sintesi di vitamine (B1, B2, B6, B12, K)

Vitamina K	Escherichia coli
Folati	Bifidobacterium bifidum Bifidobacterium longum subsp. infantis
Riboflavina	Bacillus subtilis Escherichia coli
Cobalamina	Lactobacillus reuteri CRL1098
Niacina	Strepto-coccus thermophilus ST5
Piridossina	Lactobacillus helveticus R0052 Bifidobacterium longum R0175

Relativamente alle *funzioni protettive* del microbiota, si possono distinguere dei meccanismi diretti e indiretti. I primi sono rappresentati dalla disposizione fisica delle cellule della muscosa, dalla produzione di sostanze microbicide o microstatiche (batteriocine, acidi grassi a catena corta, acido solfidrico, perossido di idrogeno) e di metaboliti tossici nonché dalla deplezione di nutrienti essenziali.



Meccanismi indiretti (funzione immunomodulatoria) sono invece: aumento della produzione anticorpale, stimolazione fagocitaria e della produzione di citochine (TNF, IFNs).

Il microbiota svolge un ruolo fondamentale nell'induzione e modulazione del sistema immunitario dell'ospite, il sistema immunitario di quest'ultimo, a sua volta, sviluppa nel tempo molteplici mezzi per mantenere la sua relazione simbiotica con il microbiota (omeostasi immunologica intestinale).

Il termine **MALT** – Mucose Associated Lymphoid Tissue (tessuto linfoide associato alla mucosa) indica un tessuto linfoide diffuso a livello delle mucose dell'organismo (del tratto gastrointestinale e uro-genitale, tiroide, polmoni, occhi, pelle ecc.), organizzato non a formare un organo ma sotto forma di noduli e cellule isolate, il cui ruolo è assicurare una completa risposta immunitaria ossia sia umorale (linfociti B - anticorpi) sia cellulo-mediata (linfociti T) in risposta in seguito a stimoli antigenici locali e sistemici. Il MALT può essere schematizzato in vari comparti, fra essi il GALT (Gut-Associated Lymphoid Tissue) ossia il tessuto linfoide associato all'intestino, assume una particolare importanza. Il GALT infatti ospita la maggior parte del sistema immunitario (80% in età pediatrica, 60-65% in età adulta. Una delle funzioni dinamiche del microbiota è lo sviluppo del sistema immunitario (innato e adattativo) e il mantenimento della tolleranza immunitaria.

Uno sbilanciamento del microbiota, in particolare nei primi 1000 gg di vita (gravidanza e I e II anno di vita) ma anche dopo, può comportare infiammazioni croniche con produzione incontrollata di citochine (es. Interleuchina 6) in grado di provocare cambiamenti di umore e stress con conseguente ulteriore alterazione del microbiota. Lo sviluppo di questo “circolo vizioso” può determinare un'alterazione della mucosa, a livello delle giunzioni serrate: aumento della permeabilità intestinale, ulteriore attivazione del GALT causato dall'ingresso di elementi estranei. Questa infiammazione può col tempo trasferirsi a livello sistemico fino a indurre patologie autoimmuni. Influenza asse cervello) – intestino (si può alterare barriera emato-encefalica. Di fatto esiste quindi un'influenza reciproca dell'*asse cervello – intestino*. Lo stesso

meccanismi coinvolge l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene con possibili conseguenze quali, stati ansiosi, depressivi, alterazioni delle attività biologiche di tiroide, ormoni sessuali ecc.

È ormai noto che la sola predisposizione genetica non è sufficiente allo sviluppo di malattia ma è condizionata da fattori ambientali (*esposoma*). In questa ottica il microbioma potrebbe agire da “trasduttore” ambientale. Il razionale di questa ipotesi si basa proprio sull'azione di modulazione del GALT da parte del microbioma.

Ricerca

La *ricerca* in questo campo incontra la difficoltà di raccogliere campioni rappresentativi e di creare modelli di laboratorio rappresentativi dell'ambiente intestinale. Uno dei progetti più importanti volti allo studio del microbiota è lo Human Microbiome Project (HMP).

Benché non vi siano parametri per definire le caratteristiche di un microbiota umano “normal healthy”, studi osservazionali mostrano che alterazioni quali-quantitative del microbiota sono associate a varie malattie croniche non trasmissibili.

Alterazioni del microbiota (es. in animali germ free) sono state chiaramente correlate a squilibri nella risposta immunitaria e in disturbi comportamentali. La rottura della relazione simbiotica tra microbiota e tratto gastrointestinale, legata a “dismicrobismo” o a trattamenti antibiotici prolungati, perturba le funzioni dell'ospite e in alcuni casi, provoca la manifestazione di malattie gravi e conclamate come le MICI (Malattie Infiammatorie Croniche Intestinali) e la colite da *Clostridium difficile*. Ulteriori promettenti indagini stanno riguardando il possibile coinvolgimento del microbiota in patologie nervose come morbo di Parkinson, sclerosi multipla, demenze, sindrome da fatica cronica, ADHD (sindrome iperattività bimbi), autismo, encefalopatie varie. I batteri commensali possono influenzare l'espressione di geni che controllano e regolano la funzione del Sistema Nervoso. Essi inoltre sono in grado di influenzare le cellule enteroendocrine che secernono il triptofano.

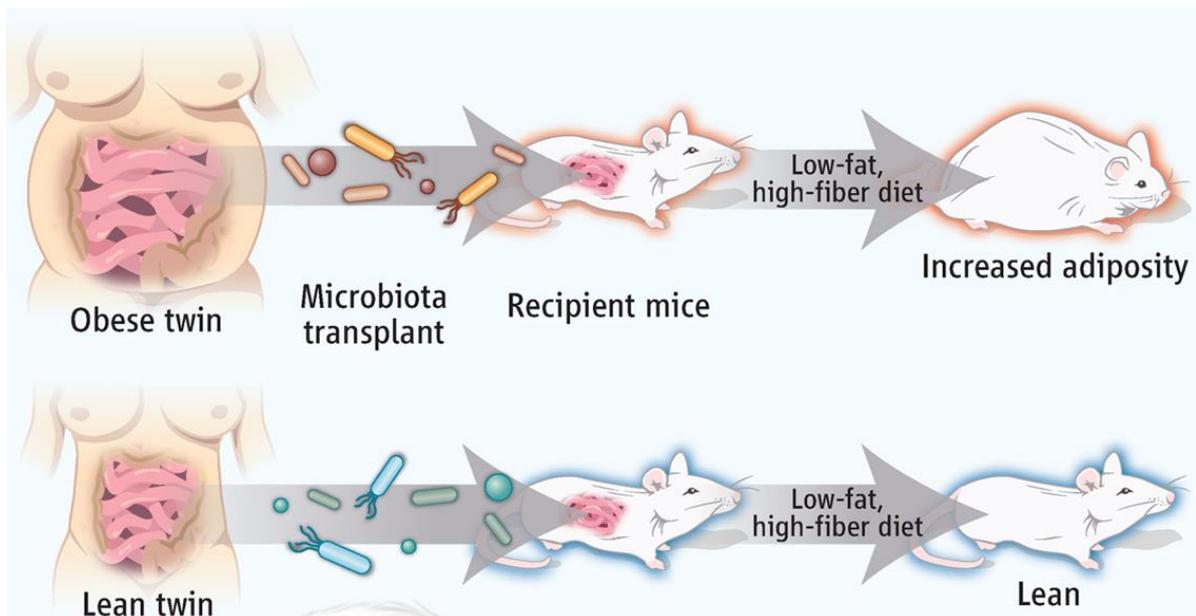
Tutto ciò apre ovviamente interrogativi su tanti farmaci che si prescrivono forse con troppa leggerezza, ad es. gli antibiotici. La somministrazione di antibiotici a livello sperimentale solleva pesanti interrogativi sulle possibili conseguenze anche sulla specie umana. Come se non bastasse, un recente studio pubblicato su Nature nel 2013 da Lisa Maier e coll. “Blooming in the gut: how dysbiosis might contribute to pathogen evolution”, segnalerebbe come almeno il 25 % dei farmaci impiegati in terapia (antipsicotici e antidepressivi, antiulcera, chemioterapici) possa agire sul microbiota umano con almeno tre spiacevoli conseguenze:

- 1) Induzione di resistenze batteriche;
- 2) Variabilità e imprevedibilità nella risposta alla terapia;

- 3) Ulteriori possibili conseguenze di medio lungo periodo sull'organismo riguardanti il metabolismo e lo sviluppo del sistema immunitario e di quello nervoso.

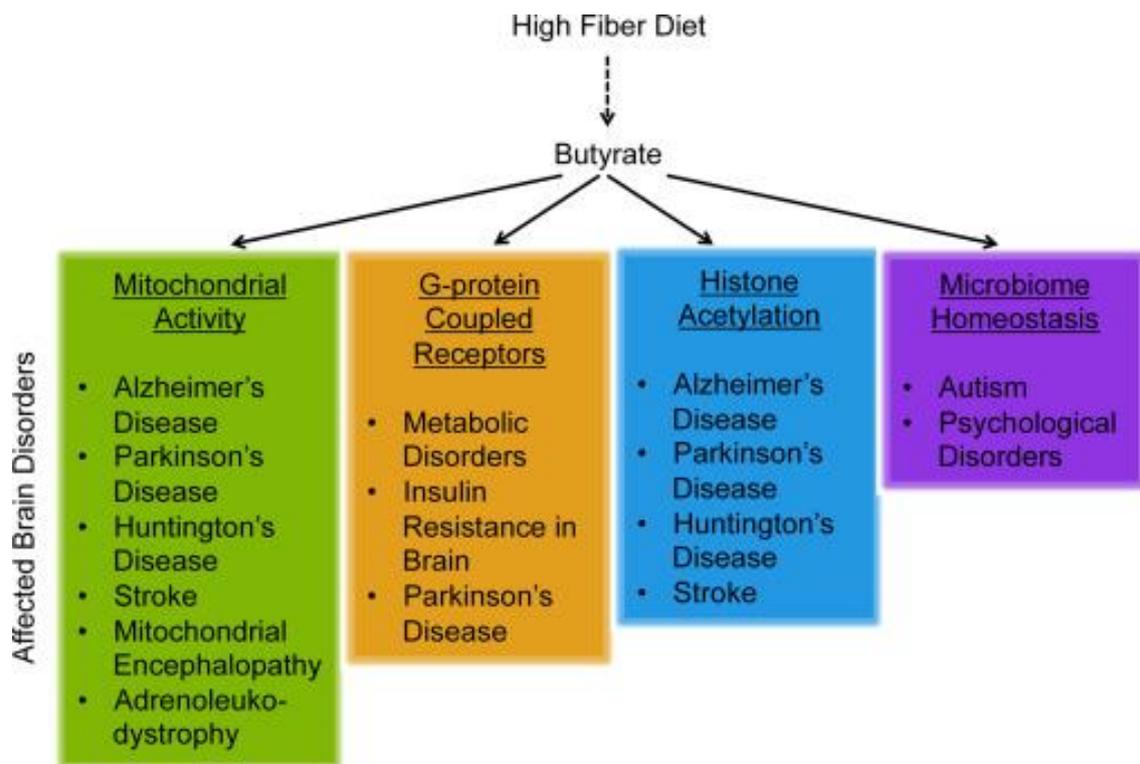
La *dieta*, sia a breve sia a lungo termine, può modificare il microbioma selezionando specifiche famiglie batteriche a scapito di altre. Solo un intervento dietetico di lunga durata permette un vero e proprio cambiamento di stato del microbiota.

Nei soggetti obesi è presente una maggiore quantità di *Firmicuti* i quali hanno la capacità di aumentare al massimo le capacità di assorbimento intestinale diminuendo al minimo la quantità di calorie espulse con le feci. Questo riscontro conferma che lo sviluppo di obesità o diabete di tipo 2 non è determinato esclusivamente dal corredo genetico. Si è visto infatti che se si trapiantano i batteri prelevati dall'intestino di un topo obeso in un topo sterile (GF - Germ Free) il topo sterile continua a crescere di peso sempre di più fino a diventare obeso egli stesso.

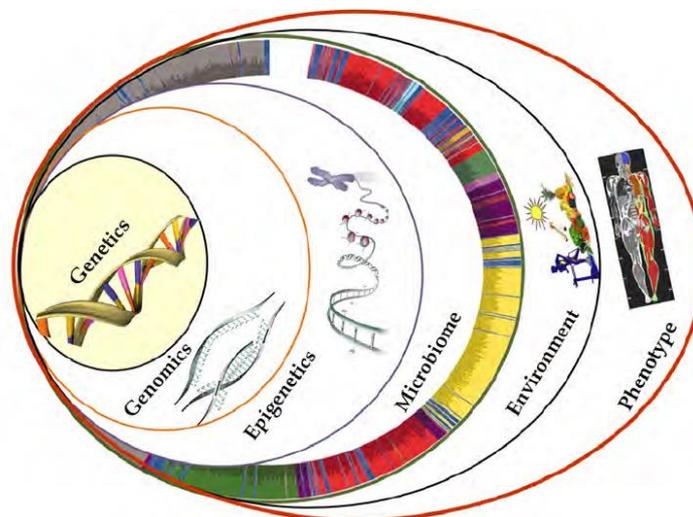


Topi GF inoculati con microbiota da gemelli umani obesi o magri assumono le caratteristiche del microbiota del donatore.

Da quanto descritto si desume inoltre che una dieta ad alta concentrazione di fibre risulta inoltre importante per la salute del nostro cervello.



Ulteriore elemento in grado di influenzare in maniera reciproca il microbiota è l'esercizio fisico (come approfondito nel relativo capitolo).



Nei fitocomplessi sono spesso presenti sostanze modulatrici e/o favorenti il corretto sviluppo e differenziazione del microbiota (prebiotici) quali: polisaccaridi non assimilabili (es. pentosani), polifenoli con azione di substrati o chelanti metallici, acidi organici, oli essenziali, varie sostanze antiossidanti, colagoghe e coleretiche. D'altro canto, studi dimostrano l'inefficacia

dell'approccio fitoterapeutico in caso di disbiosi del microbiota intestinale in quanto non più in grado di attivare i principi attivi delle piante.

Conclusione

In un tempo in cui l'essere umano sembra sempre più assoggettato a regole di mercato che ormai non risparmiano neanche il mondo della salute, riscoprire la centralità del paziente, nella sua individualità, vuol dire anche tornare ad apprezzare uno dei principali strumenti del processo di guarigione ossia il terapeuta, la sua capacità di analisi e di risposta, la sua perizia nel tessere quel decisivo e faticoso rapporto col paziente che da solo risulta già essere un'importante medicina (talvolta capace di risultati insperati).

In circa 4 miliardi di anni vita su questo pianeta, gli esseri umani si sono evoluti quali aggregati di circa 6×10^{12} di quattro diversi tipi di cellule disperse all'interno di un elemento fluido: cellule nervose, specializzate nella conduzione, muscolari specializzate nella contrazione, epiteliali specializzate nella secrezione (enzimi, ormoni ecc.) e connettivali. Ciò che occorre considerare è che le cellule connettivali creano l'ambiente per tutti gli altri tipi di cellule costruendo sia l'impalcatura che le tiene assieme sia la rete di comunicazione fra esse. A partire dal livello microscopico un network globale composto da sottosistemi a sua integrati fra loro si espande funzionalmente e strutturalmente dall'interno del nucleo fino a coinvolgere l'intero nostro organismo e forse non solo. Oggi sappiamo che un vortice di tensegrità parte dal DNA, compone il citoscheletro e giunge ai confini del nostro corpo; forse però si potrebbe cominciare a ipotizzare che questo vortice possa aver inizio in sistemi ancor più nanoscopici ed espandersi infinitamente al di fuori del nostro organismo immergendosi nel *entanglement quantico*. Non c'è dubbio che l'epigenetica possa rappresentare il fulcro, il perno da cui partire per sempre meglio comprendere l'entità, la natura e lo scopo di questa globale elica dinamica.

La ricerca ha certo ancora tanto, forse quasi tutto, da scoprire, la medicina resta un'arte e non una scienza esatta ma sicuramente essa va interpretata in una visione integrata, in cui più specialisti collaborano sinergicamente nella gestione delle varie sorgenti di influenza del grande network cellula-MEC-uomo-ambiente-universo.

Bibliografia

- Ader R., "Psychoneuroimmunology", *Academic press*, 1981
- Albergati F. G., Bacci A., Mancini S., "La matrice extracellulare", *Minelli editore*, 2004
- Alberts B. et al, "Molecular Biology of the Cell", *Garland Sciences Textbooks*, 2002
- Berg D.E., M. Howe M., "Mobile DNA", *American Society for Microbiology*, 1989
- Borsa M., "Master in Genetica ed epigenetica applicata al trattamento nutrizionale", *Dispense*, Unicusano, Roma, 2020
- Bloom F.E., "Neurotransmitters: past, present and future directions", in *FASEBJ*, 2, 1988
- Bottaccioli F., "Psiconeuro Endocrino Immunologia", *Red studio*, 2005
- Bottaccioli F., "Epigenetica e Psiconeuro Endocrino Immunologia", *Edra*, 2014
- Boulet L.P., "Clinical Asthma Review", in *PubMed*, May, 1999
- Bukhari A.I., Shapiro J.A., Adhya S.L., "DNA insertion elements, plasmids and episomes", *Cold Spring Harbor*, 1977
- Claesson M.J., Jeffery I.B., Conde S. et al., "Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly", *Nature*, 488: 178 –84, 2012
- De Masi E., "Master in Genetica ed epigenetica applicata al trattamento nutrizionale", *Dispense*, Unicusano, Roma, 2020
- Fain J.M., Sheperd R.E., "Hormonal regulation of lipolysis", in *Adv. Exper. Med. Biol.* 111, pp 43-79, 1979
- Field et al, "Immune system maintenance requires a steady intake of all the necessary vitamins, minerals, proteins, PUFA", *Journal of Leukocyte Biology*, 71, 2002
- Fain J.M., Sheperd R.E., "Hormonal regulation of lipolysis", in *Adv. Exper. Med. Biol.* 111, pp 43-79, 1979
- Finnegan D.J., "Eukaryotic transposable elements and genome evolution", *Trends in Genetics*, 5, pp. 103-07, 1989
- Galimberti D., Gidaro G. B., Calabrese V. et al, "Nutrigenomica ed epigenetica – Dalla biologia alla clinica", *Edra*, giugno 2017
- Gennis R.B., "Biomembranes molecular structure and functions", *Springer*, Verlag, 1989
- Hay E.D., "Extracellular matrix", in *J. of Cell. Biol.*, 91, pp 205-223, 1980
- Hynes R., "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines", in *Cell* 110 (6), pp 673-87, 2002

- Hulmi J.J., Tannerstedt J., Selänne H., Kainulainen H., Kovanen V., Mero A.A., “Resistance exercise with whey protein ingestion affects mTOR signaling pathway and myostatin in men”, . *Appl Physiol* , 106(5):1720-9, 2009
- Ingber D., “The architecture of life”, in *Scientific American*, January 1998, pp 48-57
- Kingsman S.M., Kingsman A.J., “Ingegneria genetica”, ISBN, 1991
- Kirby T.J., McCarthy J.J., “MicroRNAs in skeletal muscle biology and exercise adaptation”, *Free Radic Biol Med.*, 64: 95–105, 2013
- La Merrill M.A., Vandenberg N.L., Smith M.T. et al, “Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification”, *Nature Reviews Endocrinology*, volume 16, pages45–57, 2020
- Lewin B., “Il gene”, *Zanichelli*, 1990
- Lin C.Y., Lovén J., Orlando D.A., Rahl P.B., Sigova A.A., “Revisiting global gene expression analysis”, *Cell – Elsevier*, Vol 151, Issue 3, pagg. 476-482, 26 October 2012
- Lodish H, Berk A., Matsudaira P., Kaiser C.A., Krieger M., Scott M.P., Zipursky S.L., Darnell J., “Molecular Biology of the Cell”, p963. *WH Freeman: New York*, 2004
- Maier L. et al, “Blooming’ in the gut: how dysbiosis might contribute to pathogen evolution”, *Nature*, 2013
- Matthew J. Paszek, et al., “Tensional homeostasis and the malignant phenotype”. in *Cancer Cell*, Vol. 8, pp. 241-254, settembre 2005
- Morini M., “Master in Genetica ed epigenetica applicata al trattamento nutrizionale”, *Dispense*, Unicusano, Roma, 2020
- Nigro C., Leone A., Raciti G.A., Longo M. et al, “Methylglyoxal-Glyoxalase 1 Balance: The Root of Vascular Damage”, in *PubMed Central*, gennaio 2017
- Nindl B.C., Pierce J.R., Rarick K.R., Tuckow A.P., Alemany J.A., Sharp M.A., Kellogg
- Olivotti A., “Master in Genetica ed epigenetica applicata al trattamento nutrizionale”, *Dispense*, Unicusano, Roma, 2020
- Pammi et al, “Nutrition-Infection Interactions and Impacts on Human Health”, *CRC Press*, 2014
- Rengling G.; “Magnetic fields and connective tissue regulation”, *Electromagnetic Biology and Medicine*, Vol 20, Issue 2, giugno 2001
- Sandmeyer S., Hansen I.J., Chalker D.L., “Integration specificity of retrotransposons and retrovirus”, *Annual Review of Genetics*, 24, pp. 491-518,1990

- Schultz M.D. et al., “Human body epigenome maps reveal noncanonical DNA methylation variation, *Nature*, volume 523, pages 212–216, 09 July 2015
- Sender R., Fuchs S., Milo R., “Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body“, *PLOS Biology* , 2016
- Spinelli S., “Master in Genetica ed epigenetica applicata al trattamento nutrizionale”, *Dispense*, Unicusano, Roma, 2020
- Uribe A., Alam M., Johansson O., Midtvedt T., Theodorsson E.. “Microflora modulates endocrine cells in the gastrointestinal mucosa of the rat”, *Gastroenterology*, 107:1259–1269,1994
- Van De Putte P., Goosen N., “DNA inversions in phages and bacteria”, *Trends in Genetics*, 8, pp. 457-62, 1992
- Viidik A., "Functional properties of collagenous tissues", *Int Rev Connect Tissue Res* 6, pp 127-215, 1973
- Vittoria G., “Master in Genetica ed epigenetica applicata al trattamento nutrizionale”, *Dispense*, Unicusano, Roma, 2020
- Worlitschek M., “Equilibrio acido-base, fondamenti e terapia”, *Named*, 2002
- Yvonne C. et al, “Reactive Oxygen species and regulation of MMP-expression, Progress in Inflammation”, *M.J. Parnham*, Verlag, 1999