



Università degli Studi di Bari
Facoltà di Medicina e Chirurgia / Polo didattico di LE-FAZ

*Corso di Laurea Triennale in Infermieristica
a.a. 2020/2021*

**UNITA' DIDATTICA
DI
GENETICA MEDICA**

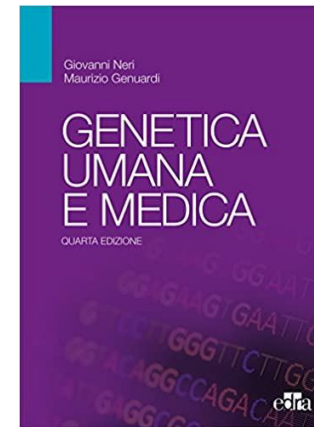
*Docente: Prof. Sebastiano Caruso
sebastiano-caruso@virgilio.it*

Testi consigliati

- ✓ **GENETICA MEDICA ESSENZIALE**
Bruno Dallapiccola – Giuseppe Novelli
Editore: CIC
Edizione: In ristampa



- ✓ **GENETICA UMANA E MEDICA**
Giovanni Neri – Maurizio Genuardi
Editore: Edra Masson
Edizione IV 2017



- ✓ Appunti delle lezioni + presentazioni



Programma



- ✓ **Introduzione alla Genetica Medica:** definizione, classificazione, frequenza ed impatto delle malattie genetiche nella patologia umana
- ✓ **Il patrimonio genetico:** DNA, cromosomi e geni
- ✓ **I meccanismi della riproduzione umana:** ciclo cellulare, mitosi e meiosi, gametogenesi maschile e femminile
- ✓ **Le mutazioni del DNA:** spontanee e indotte, mutageni chimici e fisici, mutazione somatica e germinale, mutazioni puntiformi, meccanismi di riparazione
- ✓ **Principi mendeliani:** I e II legge di Mendel
- ✓ **Caratteri autosomici dominati:** segregazione, albero genealogico, mosaicismo germinale, espressione variabile, anticipazione, difetto di penetranza, eredità codominante, esempi di malattie autosomiche dominanti.
- ✓ **Caratteri autosomici recessivi:** segregazione, albero genealogico, consanguineità, legge di Hardy-Weinberg, vantaggio dell'eterozigote, effetto fondatore, disomia uniparentale, esempi di malattie recessive autosomiche
- ✓ **Eredità legata al sesso:** determinazione genetica del sesso, segregazione recessiva legata all'X, inattivazione del cromosoma X, esempi di malattie X recessive, segregazione dominante legata all'X, eredità legata all'Y
- ✓ **Eredità atipica:** eredità mitocondriale, malattie da triplette espanse, malattie da alterato imprinting,
- ✓ **I cromosomi umani:** tecniche di studio, anomalie di numero e di struttura, citogenetica molecolare, patologia cromosomica
- ✓ **Caratteri multifattoriali e malattie complesse**
- ✓ **Test genetici e consulenza genetica**
- ✓ **La genetica dei tumori:** genesi tumorale, protooncogeni, oncosoppressori, geni mutatori, two-hit hypothesis, gene Rb, BCRA1/BCRA2, cromosomi e tumori

LEZIONE I

- **Introduzione** (*definizione, classificazione, frequenza ed impatto delle malattie genetiche nella patologia umana*)
- **Il patrimonio genetico** (*DNA, cromosomi e geni*)



INTRODUZIONE
ALLA
GENETICA MEDICA



Traslazionalità



Genetica: definizione



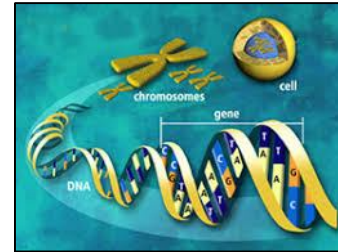
W. Bateson

*“La genetica è la scienza che **studia l’eredità** e la **variazione** cercando di scoprire le leggi che governano le somiglianze e le differenze negli individui che sono in rapporti di discendenza.”*

(William Bateson, 1861-1926)

Genetica: campo d'azione

- ✓ Studio del materiale genetico
(**cromosomi, DNA, RNA, geni**)



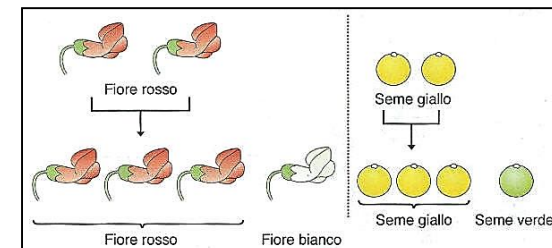
- ✓ Studio della **variabilità** tra i diversi organismi



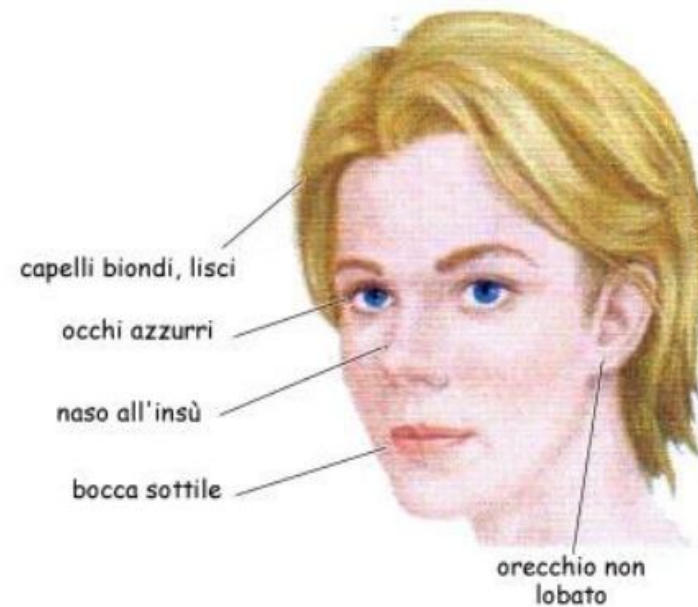
- ✓ Studio della variabilità tra gli individui



- ✓ Studio delle modalità di **trasmissione** dei caratteri da una generazione all'altra

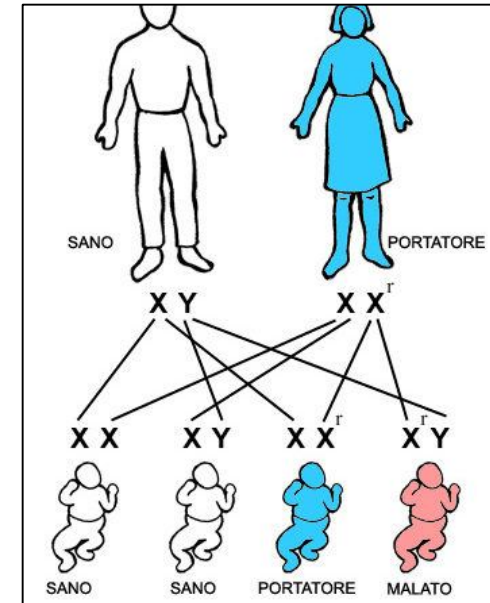


Variabilità tra individui



Genetica Medica

- *Disciplina che si occupa delle problematiche ereditarie delle malattie umane (**malattie genetiche**) e quindi delle applicazioni della Genetica alla pratica clinica*
- *Disciplina **autonoma** (nel 2010 è stata riconosciuta dalla CE)*
- *Interessa trasversalmente **tutte le specialità mediche** (Francis Collins: tutte le malattie umane hanno una base genetica)*



Reperti della civiltà egizia



Seneb, IV-V dinastia



*Gli antichi Egizi sapevano riconoscere alcune alterazioni strutturali del corpo umano che erano di fatto delle malattie genetiche, come **l'osteochondrodisplasia**, patologia costituzionale dello scheletro che oggi sappiamo essere dovuta all'alterazione di un singolo gene e che interessa circa **1 ogni 25000 nati**.*



Djeho, 350 a.c.

Le principali tappe della storia della genetica

Anno	Risultati delle ricerche	Ripercussioni scientifiche e/o sociali
1866	Haeckel ipotizza che il patrimonio genetico sia contenuto nel nucleo delle cellule	
1866	Mendel pubblica i risultati delle sue ricerche sui piselli	Viene dimostrato che il patrimonio genetico è formato da unità indipendenti che si ricombinano ad ogni generazione
1859	Darwin pubblica la prima delle sei edizioni di <i>L'origine delle specie per mezzo della selezione naturale</i> , in cui illustra la sua teoria dell'evoluzione.	Il meccanismo evolutivo proposto, la selezione naturale, è alla base delle teorie dell'evoluzione attuali.
1882	Walter Flemming scopre i cromosomi che saranno così denominati nel 1888 da Waldeyer	
1902	Walter Stanford Sutton ipotizza che l'informazione ereditaria sia contenuta nei cromosomi	
1907	Thomas Hunt Morgan scopre che i cromosomi sono sequenze di informazioni genetiche	Nasce la <i>teoria cromosomica dell'ereditarietà</i>
1909	Il botanico Johannsen introduce la parola "gene" e teorizza la struttura corpuscolare del patrimonio genetico	Superamento della teoria della pangenesi accettata da Aristotele in poi
1910	Morgan stabilisce che esistono particolari cromosomi che trasmettono i caratteri sessuali (cromosoma X per le femmine; Y per i maschi) e ottiene la prima mappa cromosomica della <i>Drosophila</i> , il moscerino della frutta	
1927	Muller scopre che i raggi X possono produrre mutazioni genetiche	Deve esistere negli esseri viventi una struttura fisica e quindi modificabile dei geni
1933	Morgan riceve il premio Nobel per aver dimostrato che i cromosomi si trasmettono secondo le leggi di Mendel, e per aver elaborato le prime mappe cromosomiche del moscerino della frutta	Inizia a sviluppare tecniche di mappatura che porranno le basi al Progetto Genoma Umano
1936-1947	Dobzhansky, Huxley, Mayr, Simpson, Rensch, Stebbins costruiscono la teoria sintetica dell'evoluzione	I fenomeni evolutivi sono spiegati in modo coerente sia con le leggi della genetica che con le prove raccolte dagli scienziati naturalisti che studiano la selezione naturale
1941	Beadle, Lederberg e Tatum elaborano la relazione 1 gene \Rightarrow 1 enzima, per questo riceveranno il Nobel nel 1958	Si scopre che il patrimonio genetico determina le caratteristiche ereditarie attraverso la sintesi proteica
1944	Avery dimostra che responsabile dell'informazione genetica non è una proteina, ma l'acido nucleico DNA	Aprire la strada alle scoperte di Watson e Crick
1953	Watson e Crick scoprono attraverso la diffrazione a raggi X, la doppia elica del DNA e il legame A-T, C-G, riceveranno il Nobel insieme a Wilkins nel 1962	Viene individuata la base chimica del patrimonio genetico
1956	Kornberg in seguito alla scoperta della DNA-polimerasi riesce a riprodurre in vitro una molecola di DNA. Riceverà il Nobel nel 1959	Dimostra sperimentalmente il modello a doppia elica di Watson e Crick

Le principali tappe della storia della genetica

1956	Kornberg in seguito alla scoperta della DNA-polimerasi riesce a riprodurre in vitro una molecola di DNA. Riceverà il Nobel nel 1959	Dimostra sperimentalmente il modello a doppia elica di Watson e Krick
1961 – 1963	Francois Jacob e Jacques Monod scoprono che l' RNA – messaggero copia il DNA e permette la produzione delle proteine	Inizia lo studio delle complesse fasi della sintesi proteica
1972	Berg crea la prima molecola di DNA ricombinante	Nasce l'ingegneria genetica, negli USA nasce la prima azienda biotecnologica
1977	Inizia la produzione di ormoni umani per mezzo della tecnica del DNA ricombinante.	
1978	Viene clonato il gene umano dell'insulina	Si aprono le strade per la produzione batterica di insulina: l'estrazione di questo ormone dalla milza degli animali era diventata insufficiente.
1980	Sanger riceve il suo secondo Nobel (il primo fu nel 1958) per aver messo a punto un metodo basato sul laser che sequenzia in breve tempo le basi azotate dell'acido nucleico.	Inizio dei sequenziamenti del DNA
1982	Viene prodotta per la prima volta con la tecnica del DNA ricombinante insulina umana da somministrare a diabetici	
1986	In Inghilterra il primo criminale viene giudicato colpevole in base all'esame del DNA.	Ci si inizia a interrogare se sia corretto procedere a screening genetici su di un'intera popolazione per fini di sicurezza.
1987	Prodotto il primo pomodoro transgenico, resistente ai parassiti	Si apre la strada alla coltivazione di piante transgeniche (OGM). Ci si inizia a domandare quale impatto ambientale possano avere queste coltivazioni.

Le principali tappe della storia della genetica

1988	Viene brevettato l'oncomouse, il primo animale transgenico protetto da brevetto.	Si accende la polemica se sia legittimo brevettare sequenze di DNA.
1990	Parte il Progetto Genoma sotto la direzione di Watson	Si apre la strada per la mappatura dell'intero patrimonio genetico dell'uomo (ipotizzati 50.000 – 100.000 geni) e la localizzazione nei cromosomi dei siti responsabili delle malattie ereditarie.
1990	Viene effettuato il primo intervento di terapia genica per curare un bambino affetto da una immunodeficienza ereditaria	
1993	Il biochimico Mollis riceve il Nobel per aver inventato la tecnica della PCR (reazione a catena della polimerasi) attraverso la quale in poche ore si possono produrre milioni di copie di una singola molecola di DNA	La mappatura cromosomica diventa più veloce ed attendibile; l'analisi del DNA è possibile anche a partire da piccolissimi frammenti di tessuti organici.
1994	Viene pubblicata la notizia che il dott. Starzl, attraverso l'ingegneria genetica, è riuscito a creare Astrid, un maiale con un cuore simile a quello umano, in futuro utilizzabile per trapianti.	Si apre la strada per la costruzione in laboratorio di organi umani. Oggi solamente il 15% dei pazienti in lista d'attesa riesce ad ottenere un organo compatibile
1996	Stato del Progetto Genoma Umano: 4.000 geni localizzati su un singolo cromosoma 1.600 geni a funzione nota sono stati clonati 100 malattie ereditarie sono state associate a geni mappati 150.000.000 di basi azotate sequenziate	
1997	Nasce Dolly, il primo mammifero (pecora) clonato partendo da una cellula somatica dell'animale donatore.	La clonazione umana diventa una realtà possibile. Si inizia a parlare di cloni utilizzabili come riserva di organi e di sconfitta della morte. L'animale clonato, anche se appena nato, ha tuttavia, l'età biologica della cellula da cui è stato ricavato. L'orologio biologico, quindi, non riparte da zero.
1998	Dolly porta a termine una gravidanza.	Modificazioni genetiche applicate con la tecnica della clonazione da cellule somatiche possono essere trasmesse per via ereditaria.
2001	Sequenziamento delle 3,2 miliardi di basi azotate del DNA umano	Mappatura di geni responsabili di malattie ereditarie

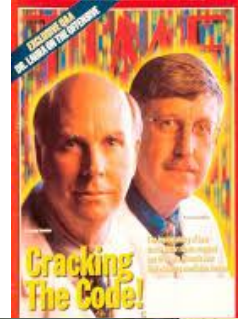
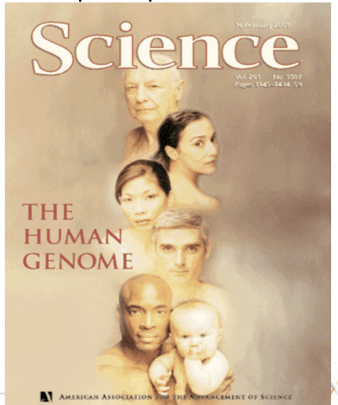
Era pre-genomica

project coordinated by the U.S. Department of Energy (DOE) and the National Institutes of Health. During the early years of the HGP, the Wellcome Trust (U.K.) became a major partner; additional contributions came from Japan, France, Germany, China, and others



Milestones:

- 1990: Inizio del Progetto (U.S. Department of Energy & National Institutes of Health)
- Giugno 2000: Completamento della prima bozza dell'intero genoma umano
 - **Febbraio 2001: Pubblicazione su Science e Nature**
- Aprile 2003: Completamento della sequenza. Il progetto HGP termina il suo lavoro con due anni di anticipo sul previsto



Venter & Collins
Private vs. Public
1000 Genomes Project



2000Mb DNA intergenico

3 miliardi di dollari

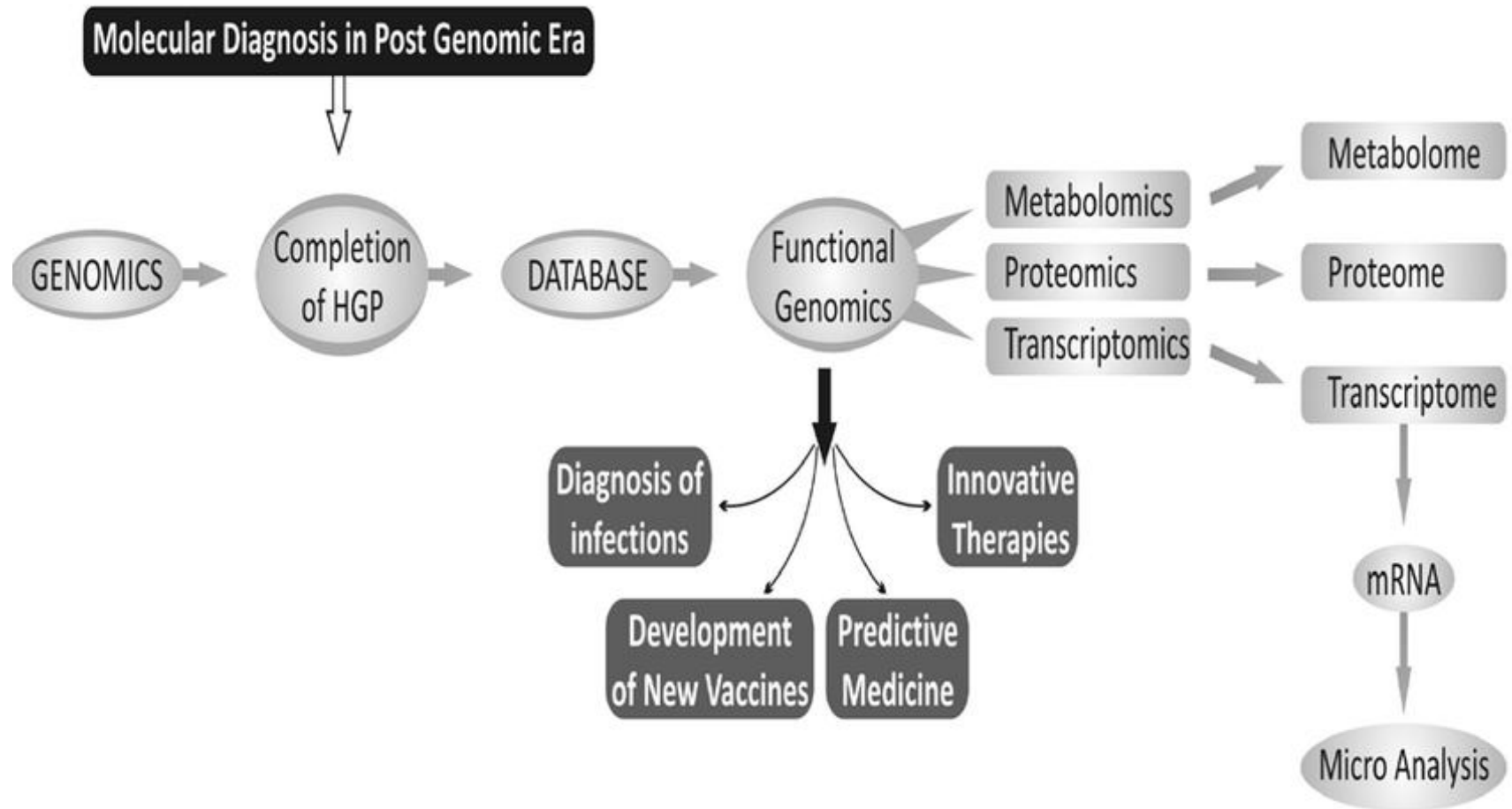
~3200Mb

1152Mb (36%) "gene related" DNA (Introni, UTR, Pseudogeni, frammenti genici)

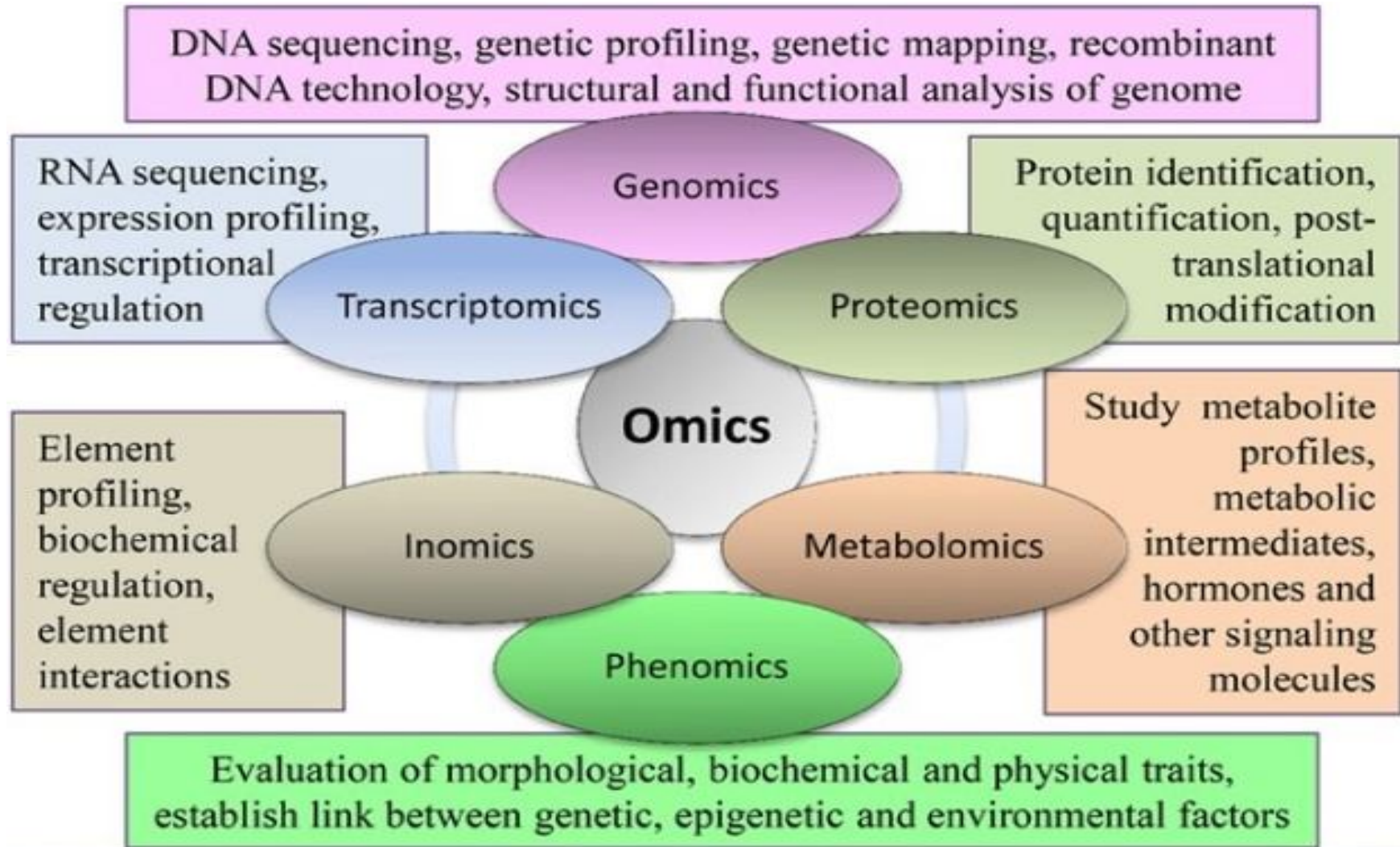
~ 20,500 geni

48Mb di DNA codificante (1,5%)

Era post-genomica



Era post genomica



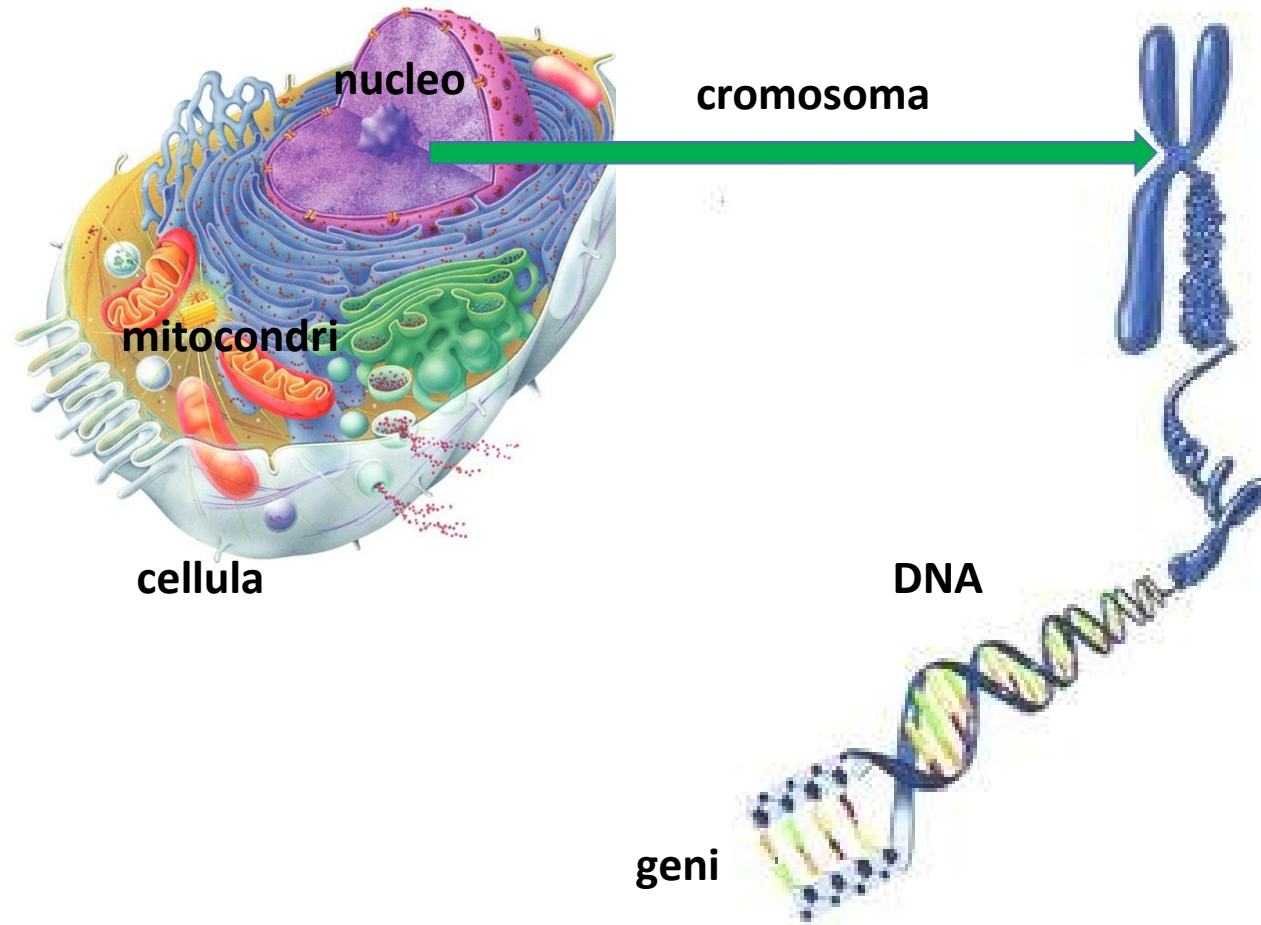
Inizio della genetica moderna



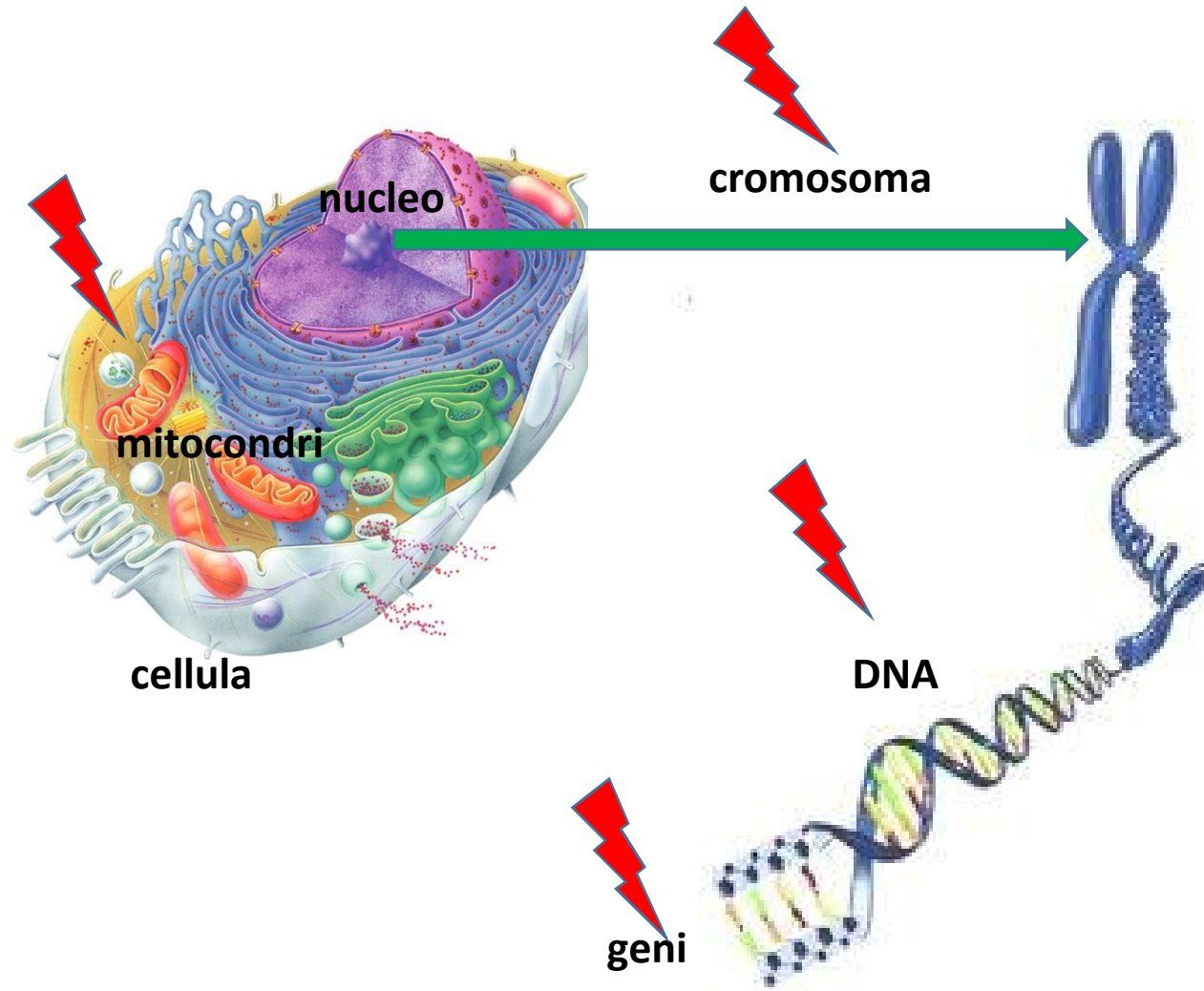
Gregor Mendel (1822-1884)

*Ha avuto il merito di aver contato il prodotto degli **incroci controllati** tra piante per definire alcune regole basilari nella trasmissione dei caratteri.*

Cosa sappiamo oggi ?



Mutazioni



Classificazione delle malattie genetiche

- ✓ *Malattie mitocondriali*
- ✓ *Malattie cromosomiche*
 - numeriche*
 - strutturali*
- ✓ *Malattie genomiche*
- ✓ *Malattie mendeliane*
 - autosomiche dominanti e recessive*
 - X-linked dominanti e recessive*
- ✓ *Malattie da alterato imprinting*
- ✓ *Malattie multifattoriali*

Spettro fenotipico delle malattie umane

G

geni

Sindrome di Down

Acondroplasia

Emofilia

Fibrosi cistica

M

geni + ambiente

Cardiopatie

Labio-palatoschisi

Infarto miocardico

Diabete-Obesità-Ipertensione

A

ambiente

Fratture scheletriche

Ustioni

Malaria

Malnutrizione

Frequenza delle malattie genetiche

Tipo di malattia	Frequenza <25 aa/ 1000 nati	Frequenza >25 aa/ 1000	Frequenza durante la vita
Patologia cromosomica	1.8	2	3.8
Malattie mendeliane	3.6	16.4	20.0
Malattie multifattoriali	46.4	600	646.4
Patologia somatica		240	240

L'impatto delle malattie genetiche

- *Il 50% delle sordità, cecità, e ritardi mentali infantili sono dovuti a fattori genetici*
- *30% dei ricoveri ospedalieri in età pediatrica e 50% dei decessi pediatrici sono dovuti a malattie genetiche o malformazioni congenite*
- *5 -10% dei tumori più comuni presentano una forte componente genetica*

Età di comparsa delle malattie genetiche

Età	Malattia
letale durante la vita prenatale	aberrazioni cromosomiche alcune gravi malformazioni
prima della nascita	malformazioni congenite aberrazioni cromosomiche
subito dopo la nascita	fenilchetonuria fibrosi cistica
durante il primo anno	distrofia muscolare di Duchenne
alla pubertà	distrofia muscolare dei cingoli
dopo la pubertà	porfiria intermittente acuta glaucoma ereditario
età variabile	diabete mellito (0-80 anni) Corea di Huntington (15-65 anni)

Malattie genetiche e malattie rare

- La rarità delle malattie è definita in base alla normativa europea, che stabilisce una prevalenza soglia non superiore a 5 persone affette ogni 10.000 (Regolamento (CE) N° 141/2000 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 16 dicembre 1999 sui medicinali orfani)
- Se è vero che quasi tutte le malattie genetiche sono malattie rare, non è altrettanto vero che tutte le malattie rare abbiano un'origine genetica; ad esempio, esistono malattie infettive molto rare, così come malattie autoimmuni e carcinomi rari.
- Il numero di malattie rare conosciute e diagnosticate oscilla tra le 7.000 e le 8.000, ma è una cifra che cresce con l'avanzare della scienza e, in particolare, con i progressi della ricerca genetica. Stiamo dunque parlando non di pochi malati, ma di milioni di persone in Italia e addirittura decine di milioni in tutta Europa.
- Secondo la rete Orphanet Italia, nel nostro Paese i malati rari sono circa 2 milioni: nel 70% dei casi si tratta di pazienti in età pediatrica.

PREVALENZA DI ALCUNE MALATTIE GENETICHE

Malattie cromosomiche

Sindrome di Down (trisomia 21)	1/1.000
Sindrome di Edwards (trisomia 18)	1/7.700
Sindrome di Patau (trisomia 13)	1/10.000
Sindrome di Klinefelter (XXY)	1/1.000 (maschi)
Sindrome di Turner	1/5.000-1/10.000 (femmine)

Malattie monogeniche

Talassemia	1/50-1/100 (Mediterraneo e Asia del sud)
Cancro ereditario non poliposico del colon	fino a 1/200
Falcemia	1/400-1/600 (negli afro-americani) fino a 1/50 (nell'Africa centrale)
Ipercolesterolemia familiare	1/500
Rene policistico dell'adulto	1/1.000
X-fragile (ritardo mentale di Martin Bell)	1/5.000 maschi
Fibrosi cistica	1/500-1/4.000 bianchi
Malattia di Tay-Sachs	1/3.000 ebrei Ashkenazi
Distrofia muscolare di Duchenne	1/3.500 maschi
Neurofibromatosi tipo 1	1/3.500-1/5.000
Emocromatosi ereditaria (sintomatica)	1/5.000
Osteogenesi imperfetta	1/5.000-1/10.000
Poliposi del colon	1/6.000
Distrofia miotonica	1/8.000-1/10.000
Atrofia muscolare spinale	1/10.000
Fenilchetonuria	1/10.000
Emofilia A	1/10.000 maschi
Sindrome di Marfan	1/10.000-1/20.000
Corea di Huntington	1/20.000

Malattie multifattoriali

Infarto/ictus	1/3-1/5
Tumori (tutti i tipi)	1/4
Diabete (tipi I e II)	1/10
M. Di Alzheimer (>65 anni)	1/10
Alcolismo	1/10-1/20
Schizofrenia	1/100
Psicosi maniaco-depressiva	1/100-1/200
Cardiopatie congenite	1/110
Stenosi ipertrofica del piloro	1/300
Labio-palatoschisi	1/1.000
Difetti del tubo neurale (in Italia)	1/1.000

Malattie genomiche

Sindrome di DiGeorge	1/5.000
Sindrome di Williams	1/10.000
S. di Charcot-Marie Tooth (tipo 1)	1/5.000
Sindrome di Smith Magenis	1/25.000

Malattie epigenetiche

Sindrome di Angelman	1/15.000
Sindrome di Prader-Willi	1/16.000
Sindrome di Beckwith-Wiedmann	1/13.700

Malattie mitocondriali

rare

Differenza tra prevalenza ed incidenza

- **Prevalenza**

percentuale di persone che in un dato momento, in una determinata popolazione, presenta una certa patologia

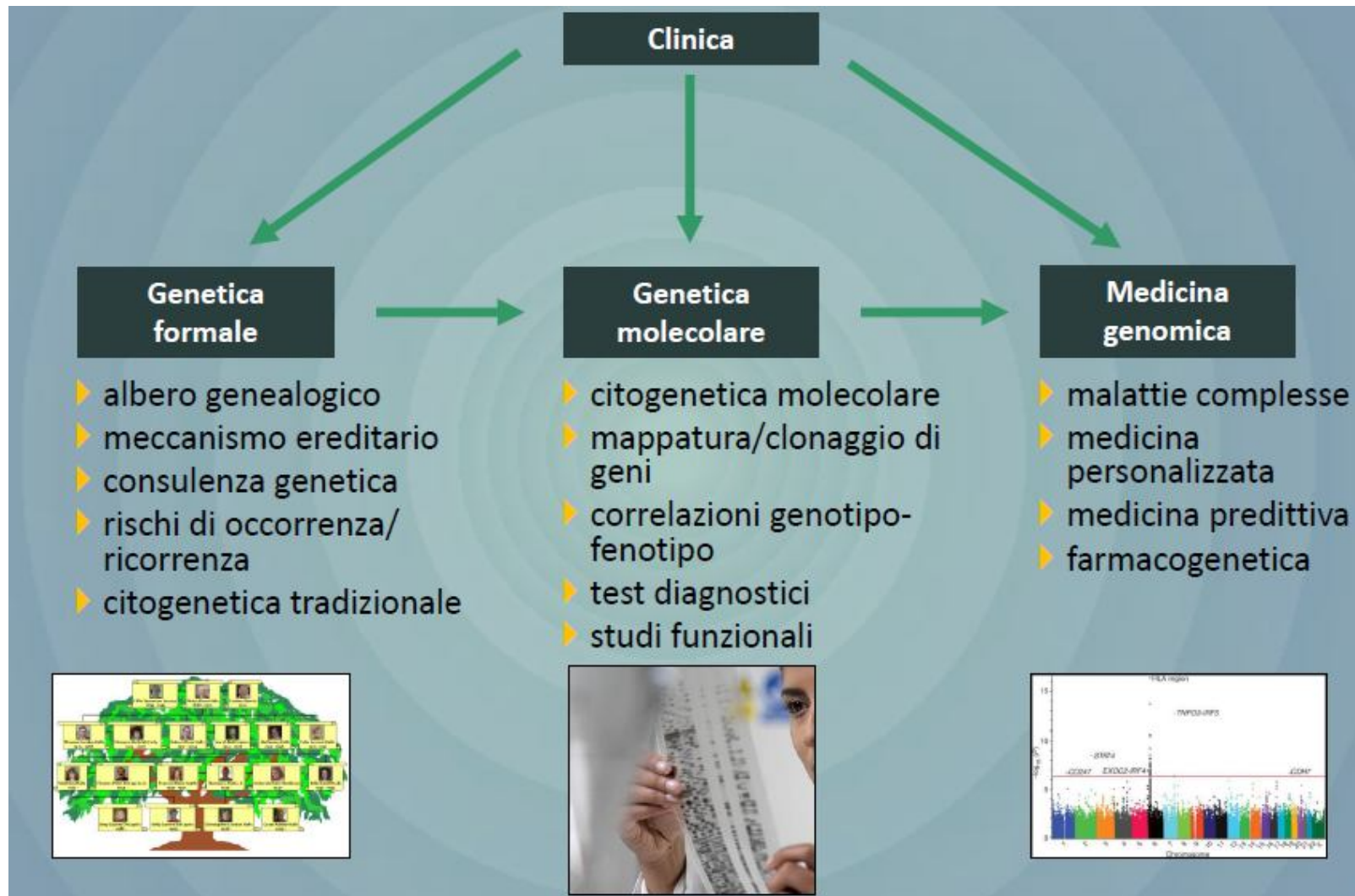


- **Incidenza**

percentuale con la quale si verificano nuovi casi (ad es. 1 per 1000 nati)



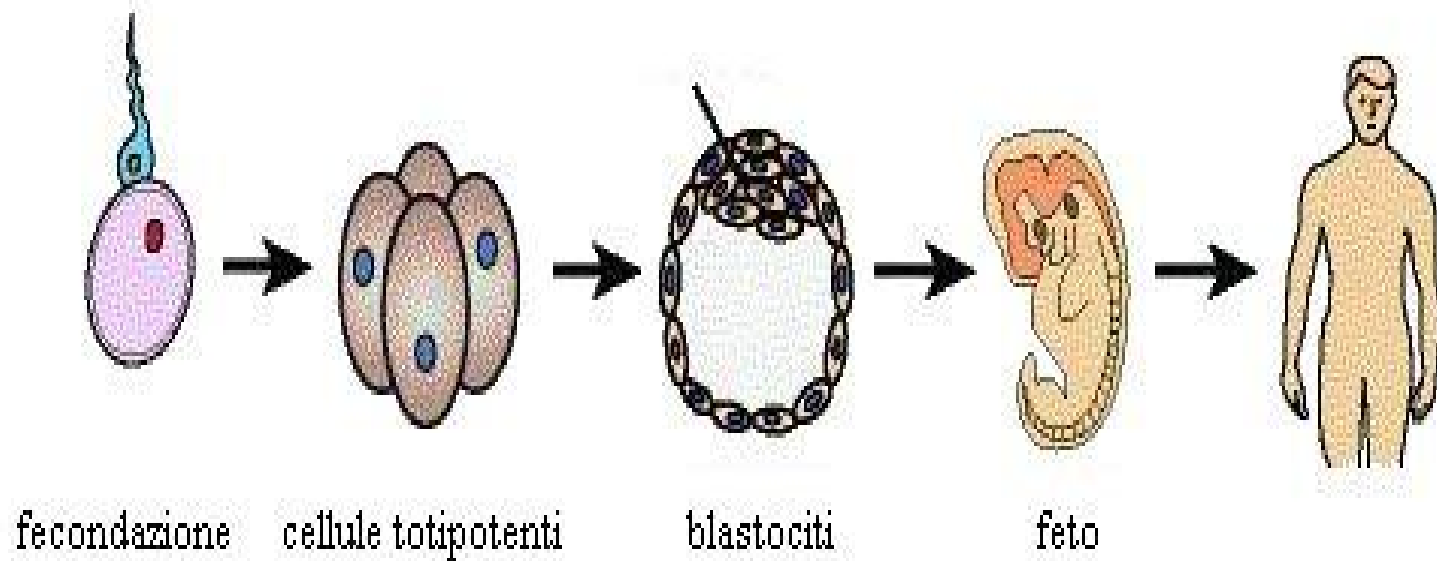
Evoluzione nel tempo dell'approccio alle malattie genetiche





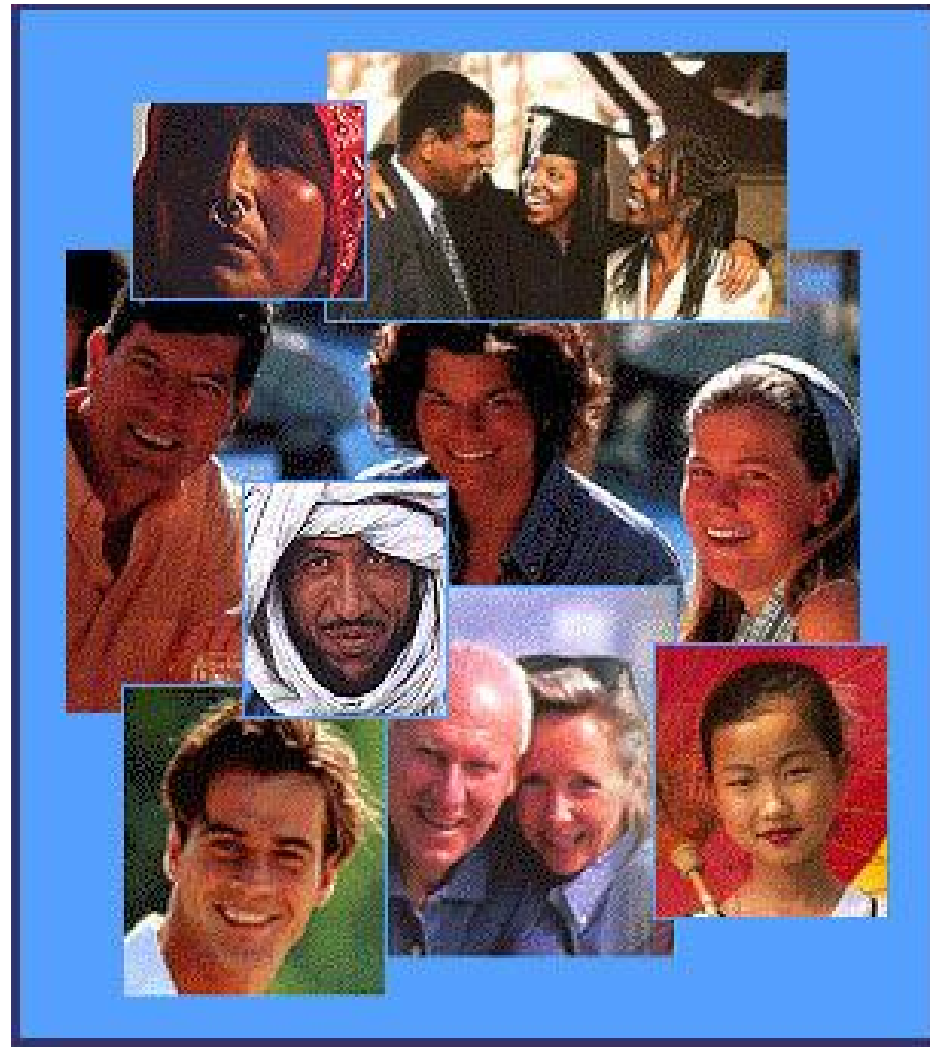
IL PATRIMONIO GENETICO

Cosa determina la divisione di una cellula uovo fecondata fino alla formazione di un nuovo ed unico individuo ?

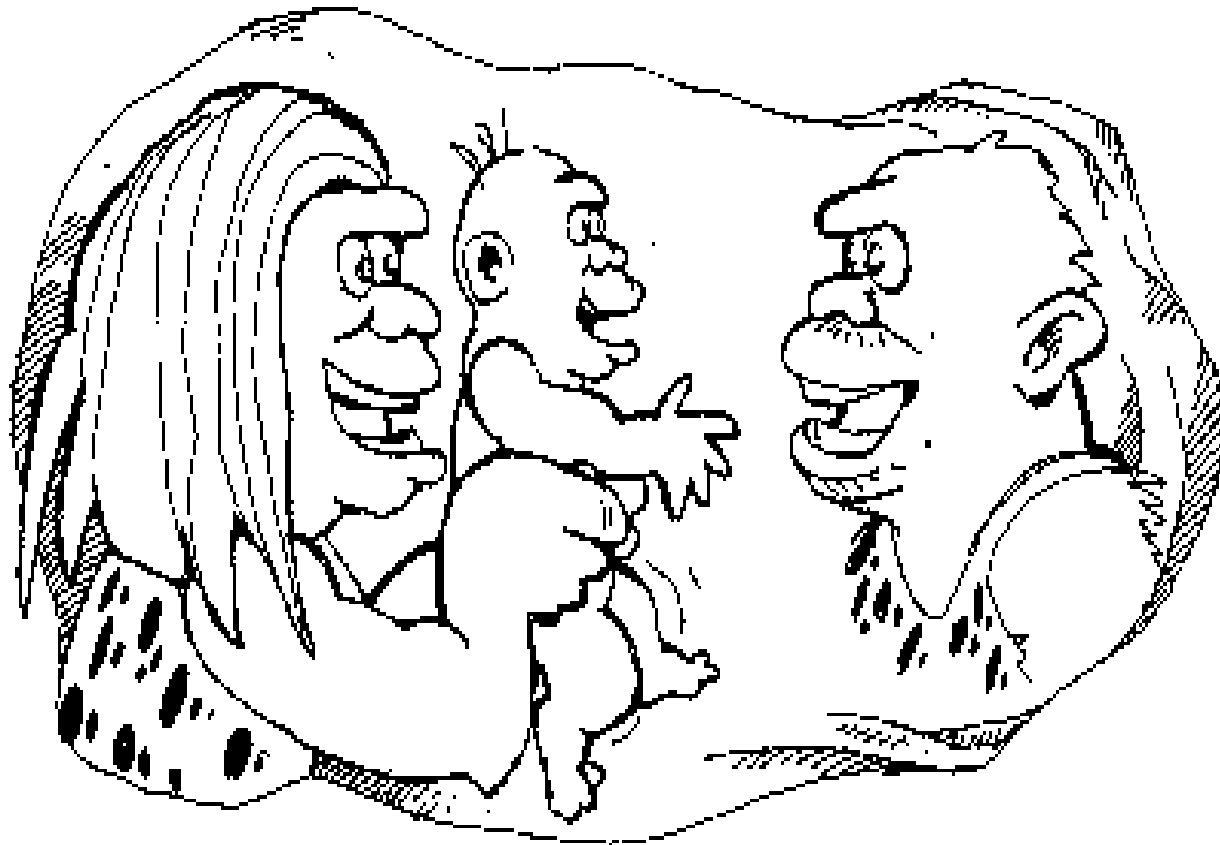


Sviluppo di una cellula staminale

Cosa distingue ciascuno di noi dagli altri individui pur rendendoci considerevolmente simili agli altri membri della specie umana ?



Cosa consente di affermare che un bambino ha il naso del padre o il sorriso della madre ?



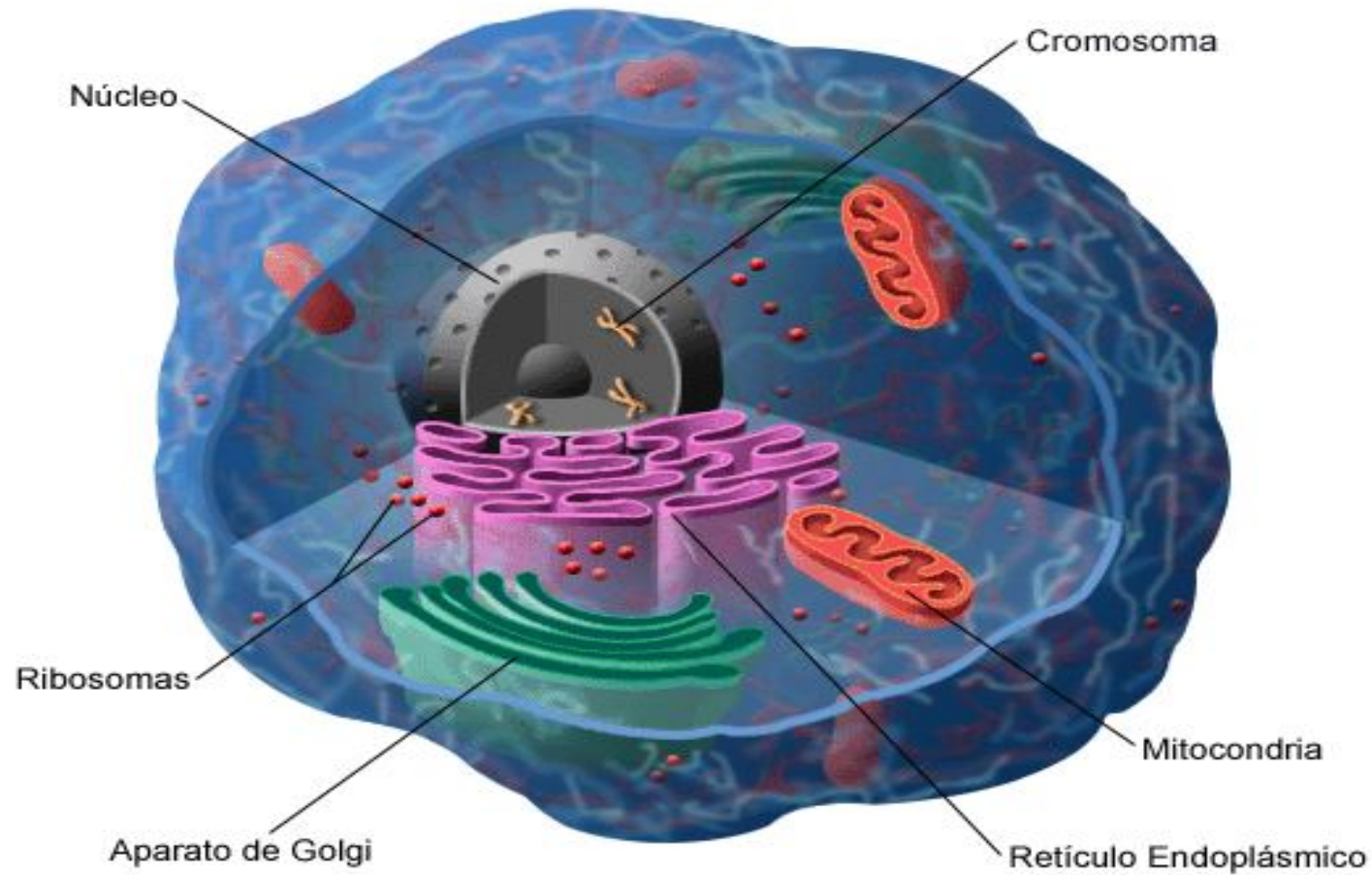
DNA (acido desossiribonucleico)



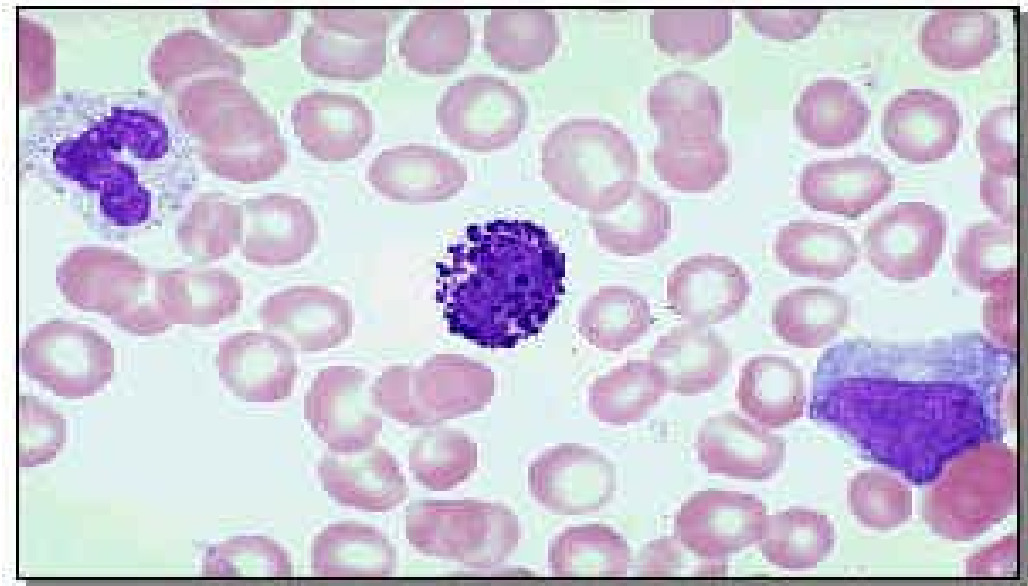
*Il contenuto totale di
DNA di un organismo è
noto come **genoma o**
patrimonio genetico*

Cellula eucariotica

Anatomía de una Célula



La scoperta del DNA



*Friedrich Miescher (1844-1895) isola da leucociti umani una sostanza ricca in fosforo a cui dà il nome di **nucleina** (1867)*

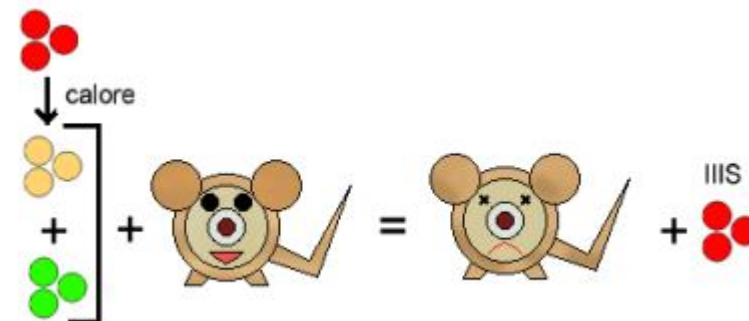
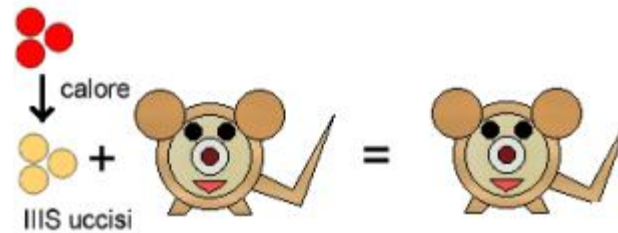
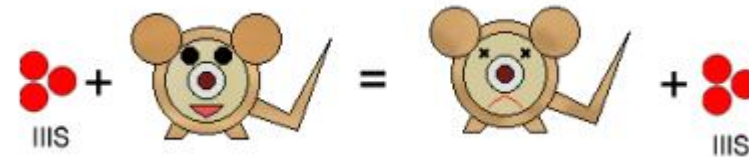
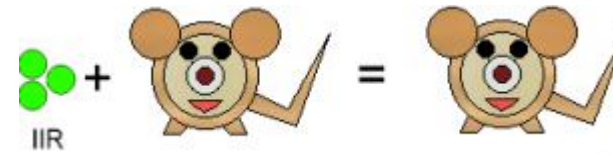
Prova che il DNA è il materiale genetico

- ✓ Esperimento di Frederick Griffith nel 1928 sulla **polmonite batterica da pneumococco** (*Streptococcus pneumoniae*) al British Public Health Service di Londra
- ✓ Esperimento di Oswald Theodore Avery nel 1943 negli Stati Uniti

Fattore trasformante



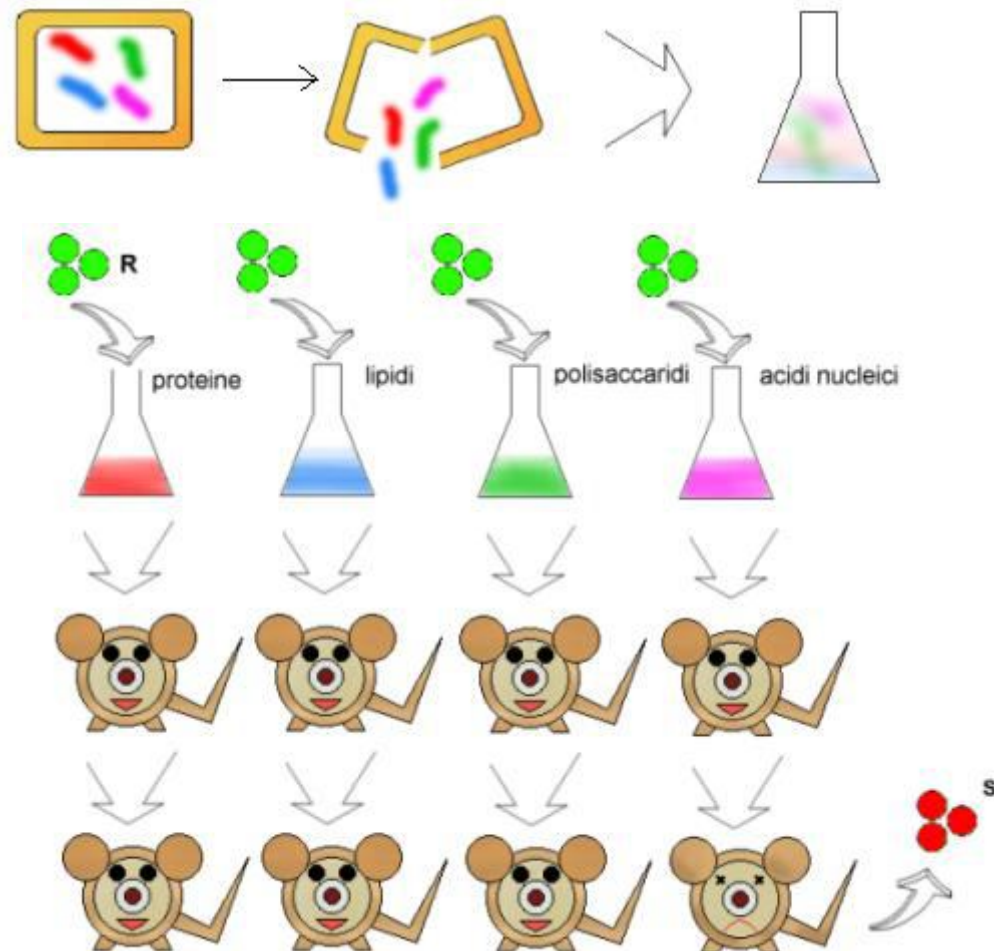
Frederick Griffith
(1879-1941)



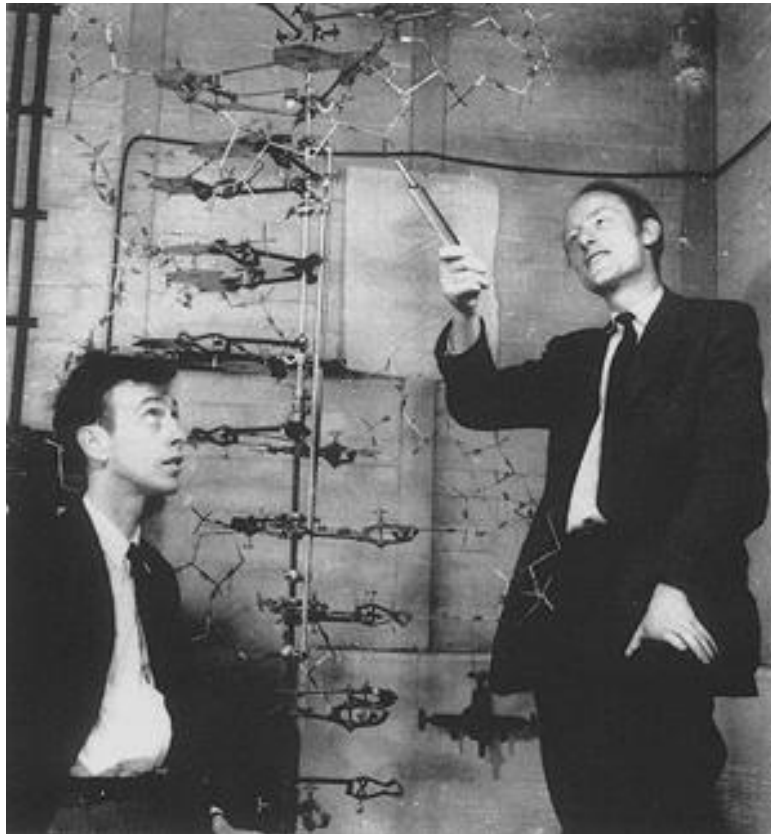
Il fattore trasformante è il DNA



Oswald Theodore Avery
(1877-1977)



Struttura del DNA



Francis Crick e James Watson
(1953)

equipment, and to Dr. G. E. R. Deacon and the captain and officers of R.R.S. *Discovery II* for their part in making the observations.

¹ Young, F. A., Gerard, H., and Jevons, W., *Phil. Mag.*, **49**, 149 (1920).

² Lequest-Higley, M. S., *Nouv. Jst. Exp. Astr. Soc., Geophys. Suppl.*, **5**, 282 (1946).

³ Van Aarts, W. S., *Wood's Hole Papers in Phys. Oceanogr. Meteor.*, **11**, 175 (1944).

⁴ Hensen, V. W., *Astr. Met. Astr. Phys.* (Stockholm), **2**(11) (1938).

MOLECULAR STRUCTURE OF NUCLEIC ACIDS

A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid

WE wish to suggest a structure for the salt of deoxyribose nucleic acid (D.N.A.). This structure has novel features which are of considerable biological interest.

A structure for nucleic acid has already been proposed by Pauling and Corey¹. They kindly made their manuscript available to us in advance of publication. Their model consists of three intertwined chains, with the phosphates near the fibre axis, and the bases on the outside. In our opinion, this structure is unsatisfactory for two reasons: (1) We believe that the material which gives the X-ray diagrams is the salt, not the free acid. Without the acidic hydrogen atoms it is not clear what forces would hold the structure together, especially as the negatively charged phosphates near the axis will repel each other. (2) Some of the van der Waals distances appear to be too small.

Another three-chain structure has also been suggested by Frazer (in the press). In his model the phosphates are on the outside and the bases on the inside, linked together by hydrogen bonds. This structure as described is rather ill-defined, and for this reason we shall not comment on it.

We wish to put forward a radically different structure for the salt of deoxyribose nucleic acid. This structure has two helical chains each coiled round the same axis (see diagram). We have made the usual chemical assumptions, namely, that each chain consists of phosphate di-ester groups joining 2'-O-deoxy-ribofuranose residues with 3',5' linkages. The two chains (but not their bases) are related by a dyad perpendicular to the fibre axis. Both chains follow right-handed helices, but owing to the dyad the sequences of the atoms in the two chains run in opposite directions. Each chain loosely resembles Furberg's² model No. 1; that is, the bases are on the inside of the helix and the phosphates on the outside. The configuration of the sugar and the atoms near it is close to Furberg's 'standard configuration', the sugar being roughly perpendicular to the attached base. There

is a residue on each chain every 3.4 Å. in the z-direction. We have assumed an angle of 38° between adjacent residues in the same chain, so that the structure repeats after 10 residues on each chain, that is, after 34 Å. The distance of a phosphorus atom from the fibre axis is 10 Å. As the phosphates are on the outside, cations have easy access to them.

The structure is an open one, and its water content is rather high. At lower water contents we would expect the bases to tilt so that the structure could become more compact.

The novel feature of the structure is the manner in which the two chains are held together by the purine and pyrimidine bases. The planes of the bases are perpendicular to the fibre axis. They are joined together in pairs, a single base from one chain being hydrogen-bonded to a single base from the other chain, so that the two lie side by side with identical z-co-ordinates. One of the pair must be a purine and the other a pyrimidine for bonding to occur. The hydrogen bonds are made as follows: purine position 1 to pyrimidine position 1; purine position 6 to pyrimidine position 6.

If it is assumed that the bases only occur in the structure in the most plausible tautomeric forms (that is, with the keto rather than the enol configurations) it is found that only specific pairs of bases can bond together. These pairs are: adenine (purine) with thymine (pyrimidine), and guanine (purine) with cytosine (pyrimidine).

In other words, if an adenine forms one member of a pair, on either chain, then on these assumptions the other member must be thymine; similarly for guanine and cytosine. The sequence of bases on a single chain does not appear to be restricted in any way. However, if only specific pairs of bases can be formed, it follows that if the sequence of bases on one chain is given, then the sequence on the other chain is automatically determined.

It has been found experimentally^{3,4} that the ratio of the amounts of adenine to thymine, and the ratio of guanine to cytosine, are always very close to unity for deoxyribose nucleic acid.

It is probably impossible to build this structure with a ribose sugar in place of the deoxyribose, as the extra oxygen atom would make too close a van der Waals contact.

The previously published X-ray data^{5,6} on deoxyribose nucleic acid are insufficient for a rigorous test of our structure. So far as we can tell, it is roughly compatible with the experimental data, but it must be regarded as unproved until it has been checked against more exact results. Some of these are given in the following communications. We were not aware of the details of the results presented there when we devised our structure, which rests mainly though not entirely on published experimental data and stereochemical arguments.

It has not escaped our notice that the specific pairing we have postulated immediately suggests a possible copying mechanism for the genetic material.

Full details of the structure, including the conditions assumed in building it, together with a set of co-ordinates for the atoms, will be published elsewhere.

We are much indebted to Dr. Jerry Donohue for constant advice and criticism, especially on interatomic distances. We have also been stimulated by a knowledge of the general nature of the unpublished experimental results and ideas of Dr. M. H. F. Wilkins, Dr. R. E. Franklin and their co-workers at



This figure is purely diagrammatic. The two chains revolve the two phosphate-sugar chains, and the horizontal rods the pairs of bases holding the chains together. The vertical line marks the fibre axis.

equipment, and to Dr. G. E. R. Deacon and the captain and officers of R.R.S. *Discovery II* for their part in making the observations.

¹ Young, F. B., Gerrard, H., and Jevons, W., *Phil. Mag.*, **40**, 149 (1920).

² Longuet-Higgins, M. S., *Mon. Not. Roy. Astro. Soc., Geophys. Supp.*, **5**, 285 (1949).

³ Von Arx, W. S., *Woods Hole Papers in Phys. Oceanog. Meteor.*, **11** (3) (1950).

⁴ Ekman, V. W., *Arkiv. Mat. Astron. Fysik. (Stockholm)*, **2** (11) (1905).

MOLECULAR STRUCTURE OF NUCLEIC ACIDS

A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid

WE wish to suggest a structure for the salt of deoxyribose nucleic acid (D.N.A.). This structure has novel features which are of considerable biological interest.

A structure for nucleic acid has already been proposed by Pauling and Corey¹. They kindly made their manuscript available to us in advance of publication. Their model consists of three intertwined chains, with the phosphates near the fibre axis, and the bases on the outside. In our opinion, this structure is unsatisfactory for two reasons: (1) We believe that the material which gives the

is a residue on each chain every 3.4 Å. in the z-direction. We have assumed an angle of 36° between adjacent residues in the same chain, so that the structure repeats after 10 residues on each chain, that is, after 34 Å. The distance of a phosphorus atom from the fibre axis is 10 Å. As the phosphates are on the outside, cations have easy access to them.

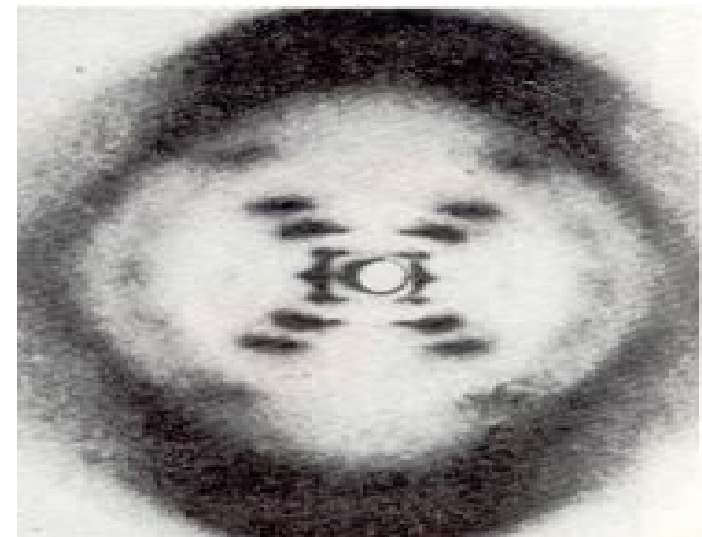
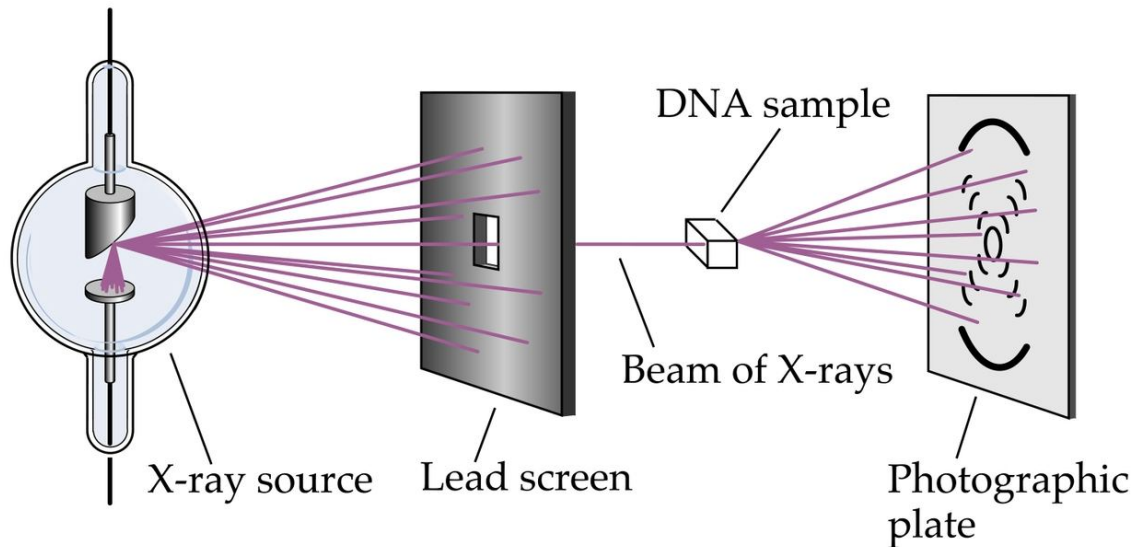
The structure is an open one, and its water content is rather high. At lower water contents we would expect the bases to tilt so that the structure could become more compact.

The novel feature of the structure is the manner in which the two chains are held together by the purine and pyrimidine bases. The planes of the bases are perpendicular to the fibre axis. They are joined together in pairs, a single base from one chain being hydrogen-bonded to a single base from the other chain, so that the two lie side by side with identical z-co-ordinates. One of the pair must be a purine and the other a pyrimidine for bonding to occur. The hydrogen bonds are made as follows: purine position 1 to pyrimidine position 1; purine position 6 to pyrimidine position 6.

If it is assumed that the bases only occur in the structure in the most plausible tautomeric forms (that is, with the keto rather than the enol configurations) it is found that only specific pairs of bases can bond together. These pairs are: adenine (purine) with thymine (pyrimidine), and guanine



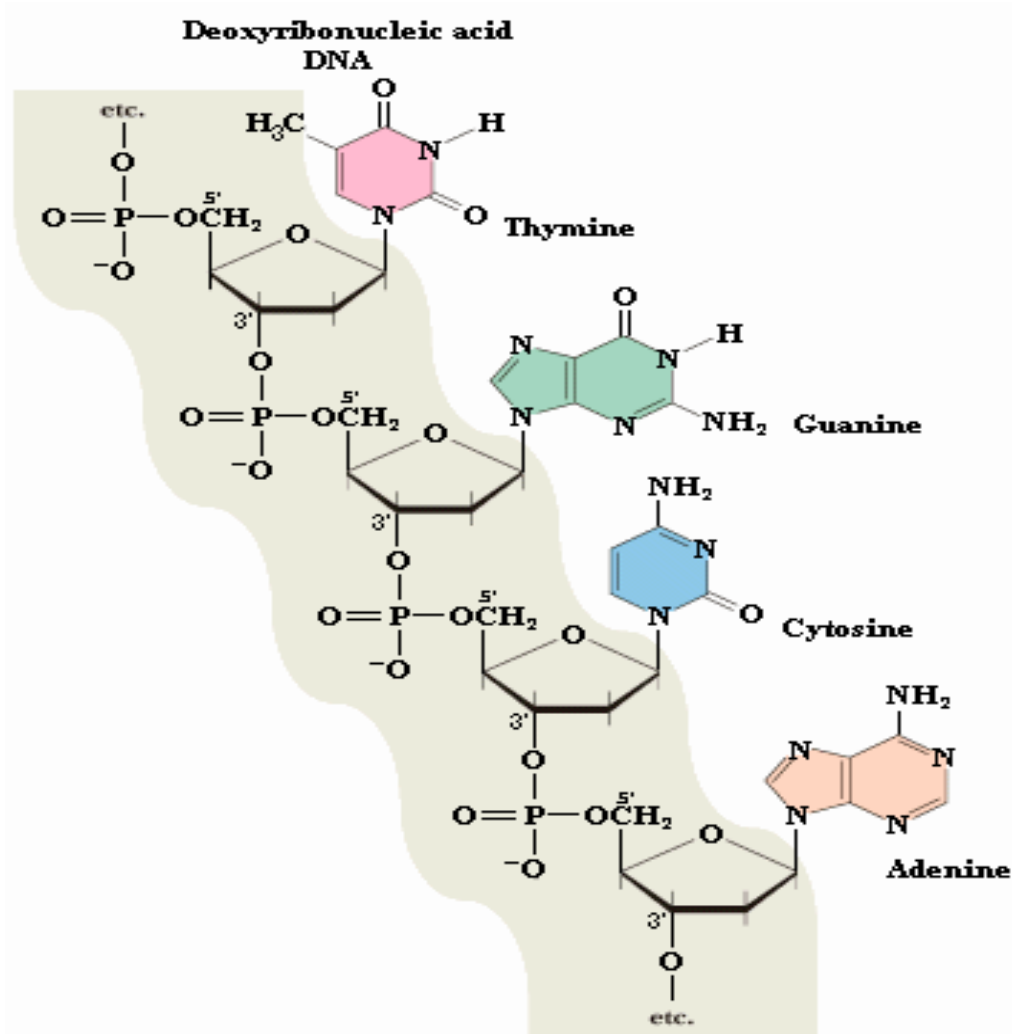
Rosalind Franklin , mediante la tecnica di diffrazione dei raggi X, ottiene delle immagini di cristalli di DNA altamente purificato (1952): ***dimostrazione della doppia elica.***



Il contenuto di DNA nelle cellule

- ✓ Le *cellule somatiche* contengono la stessa quantità di DNA
- ✓ Le *cellule riproduttive* contengono la metà di DNA rispetto alle cellule somatiche

Filamento di DNA

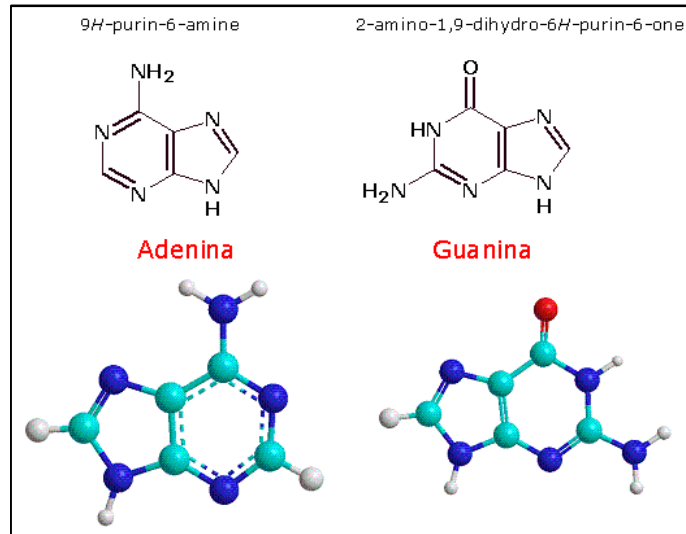


base azotata (purine: adenina e
guanina; pirimidine: timina e
citosina)+ **zucchero**
(desossiribosio) + **fosforo** =

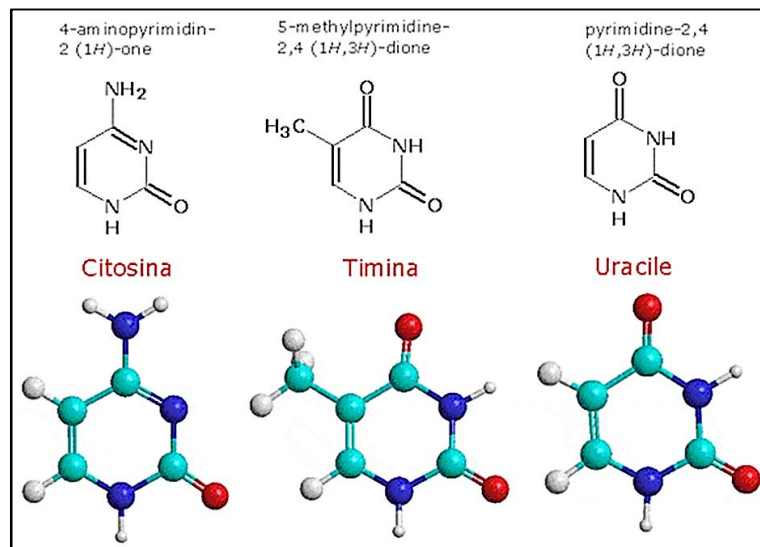
NUCLEOTIDE

nucleotidi legati dal fosforo
attraverso lo zucchero =
filamento di DNA

Le basi azotate



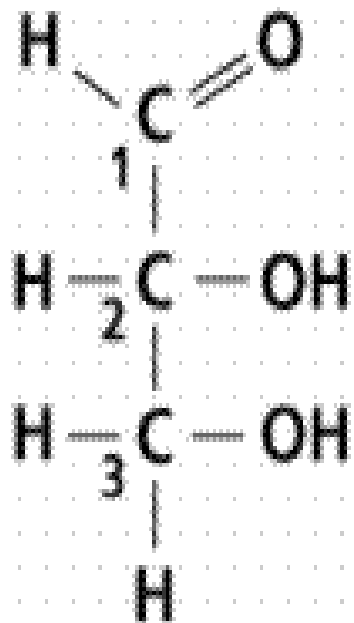
Le basi azotate sono composti eterociclici aromatici con azoti portanti doppietti basici. Possono avere un solo anello (pirimidine) o due (purine).



Un composto eterociclico rappresenta una struttura ciclica in cui sono presenti atomi diversi dal carbonio. Gli elementi che più comunemente tendono a sostituire uno o più atomi di carbonio sono l'azoto, l'ossigeno e lo zolfo. Gli eterocicli possono essere sia ad anello semplice che ad anello condensato (unione di più anelli)

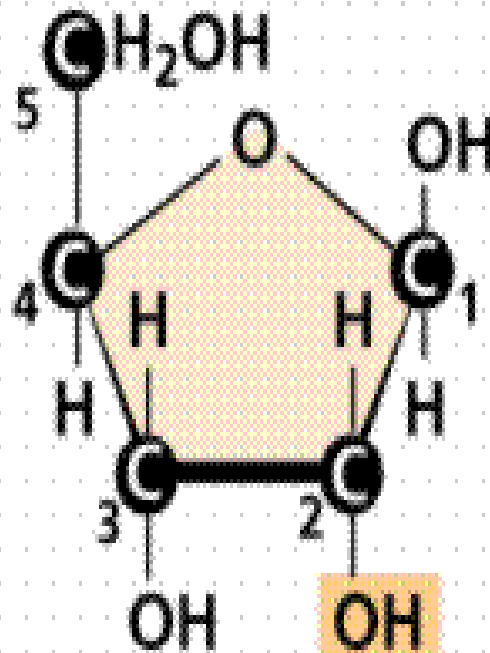
Struttura di alcuni zuccheri

Three-carbon sugar

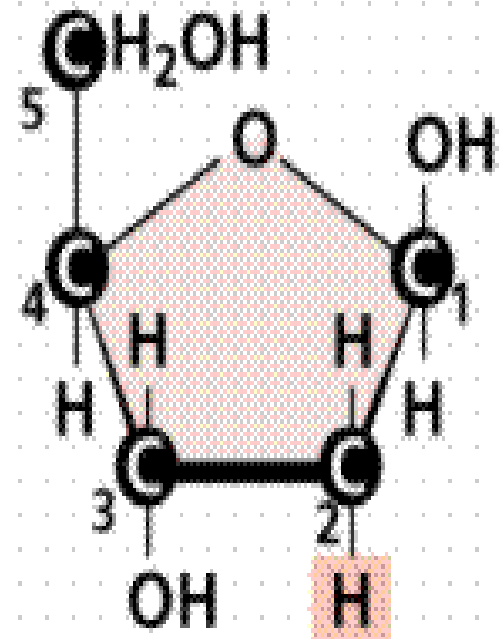


Glyceraldehyde

Five-carbon sugars

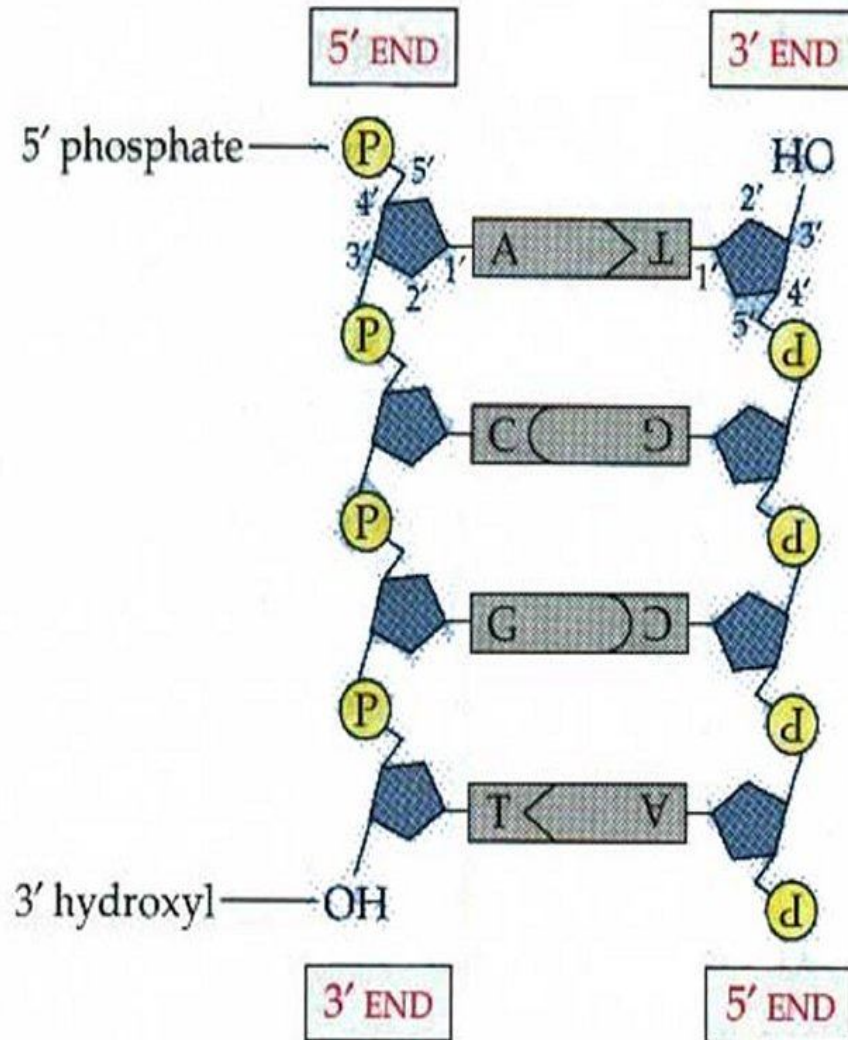


Ribose



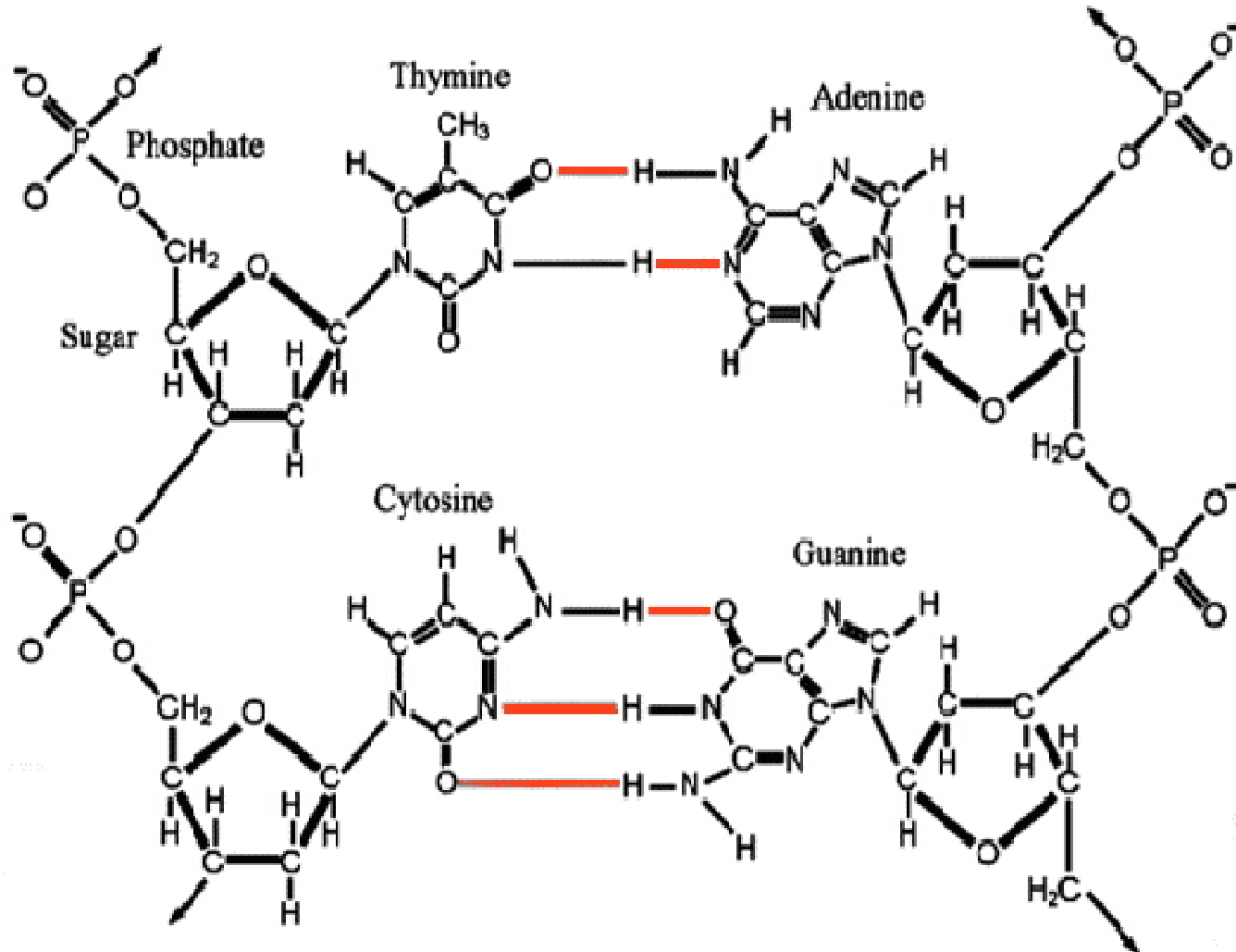
Deoxyribose

Struttura a doppio filamento

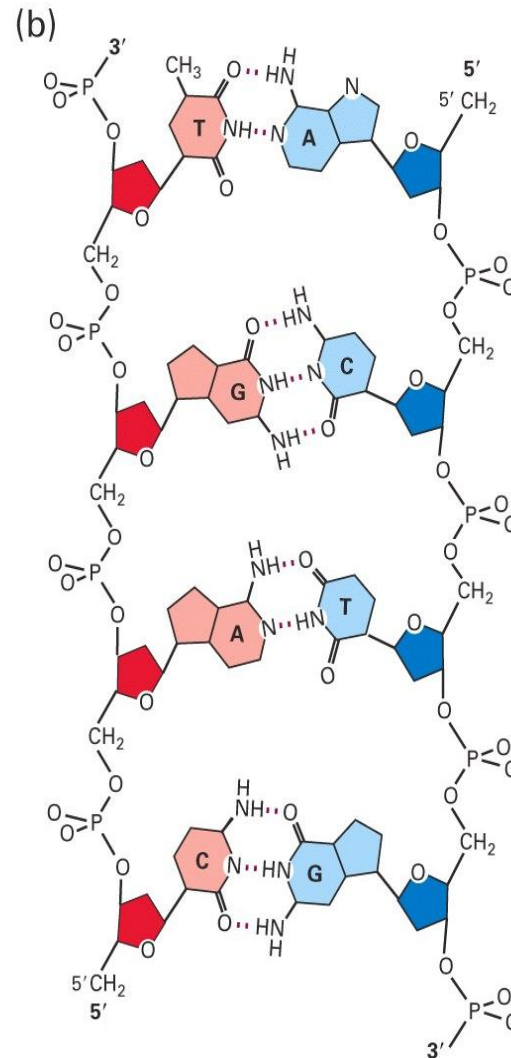
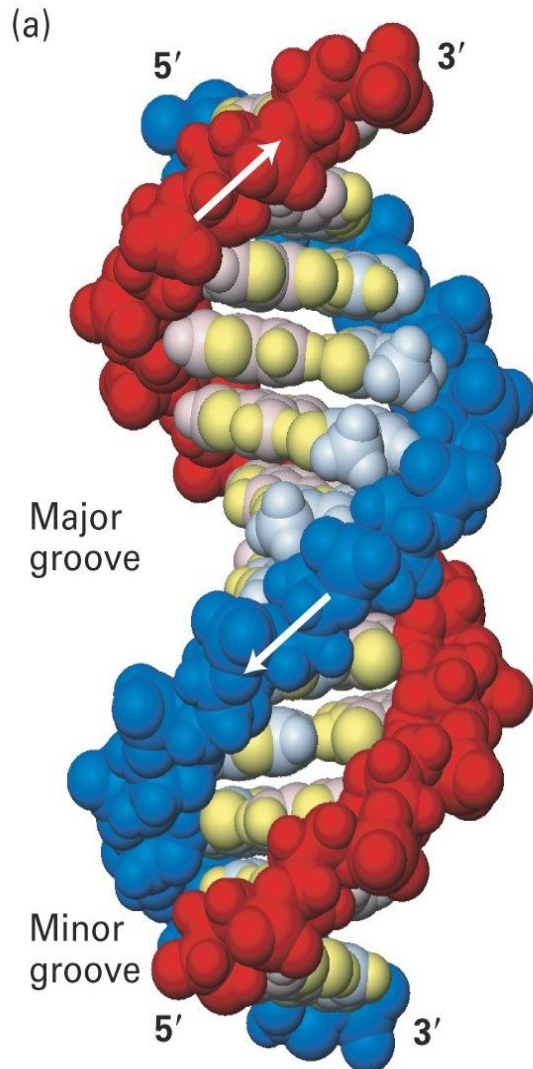


- ✓ **impalcatura di zucchero-fosfato** all'esterno ; **basi azotate** all'interno tenute insieme da **legami H**
- ✓ **complementarietà** tra le basi
- ✓ **filamenti antiparalleli**

Legami idrogeno



Conformazione a spirale della doppia elica



Le paia di basi (bp) tengono unite la doppia elica.

L'inizio di un filamento di una molecola di DNA è definita **5'**.

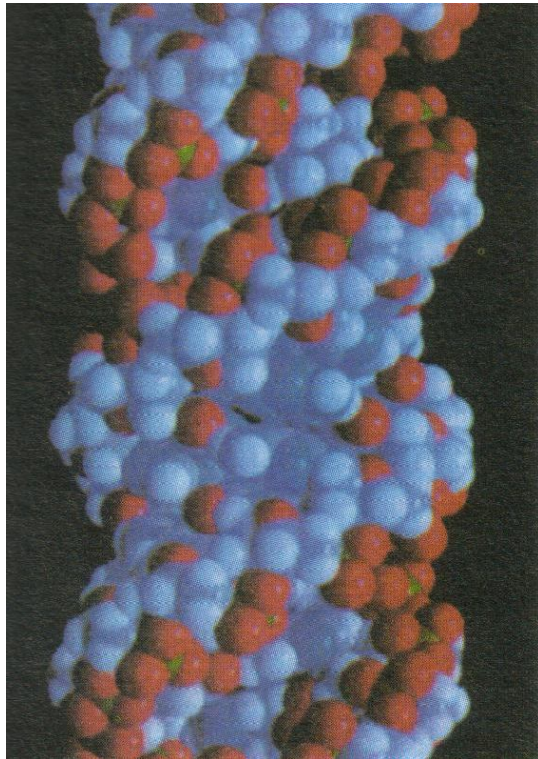
La fine di un filamento di una molecola di DNA è definita **3'**.

I termini **5'** e **3'** si riferiscono alla posizione libera dello zucchero

I due filamenti in una doppia elica sono orientati in **direzioni opposte**.

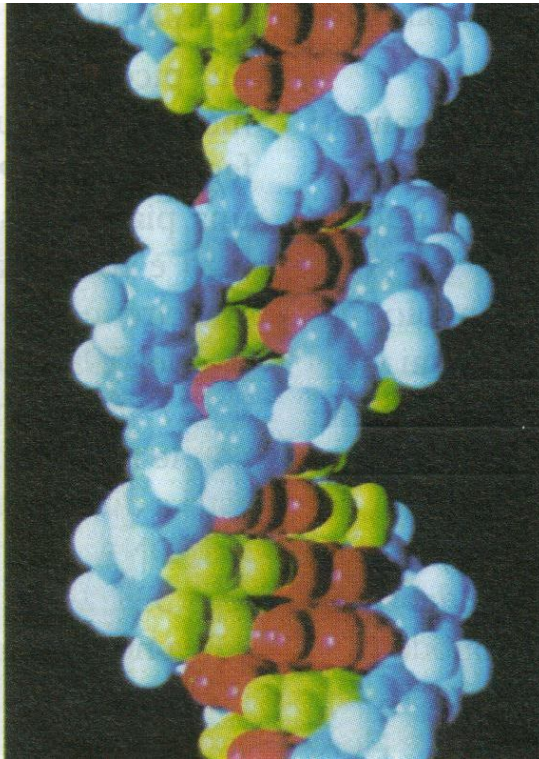
Le tre forme di DNA

DNA A



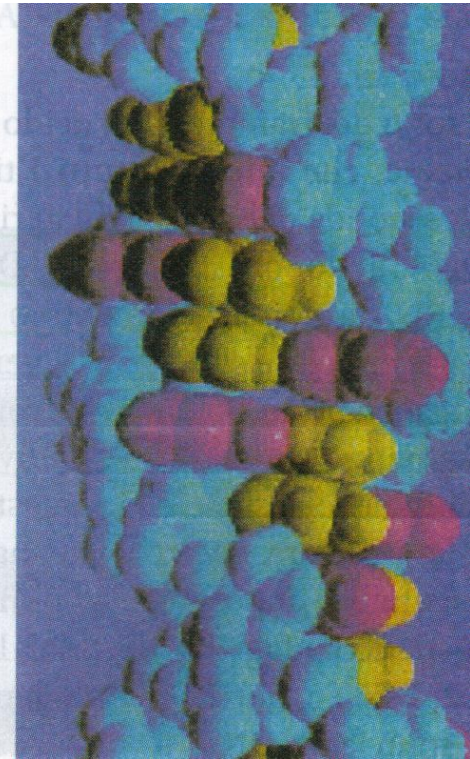
Doppia elica destrorsa
con 10,9 bp/g

DNA B



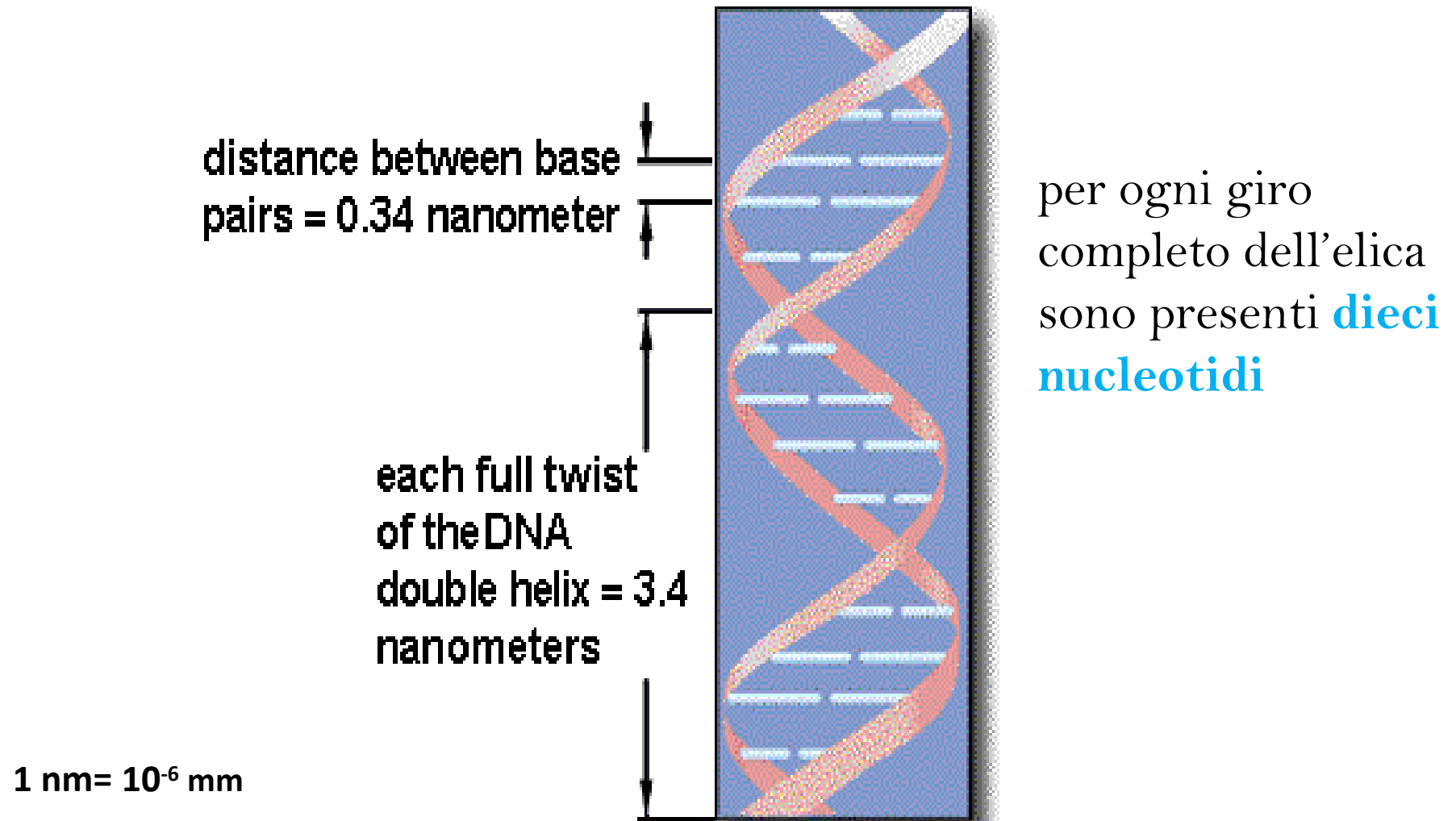
Doppia elica destrorsa con
10 bp/g (Watson e Crick)

DNA Z

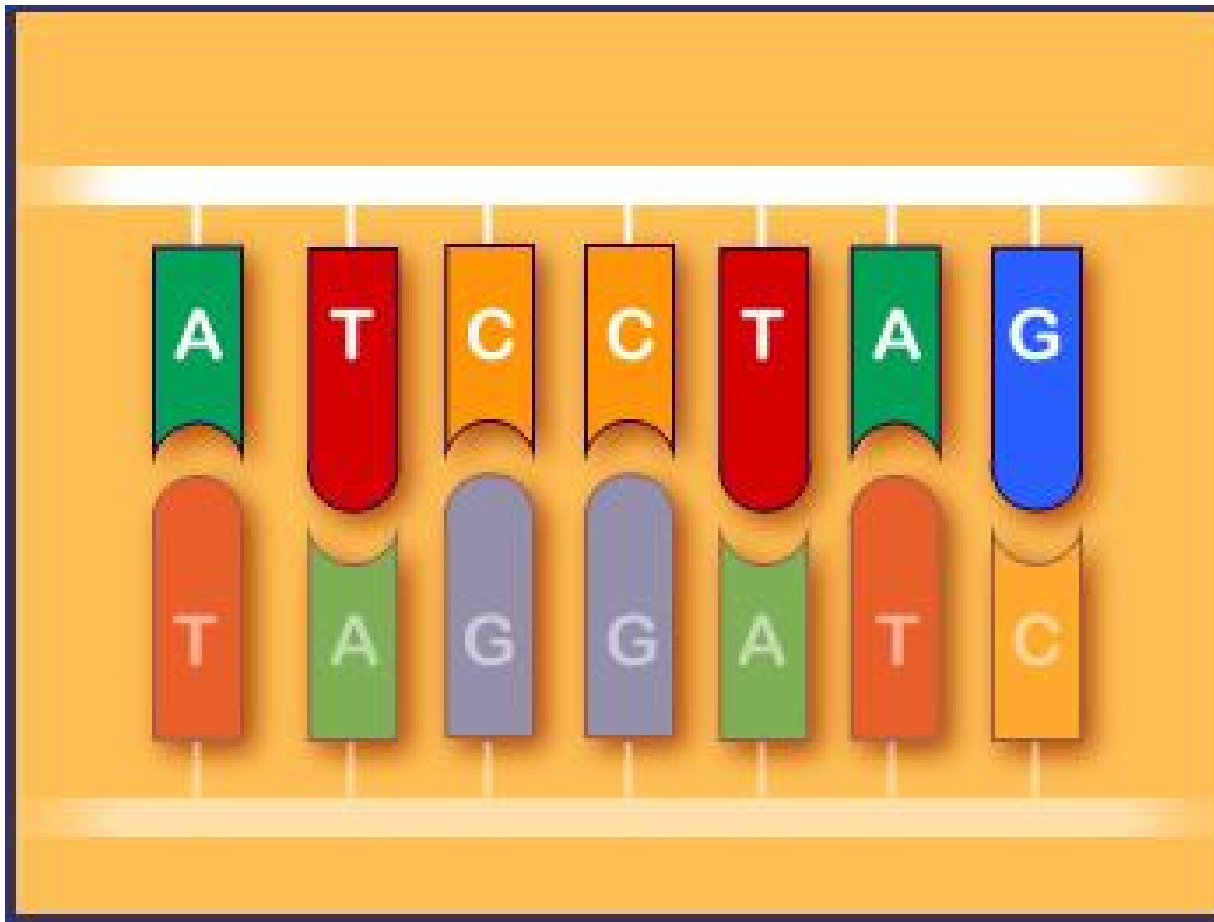


Doppia elica sinistrosa
con 12 bp/g

Doppia elica



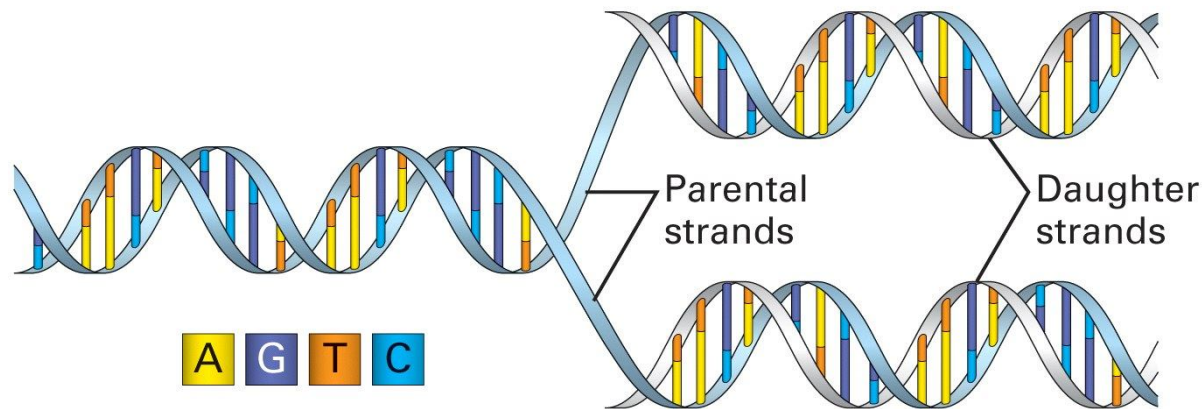
Sequenza del DNA



L'ordine delle basi nucleotidiche lungo un filamento di DNA è conosciuto come sequenza

La replicazione del DNA

Il modello di Watson e Crick offre un sistema intrinseco per copiare accuratamente l'informazione genetica: replicazione **semiconservativa**

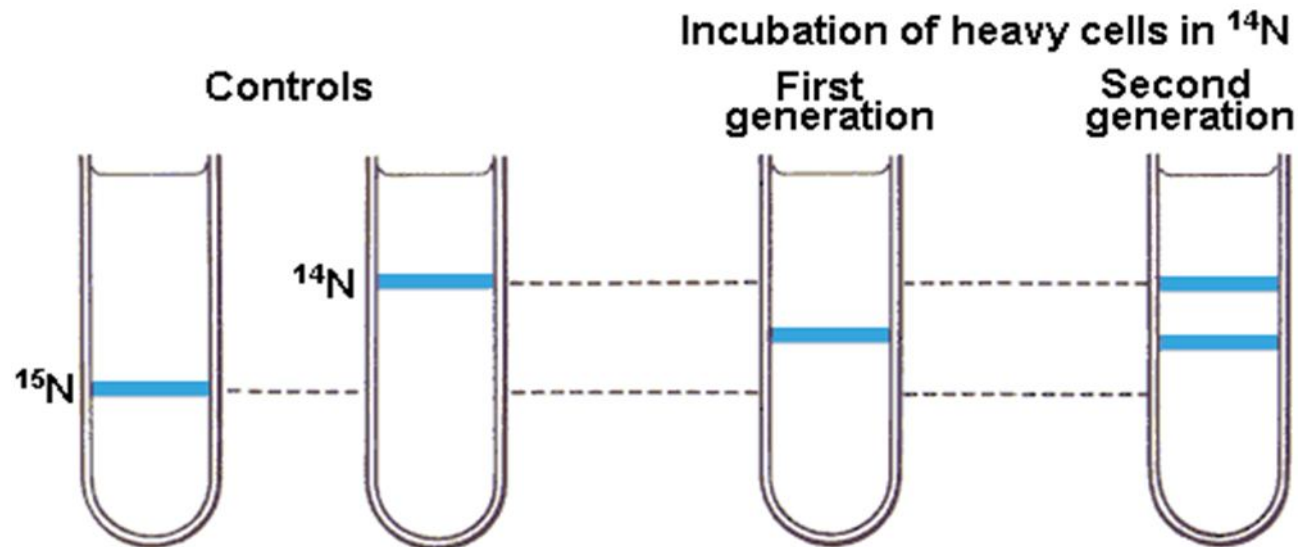


Durante la divisione cellulare tutto il DNA cellulare viene copiato:

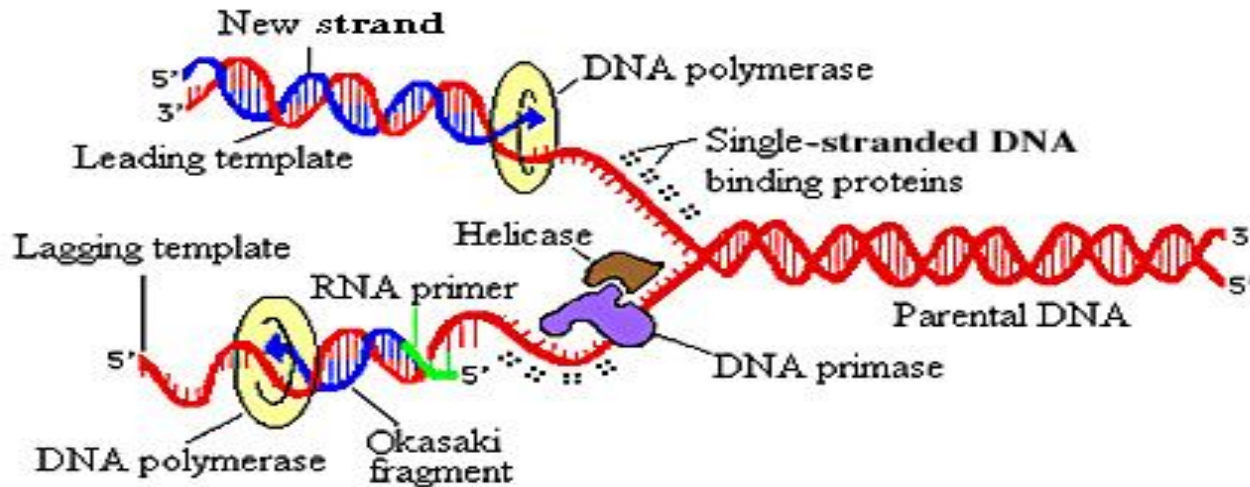
- i due **filamenti si separano**
- vengono sintetizzati i **filamenti complementari**
- vengono prodotte **due sequenze di DNA duplicate**

Esperimento di Meselson e Shtal (1958)

Si partì dalla considerazione che **l'azoto è un componente essenziale del DNA**, perciò, ogni volta che una cellula si divide e il suo DNA si duplica, quest'ultimo dovrà incorporare nuovi atomi di N per distribuirsi nelle cellule figlie. Scelsero allora di utilizzare, accanto all'isotopo comune ^{14}N "leggero", l'isotopo radioattivo ^{15}N più "pesante". L'idea era poi quella di sottoporre le miscele di coltura delle cellule duplicate a una particolare tecnica di centrifugazione, detta per **gradiente di densità**, in grado di separare le frazioni di DNA contenenti l'isotopo ^{14}N "leggero" da quelle marcate con l'isotopo ^{15}N "pesante"



Enzimi della replicazione

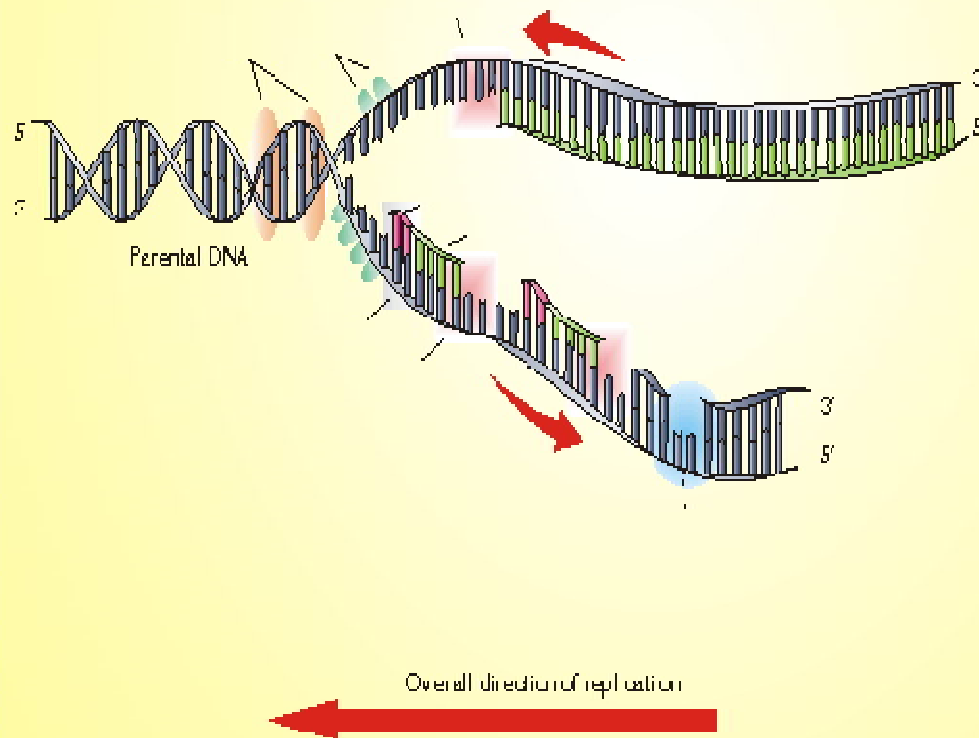


Collaboration of Proteins at the Replication Fork

- DNA polimerasi I (rimuove l'RNA primer sostituendolo con DNA)
- DNA polimerasi III (si lega al primer e comincia a sintetizzare DNA)
- Rna primasi (sintetizza l'RNA primer)
- DNA elicasi (srotola la doppia elica rompendo i legami H)
- DNA girasi e topoisomerasi (facilitano lo svolgimento della doppia elica)
- Dna ligasi (unisce i frammenti di Okazaki)

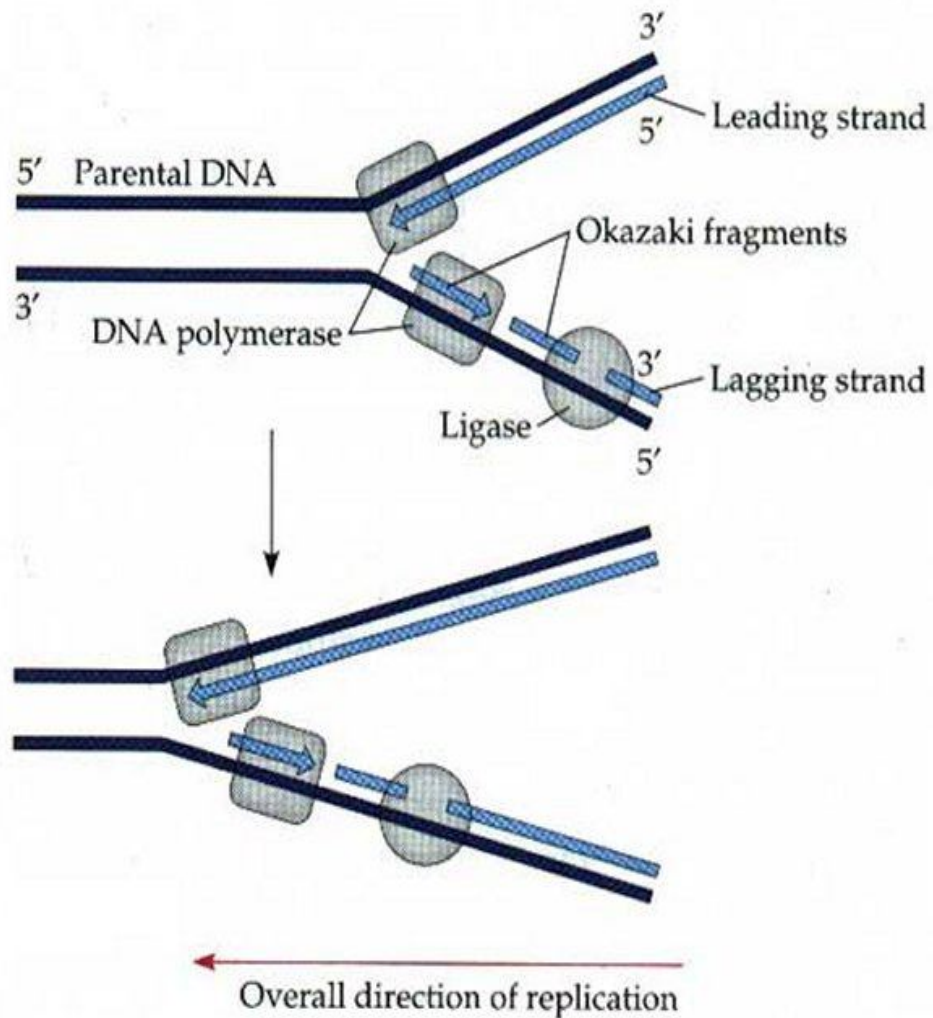
DNA polimerasi

Summary of DNA Replication



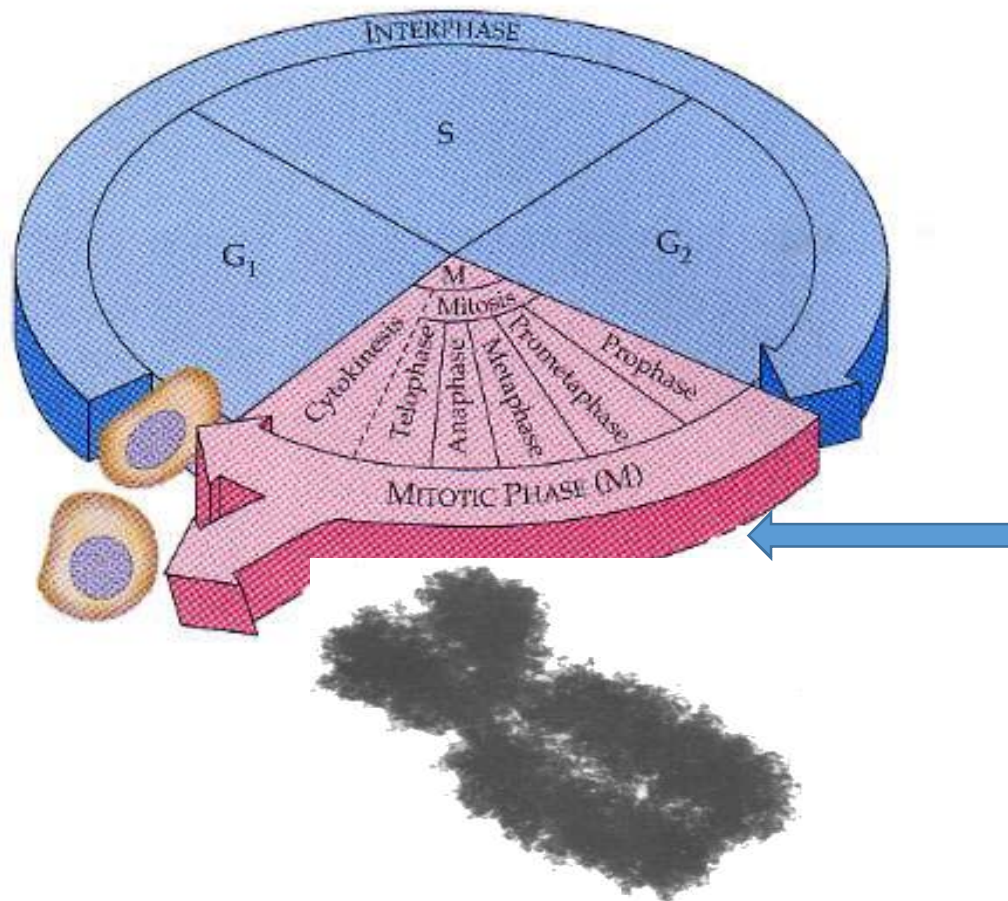
- La DNA polimerasi può sintetizzare (aggiungere dNTPs) in **una sola direzione**: dall'estremità 5' verso quella 3' del nuovo filamento che si sta formando
- la DNA polimerasi ha anche un'attività esonucleasica 3'5' (correzione di bozze)

Frammenti di Okasaki



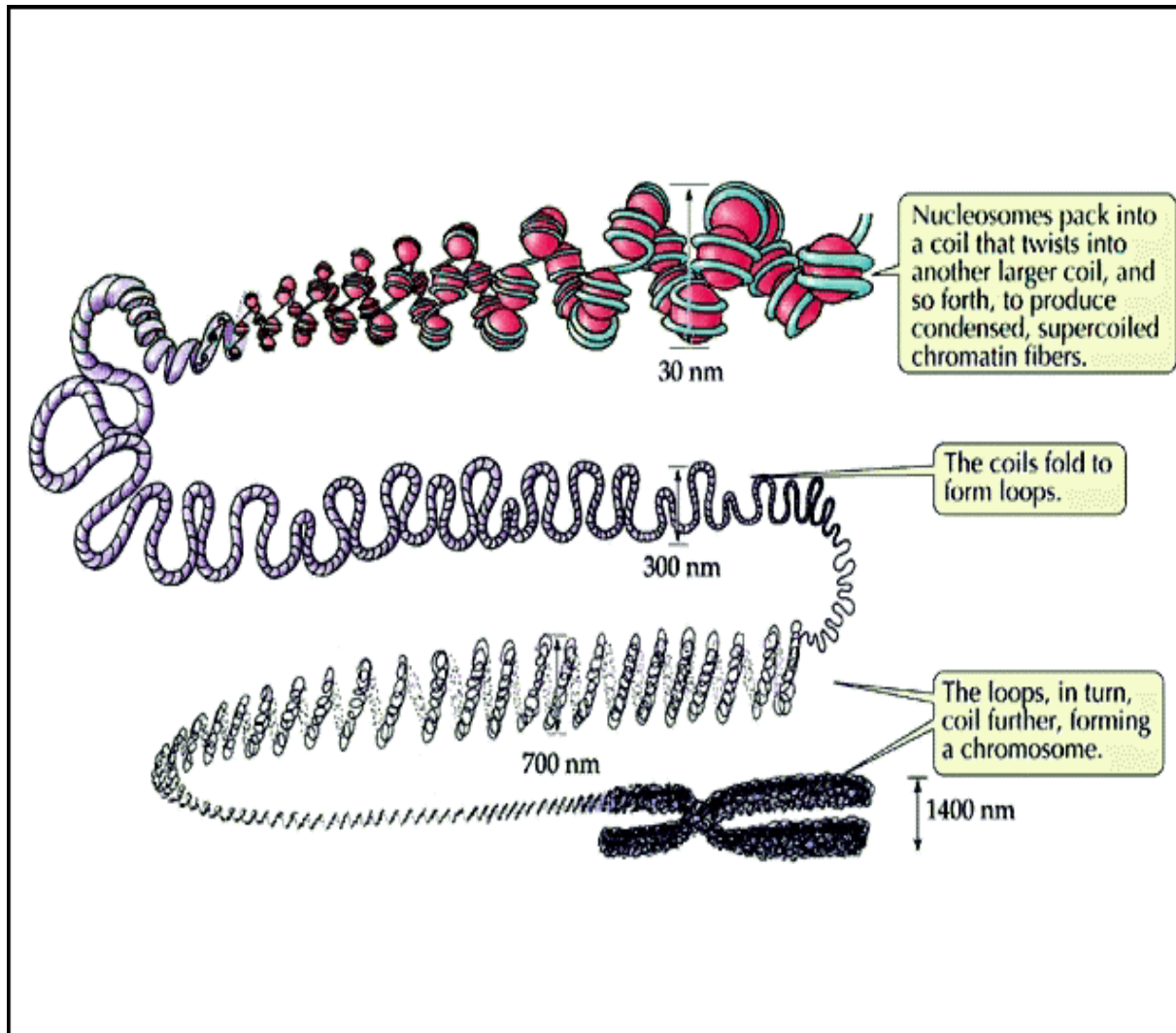
Il nuovo **filamento 3'5'** viene costruito a segmenti (nella direzione 5'3'): i frammenti di Okasaki, che verranno successivamente legati dalla DNA ligasi

Cromosoma



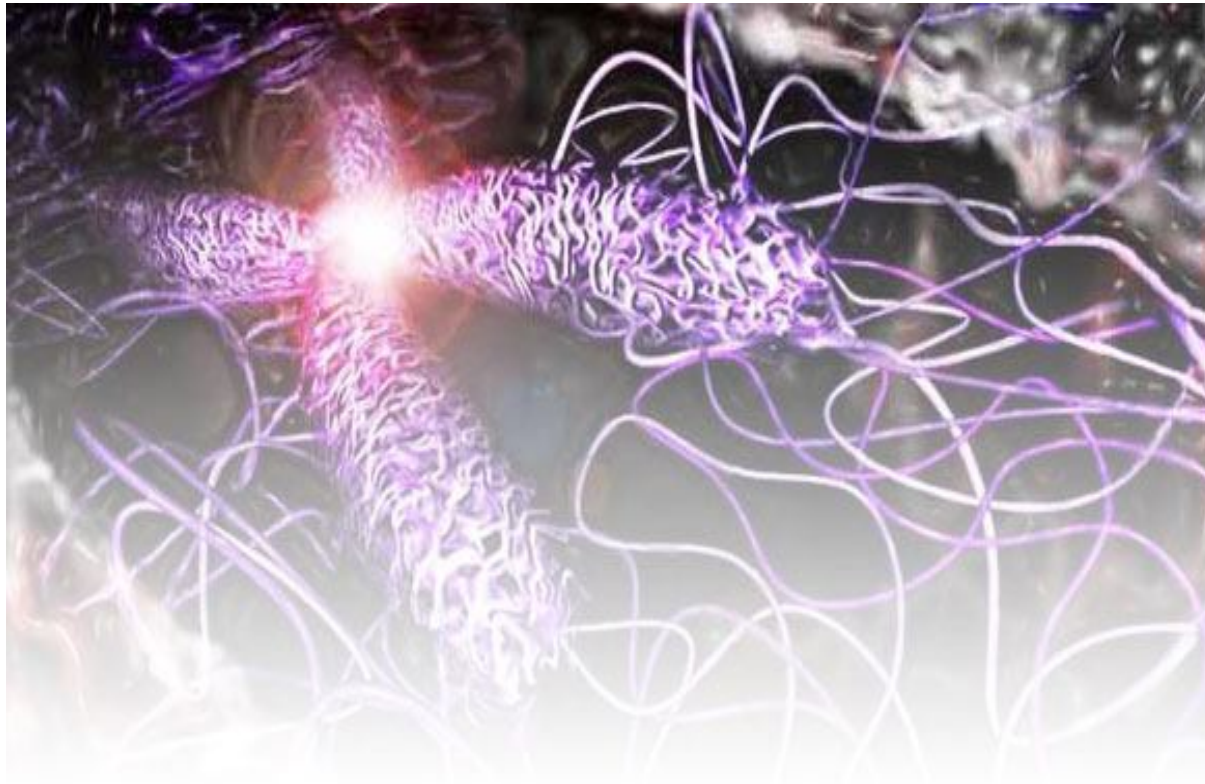
Particolare organizzazione del DNA che è presente solo in una determinata fase della vita di una cellula: la **divisione cellulare**.

Impacchettamento del DNA



Ogni cromosoma contiene una **singola molecola di DNA**, ripiegata molte volte, associata a varie proteine (istoniche e non istoniche)

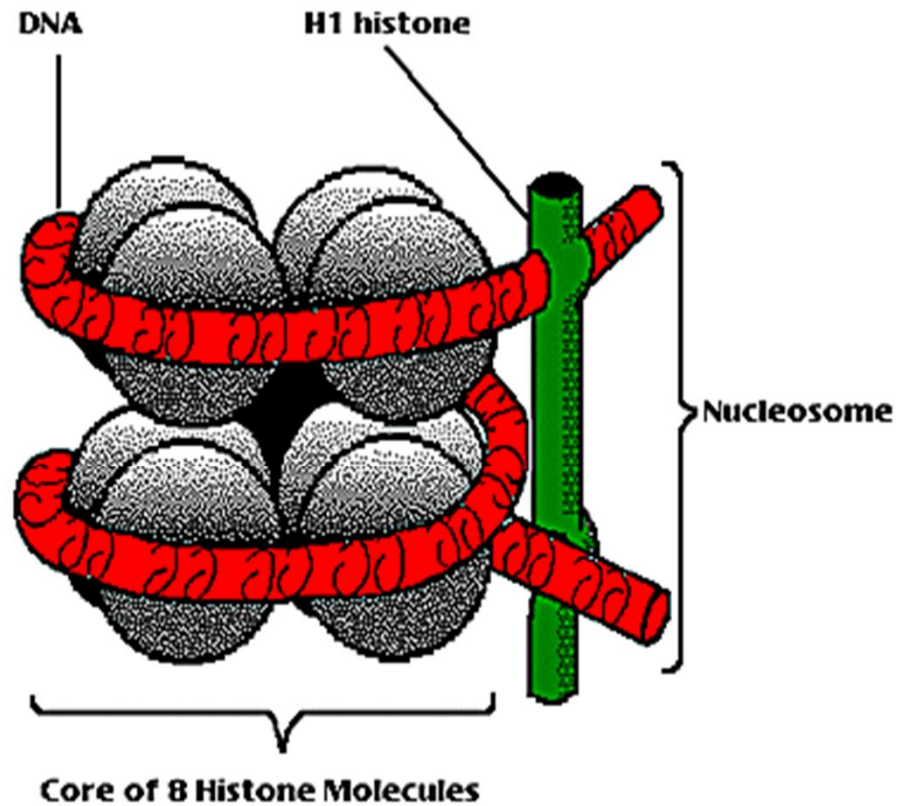
Quantità di DNA cellulare



Se il DNA si potesse srotolare, ogni cellula ne conterrebbe **circa 2 metri**, ma allo stesso tempo la doppia elica è così sottile ed avvolta su se stessa da occupare un volume microscopico.

Con tutto il DNA presente nel nostro organismo si potrebbe coprire 1200 volte la distanza fra la terra e il sole.

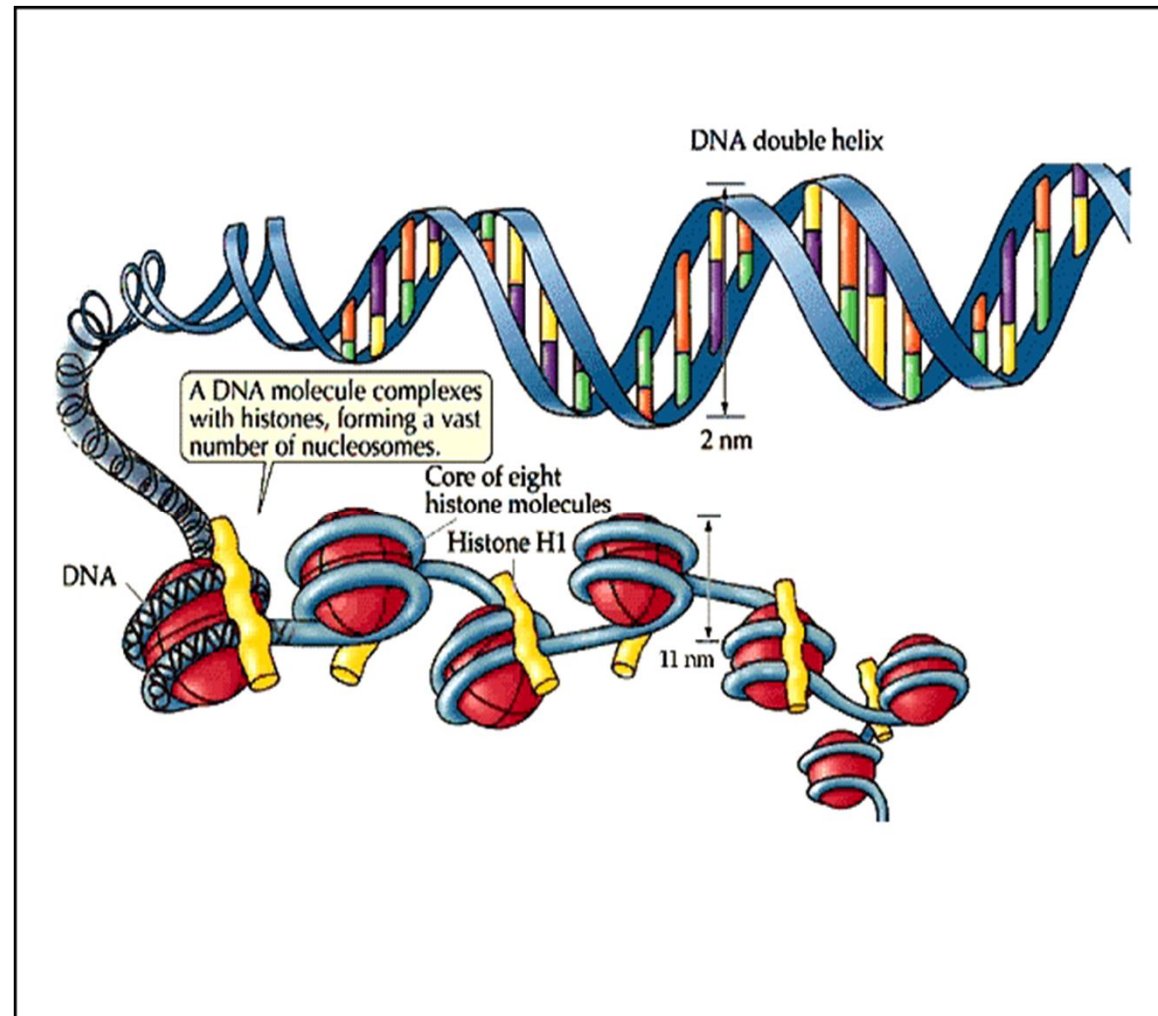
Nucleosoma



Nucleosome

Disposizione
della molecola
di DNA **attorno**
a gruppi di
istoni

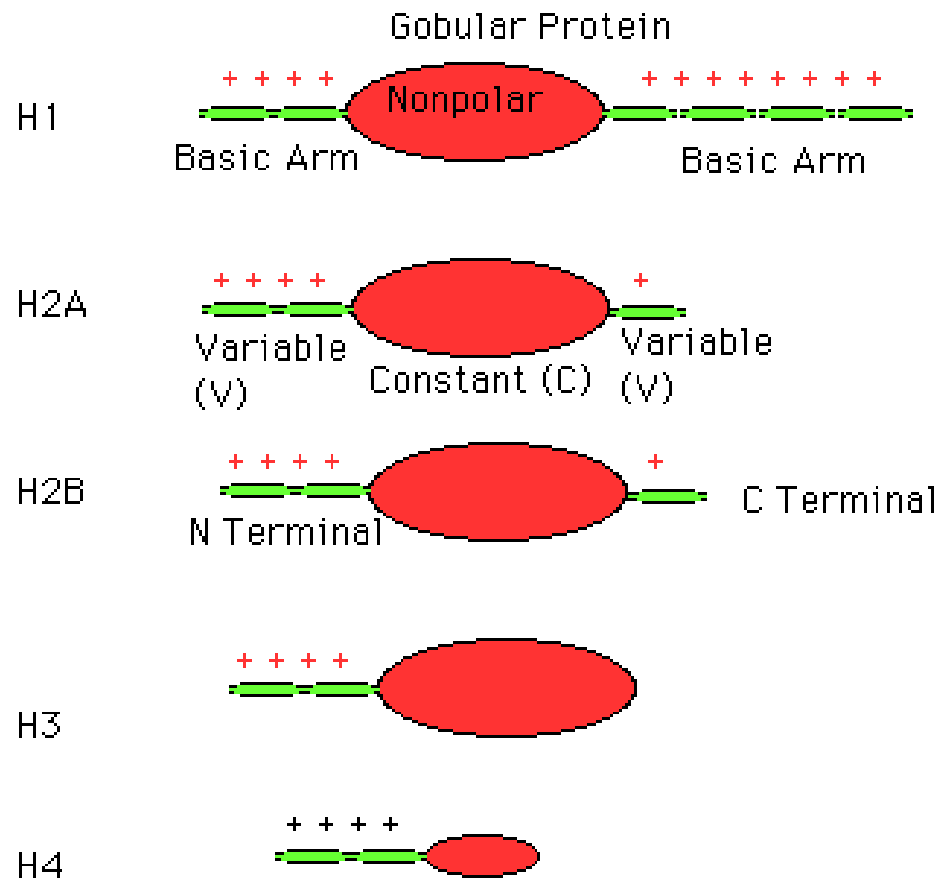
Nucleosomi



Struttura simile ad una **collana di perle**: “le perle” sono i nucleosomi

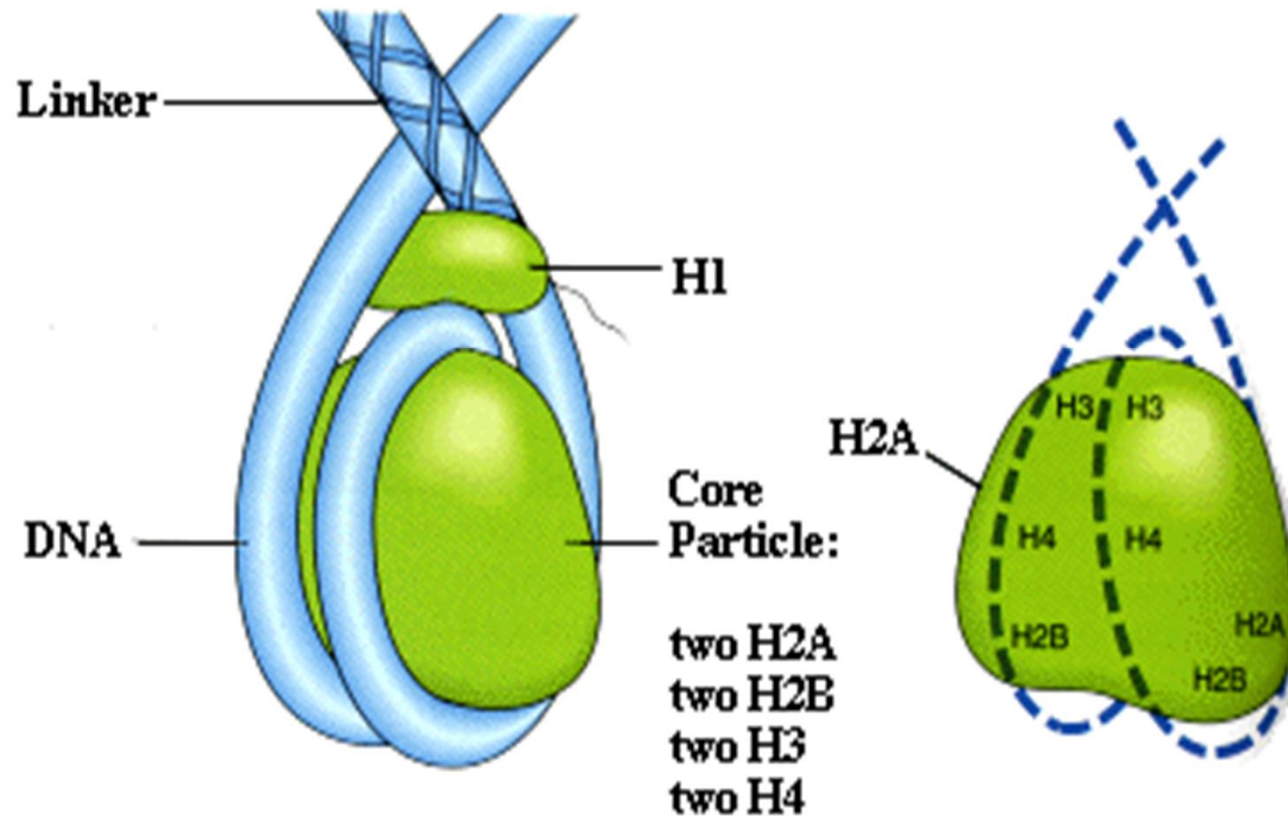
Istoni

Structure of Histone Proteins

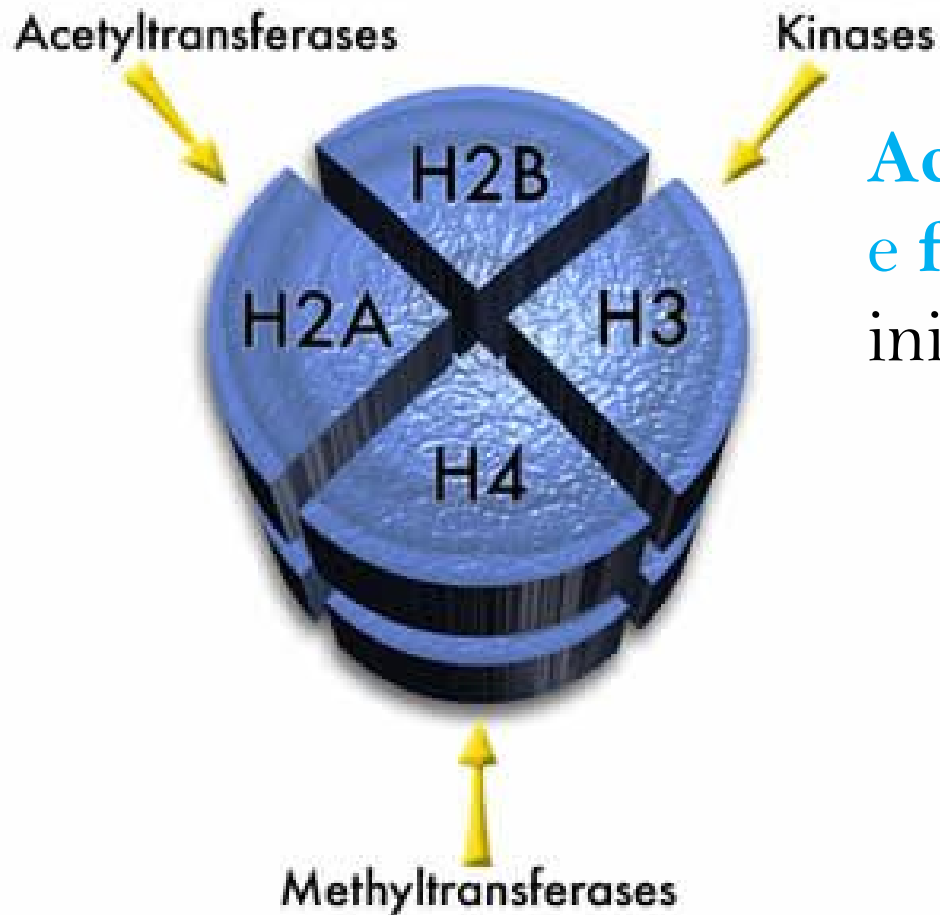


Le **5 principali classi** di istoni sono altamente conservate in natura.

Localizzazione degli istoni

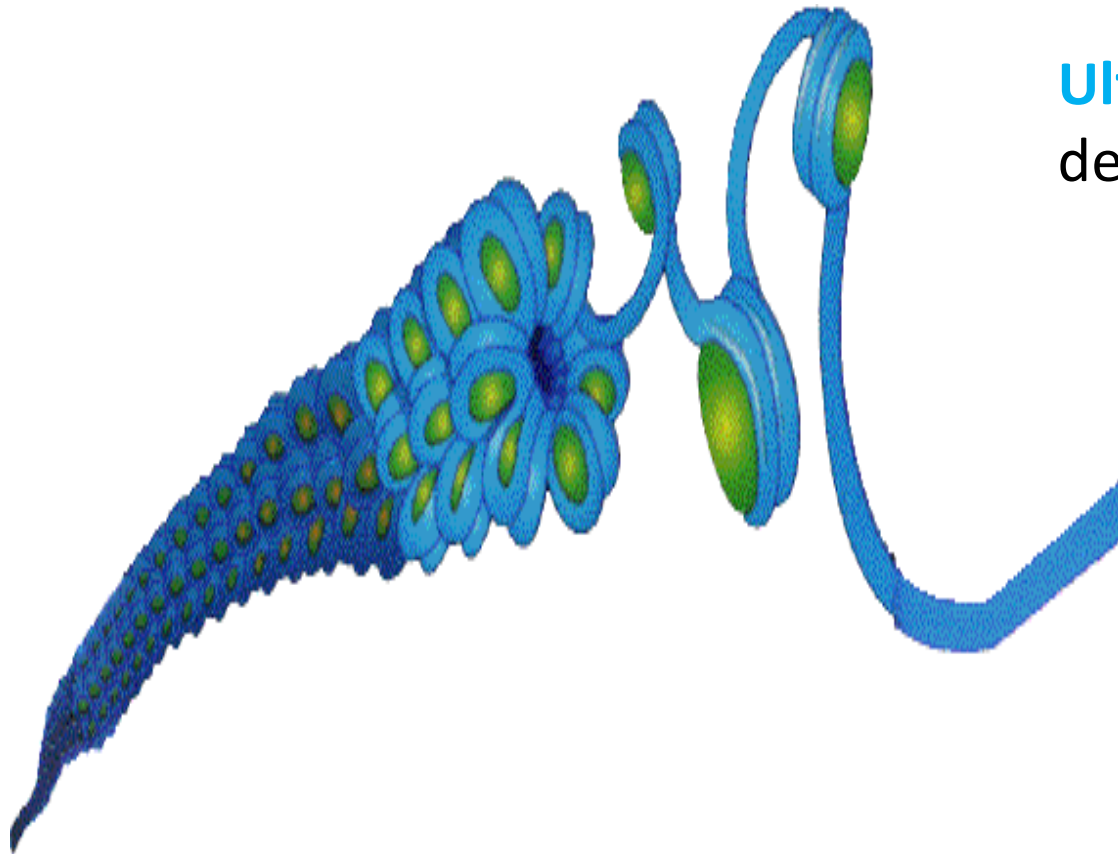


Funzione regolatrice degli istoni



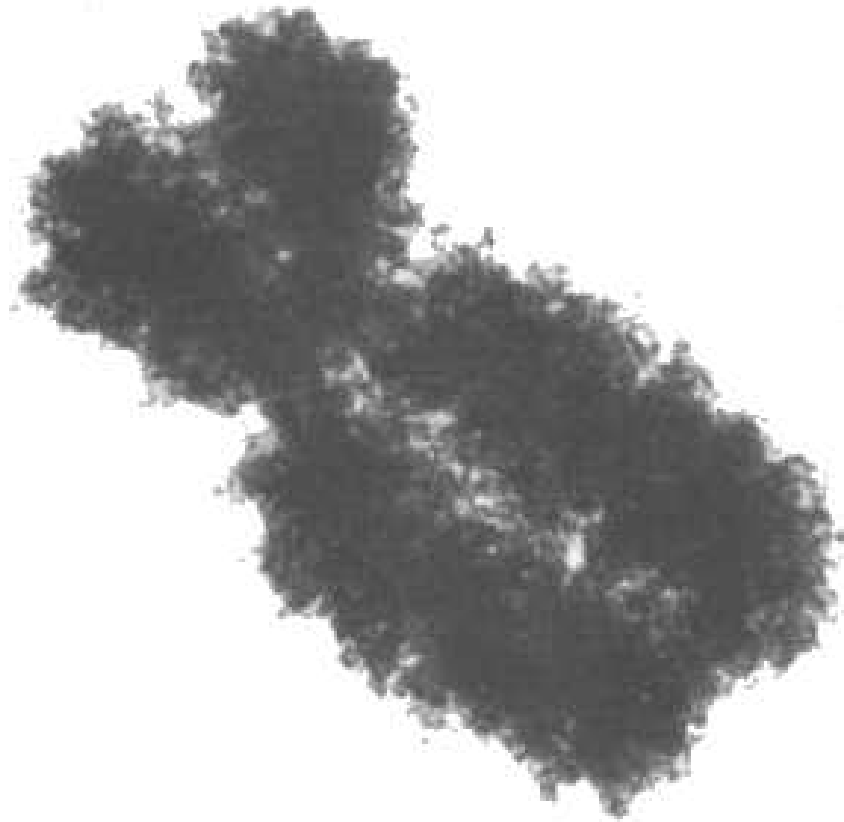
Acetilazione, metilazione e fosforilazione possono inibire la trascrizione

Solenioide



Ulteriore impacchettamento
della molecola del DNA

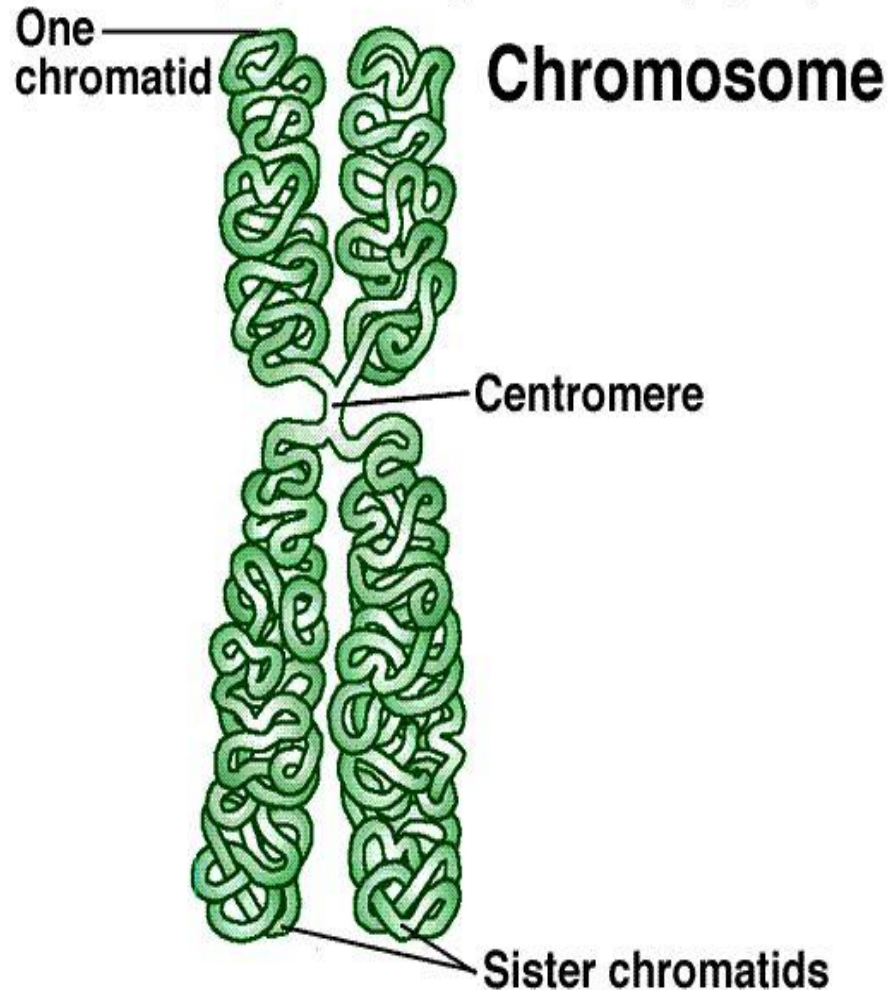
Cromosoma condensato



Durante la divisione cellulare i cromosomi sono **diecimila volte più corti**: gli istoni ed altre proteine sono responsabili di questo eccezionale impacchettamento

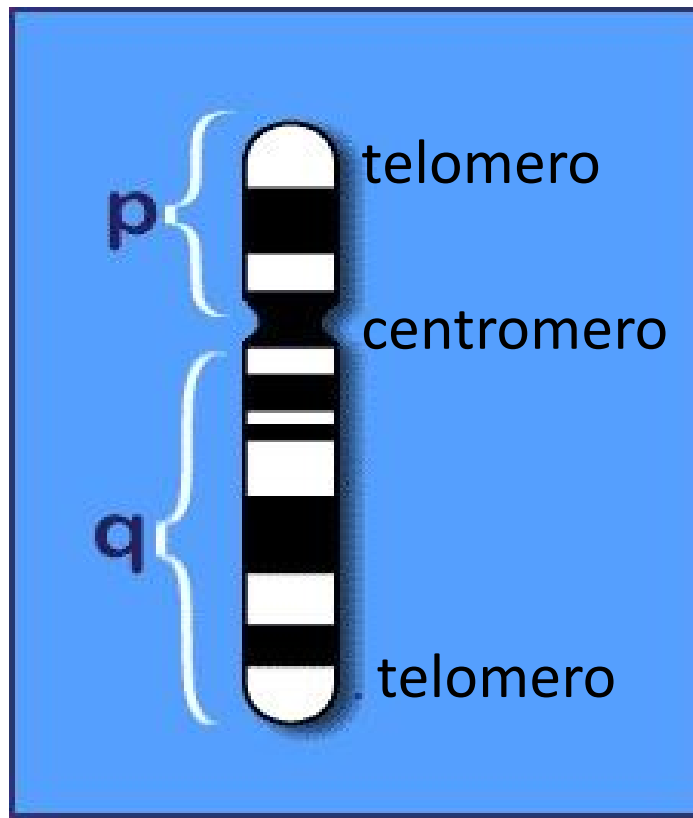
Cromosoma metafasico

Estelle Levitin and Karen McMahon, Botany Visual Resource Library © 1998 The McGraw-Hill Companies, Inc. All rights reserved.



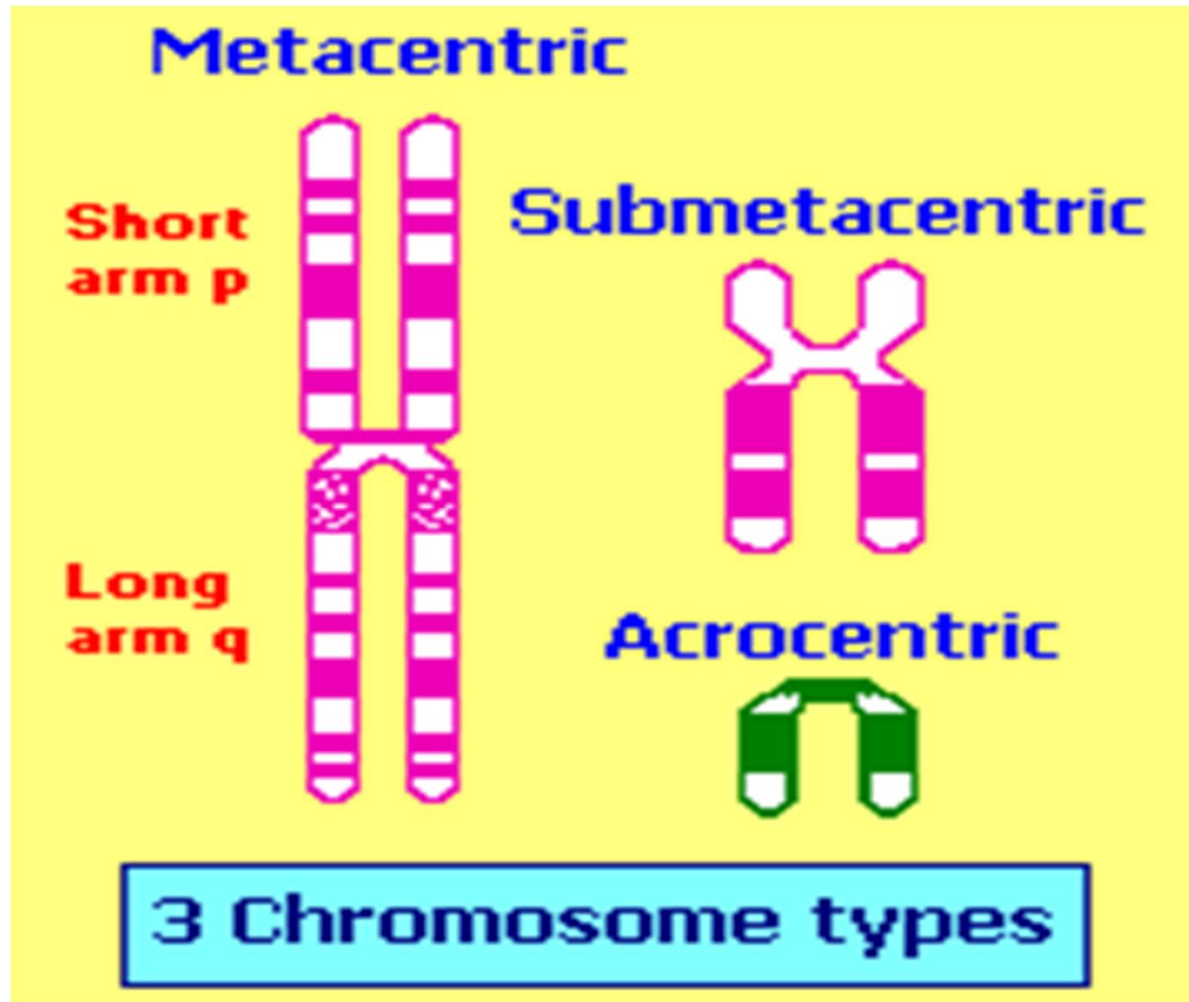
Cromosoma duplicato
costituito dai due
cromatidi fratelli

Parti di un cromosoma



- **centromero** (attacco delle fibre del fuso mitotico)
- **telomero** (blocca le estremità libere del DNA)
- p **braccio corto**
- q **braccio lungo**

Tipi di cromosomi umani



Classificazione dei cromosomi in base alla **posizione del centromero**

Esatto numero dei cromosomi



Le prime documentazioni scientifiche riguardanti lo studio dei cromosomi umani risalgono alla fine del 1800 ma fino al 1956 il numero di cromosomi che i ricercatori contavano era estremamente variabile, da 37 a 48.

Il corretto numero dei cromosomi (46) è stato quindi stabilito solo nel 1956

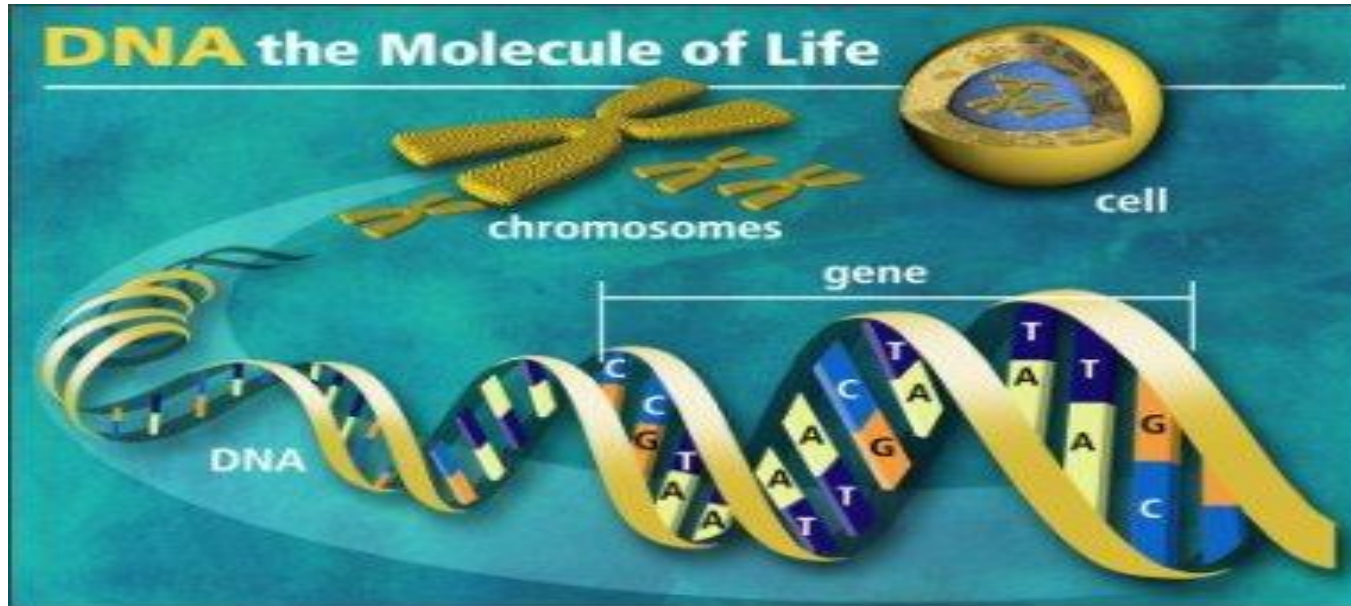
Scoperta del numero dei cromosomi umani



Joe Tin Tijo (1919-2001)



Gene

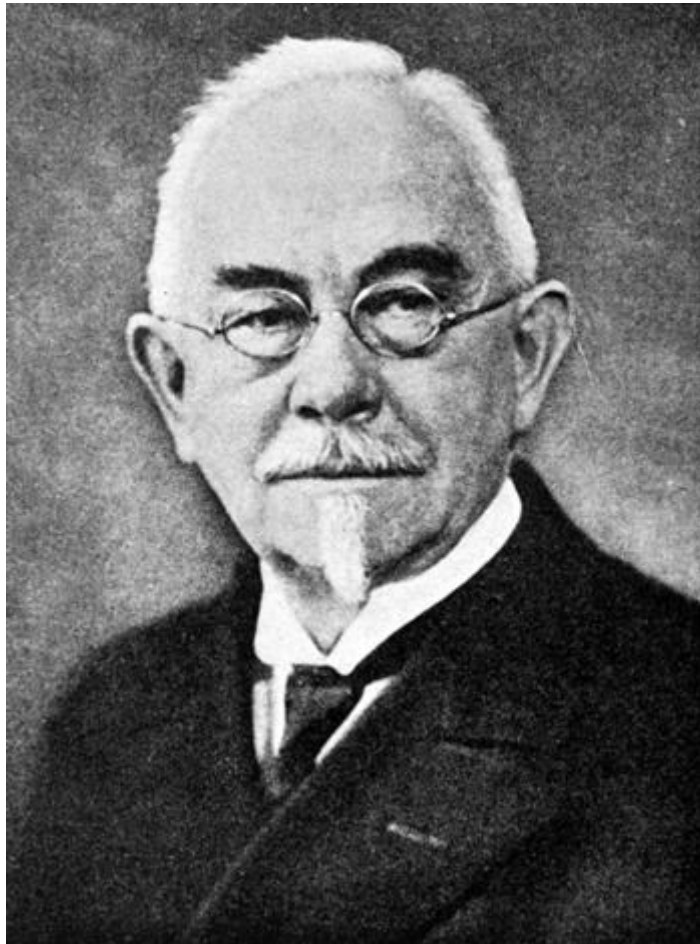


Ogni **gene** è un pezzo di DNA di lunghezza molto variabile che contiene l'informazione genetica per costruire una determinata **proteina**.

Sui cromosomi sono distribuiti circa **20mila geni** ai quali è affidata l'informazione ereditaria elementare. **Locus** è definita la posizione del gene sul cromosoma

Essi rappresentano solo il **10% circa di tutto il DNA** di una cellula; **il restante 90%** considerato fino a pochi anni fa “*DNA spazzatura*”, perché non sembrava avere alcuna funzione, ha in realtà un ruolo importantissimo nella **regolazione dell'espressione genica**

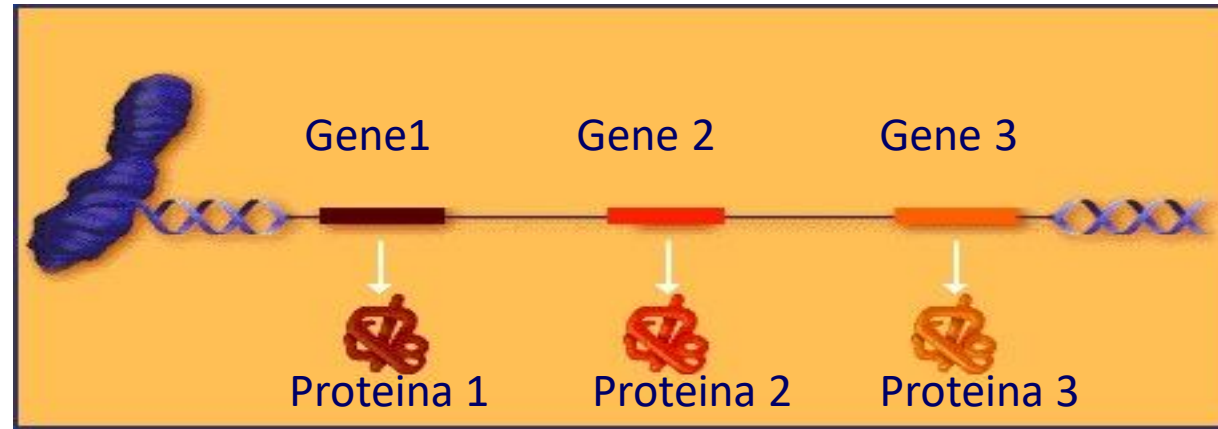
Wilhelm Ludvig Johanssen (1857-1927)



Ha coniato il termine **gene**.

Mutuato da *pangen* (singole unità fisiche) del naturalista Ugo de Vries, che aveva mutuato il termine da **pangenesi** di Charles Darwin.

I geni

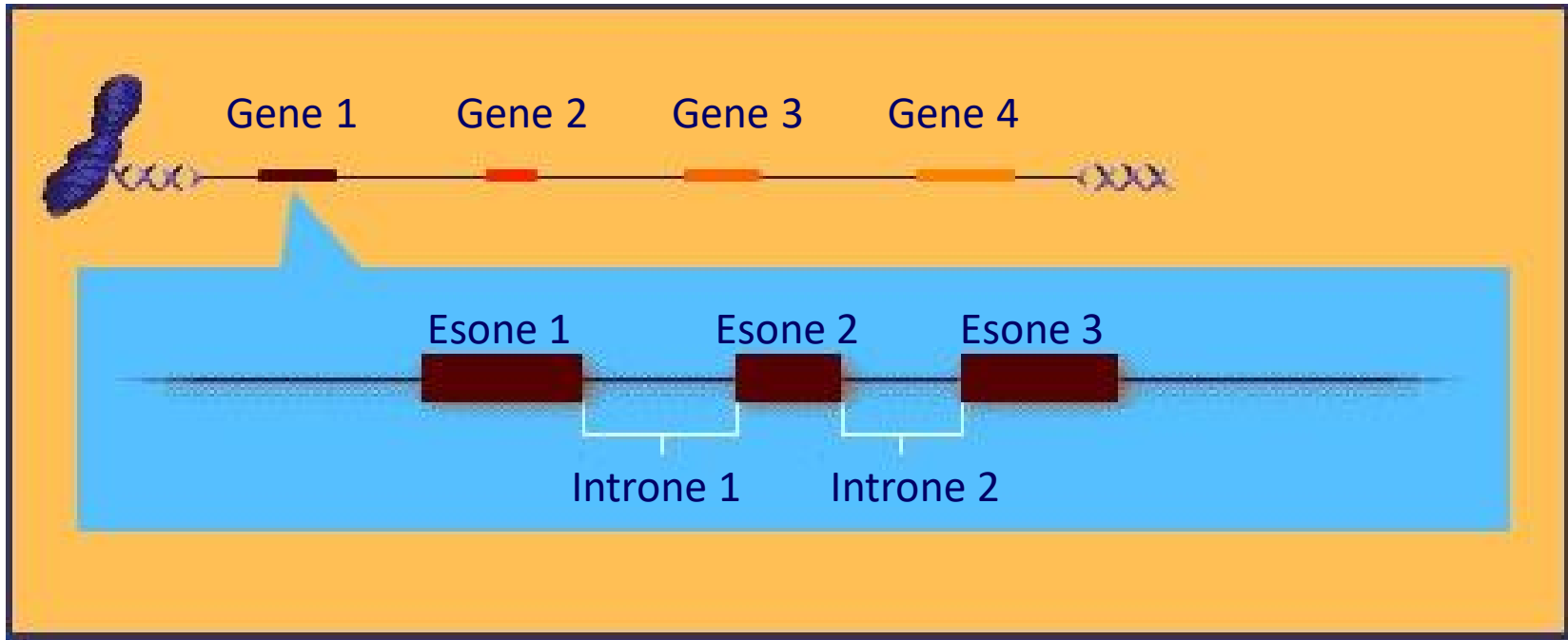


I Geni sono **sequenze di paia di basi** che codificano informazioni per polipeptidi.

Hanno una grandezza che va da meno di **100 paia di basi** fino a diversi **milioni di paia di basi**.

Il genoma di un individuo contiene **due copie di un gene** strutturale (una copia nelle cellule germinali), numerose copie dei geni dell'RNA ribosomiale (400) e degli istoni (30-40).

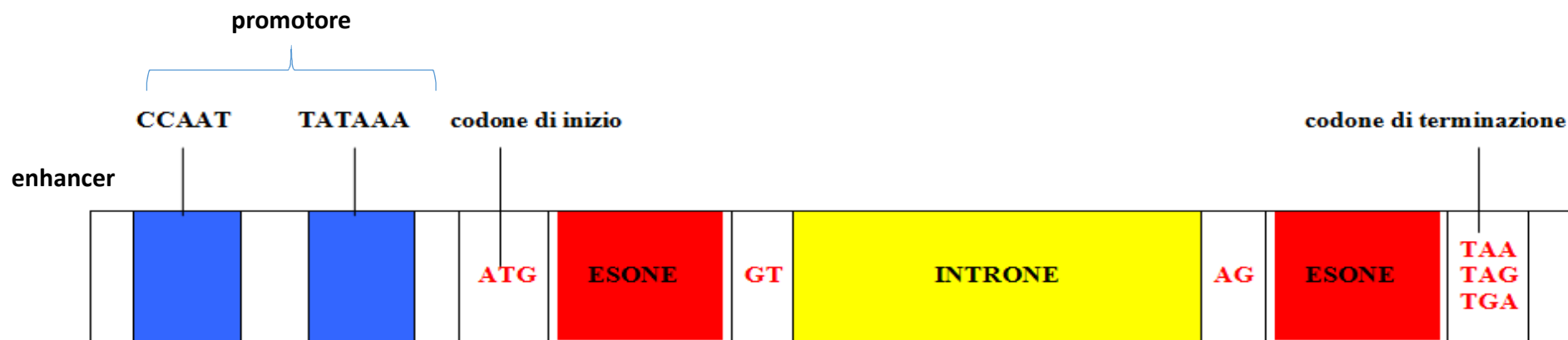
Struttura di un gene nucleare eucariotico



Esoni: sequenza codificante

Introni: sequenza non codificante tra due esoni

Struttura di un gene nucleare eucariotico



ESONI: segmenti di un gene rappresentati nell' mRNA maturo, costituiscono le parti funzionali del gene che verranno tradotte nella sequenza aminoacidica

INTRONI: sequenze di DNA non codificanti che si alternano agli esoni. Il numero e la dimensione degli introni varia enormemente nei differenti geni

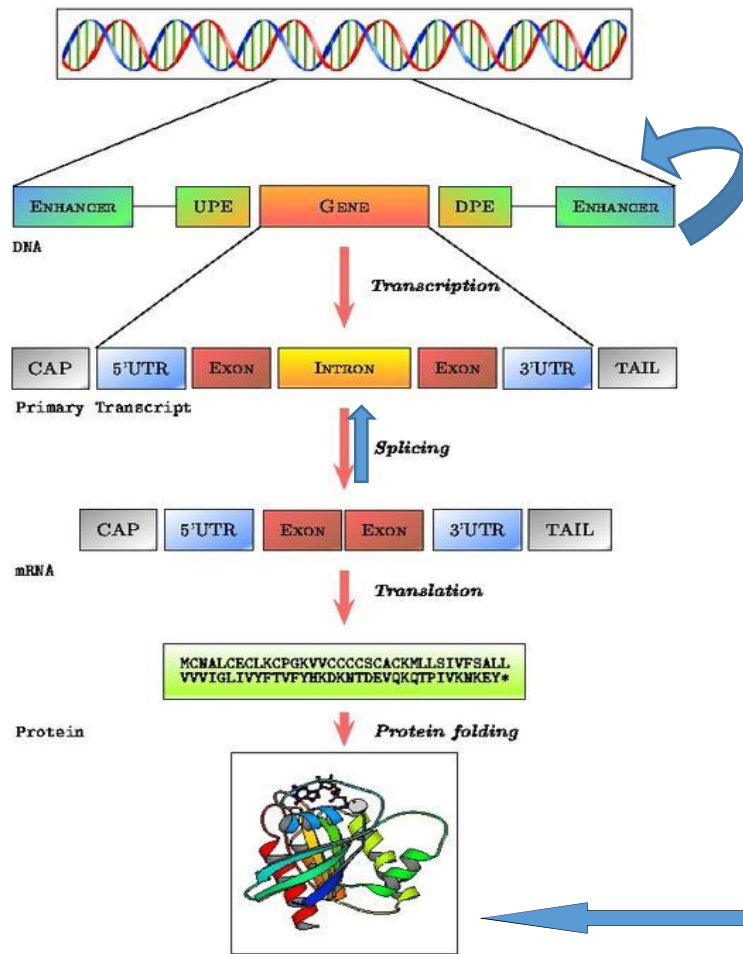
Giunzioni esone-introne: nella maggioranza dei casi ogni introne termina all'estremità 5' con la coppia di basi **GT** e alla estremità 3' con la coppia di basi **AG**

TATA-BOX: sequenze ricche in **AT** che si trovano a monte del sito d'inizio e che indirizzano l'RNA polimerasi verso il sito di inizio della trascrizione

CCAT-BOX: sequenze analoghe alle TATA, poste a monte del sito d'inizio e che agiscono come elementi regolatori della trascrizione

Il dogma centrale

The Central Dogma of Molecular Biology



Replicazione

Il DNA si duplica prima di ogni divisione cellulare

Retrotrascrizione

Processo non considerato nella prima formulazione del dogma. Avviene ad opera della trascrittasi inversa e sta alla base della moltiplicazione degli elementi trasponibili e nella genesi di alcuni pseudogeni.

Trascrizione

L'informazione genetica viene trasmessa dal DNA dei cromosomi all' mRNA

Splicing

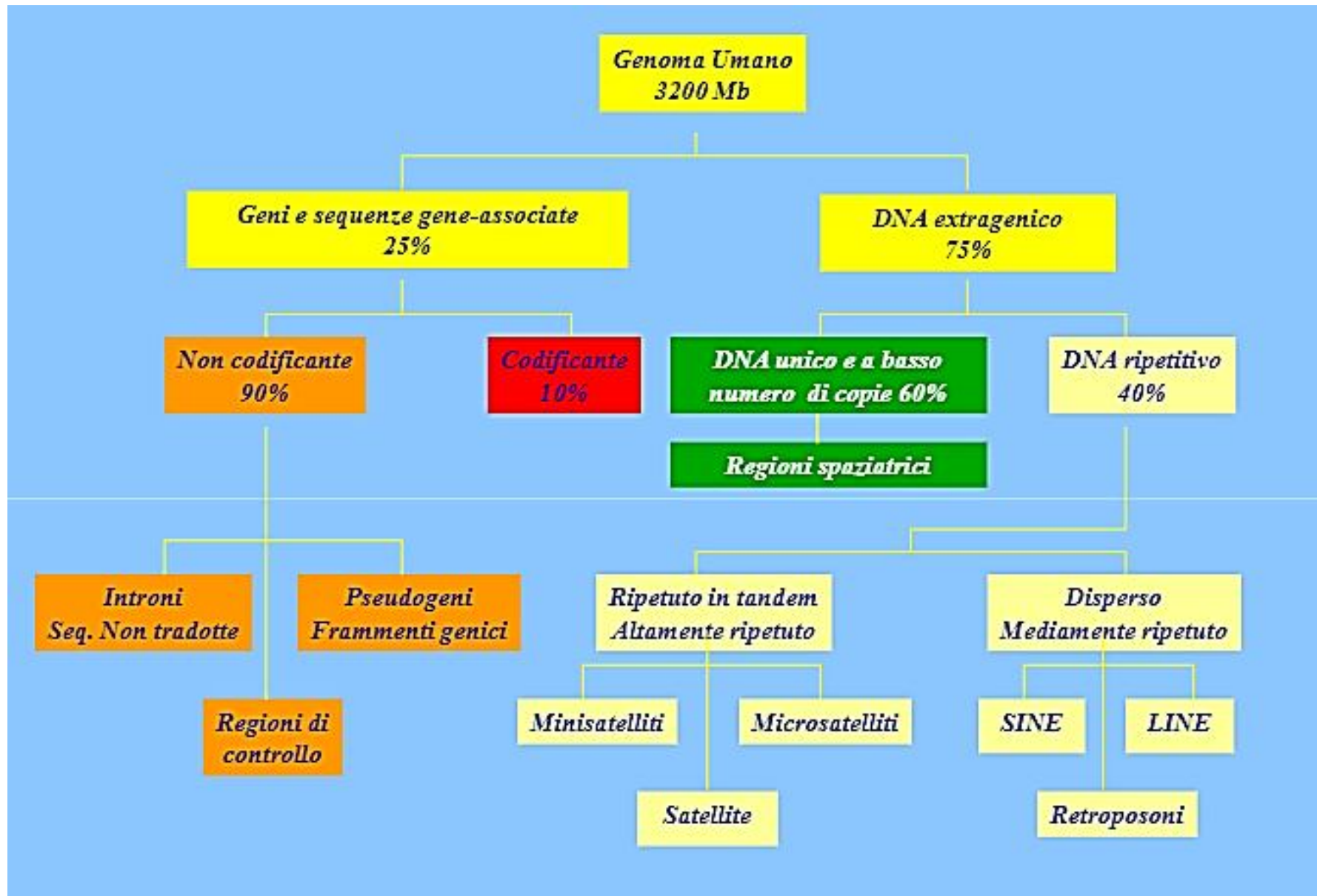
Rimozione degli introni e fusione degli esoni negli mRNA (gli mRNA possono essere diversi perché lo splicing può essere alternativo)

Traduzione

L'informazione genetica viene tradotta dall' mRNA in polipeptide

struttura tridimensionale della proteina

Struttura del Genoma Umano



Costituzione del genoma

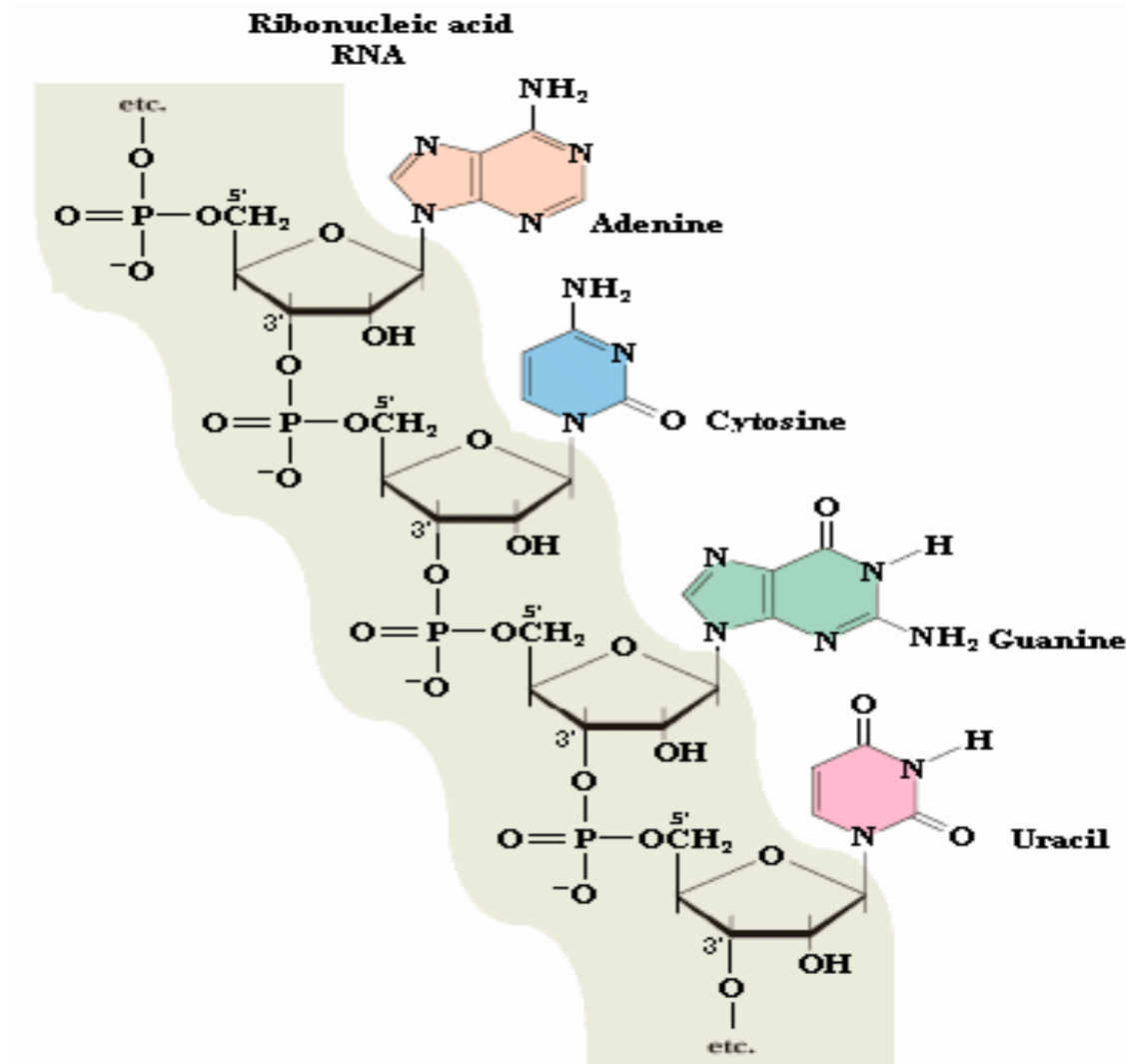
□ DNA codificante

- Geni strutturali
- Geni per RNA ribosomiali
- Geni per tRNA

□ DNA non codificante

- Sequenze regolatrici (promotori, sequenze enhancer)
- Pseudogeni (posseggono la struttura di un gene normale ma non producono mRNA o, se lo producono, vengono retrotrascritti; possono essere geni ancestrali che hanno accumulato mutazioni inattivanti che non consentono la sintesi di una proteina oppure privi di introni e che vengono retrotrascritti)
- Introni

RNA (acido ribonucleico)



Differenze con il DNA

- **ribosio** al posto del desossiribosio
- **uracile** al posto della timina
- **filamento unico**
- in alcuni casi si ripiega su se stesso formando tratti a doppio filamento (**forcine**)

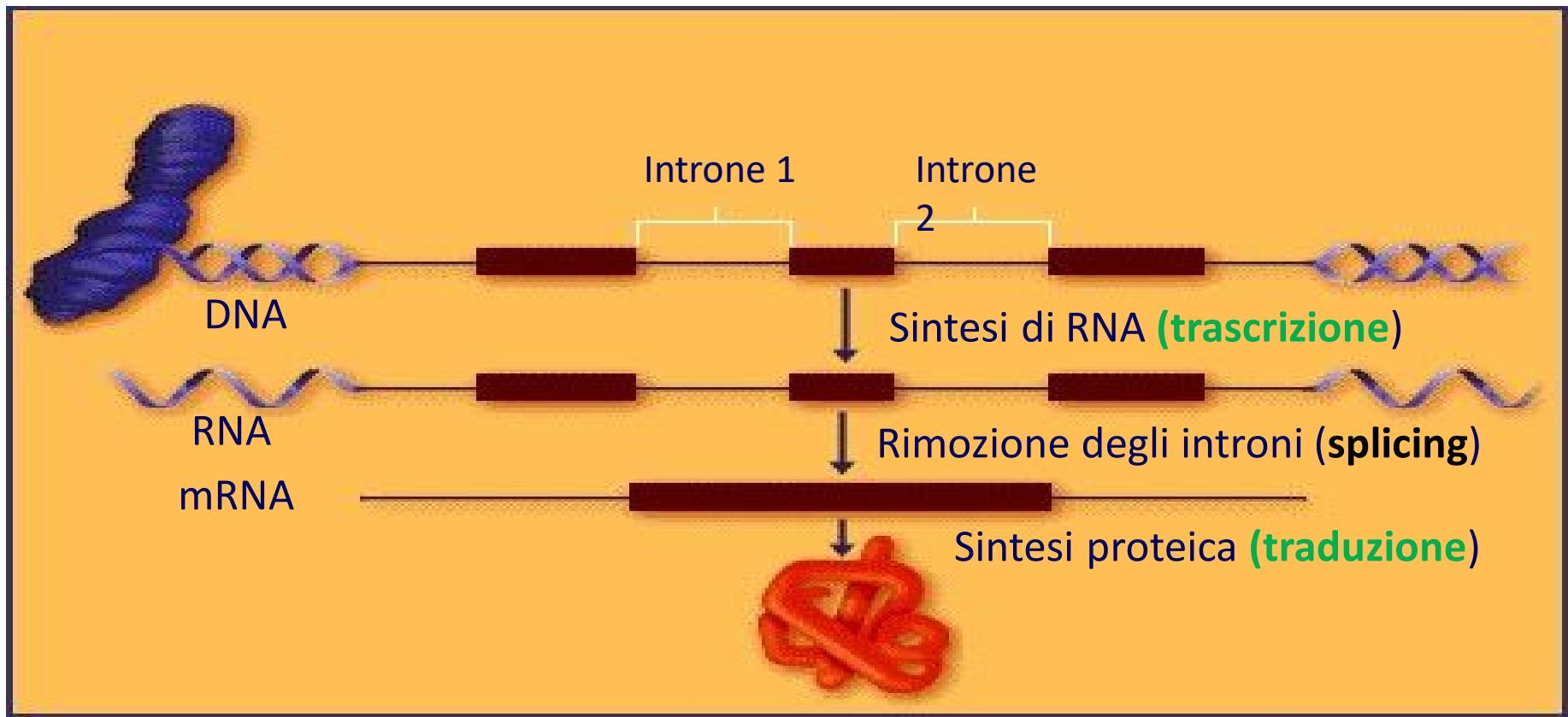
Classificazione RNA

- **pre-RNA** (molecole di RNA appena trascritte; necessitano di una serie di cambiamenti per essere forme mature)
- **snRNA** (piccoli RNA nucleari coinvolti nella maturazione dei pre-RNA)
- **mRNA** (trasporta l'informazione per la sintesi di una proteina)
- **rRNA** (costituiscono più della metà di un ribosoma)
- **tRNA** (trasportano l'amminoacido sull'mRNA)
- **ncRNA o microRNA o miRNA** (silenzianti genici)

Espressione genica

Processo in due stadi:

- Trascrizione
- Traduzione



Linguaggio del DNA: il codice genetico



Marshall Warren Nirenberg e Heinrich J. Matthaei (1961)

	U	C	A	G	
U	UUU } Phe	UCU } Ser	UAU } Tyr	UGU } Cys	U
	UUC } Leu	UCC } Ser	UAC } Stop	UGC } Stop	C
	UUA } Leu	UCA } Ser	UAA } Stop	UGA } Stop	A
	UUG } Leu	UCG } Ser	UAG } Stop	UGG } Trp	G
C	CUU } Leu	CCU } Pro	CAU } His	CGU } Arg	U
	CUC } Leu	CCC } Pro	CAC } Gln	CGC } Arg	C
	CUA } Leu	CCA } Pro	CAA } Gln	CGA } Arg	A
	CUG } Leu	CCG } Pro	CAG } Gln	CGG } Arg	G
A	AUU } Ile	ACU } Thr	AAU } Asn	AGU } Ser	U
	AUC } Ile	ACC } Thr	AAC } Lys	AGC } Arg	C
	AUA } Ile	ACA } Thr	AAA } Lys	AGA } Arg	A
	AUG } Met	ACG } Thr	AAG } Lys	AGG } Arg	G
G	GUU } Val	GCU } Ala	GAU } Asp	GGU } Gly	U
	GUC } Val	GCC } Ala	GAC } Glu	GGC } Gly	C
	GUA } Val	GCA } Ala	GAA } Glu	GGA } Gly	A
	GUG } Val	GCG } Ala	GAG } Glu	GGG } Gly	G

First position (5' end)

Third position (3' end)

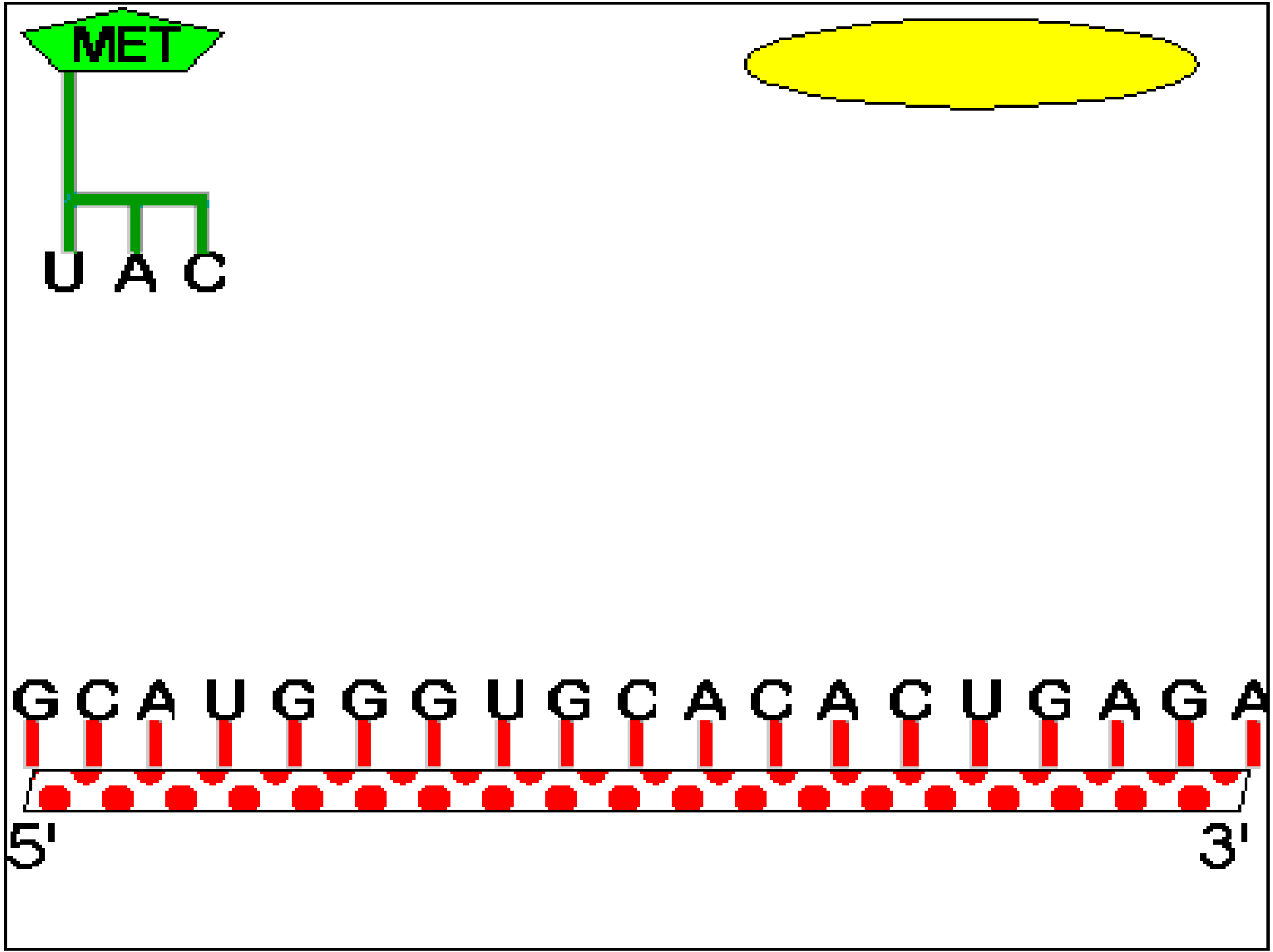
Amino acid names:

- Ala = alanine
- Arg = arginine
- Asn = asparagine
- Asp = aspartate
- Cys = cysteine
- Gln = glutamine
- Glu = glutamate
- Gly = glycine
- His = histidine
- Ile = Isoleucine
- Leu = leucine
- Lys = lysine
- Met = methionine
- Phe = phenylalanine
- Pro = proline
- Ser = serine
- Thr = threonine
- Trp = tryptophan
- Tyr = Tyrosine
- Val = valine

Caratteristiche del codice genetico

		SECOND BASE				
		U	C	A	G	
FIRST BASE	U	UUU } Phe	UCU } Ser	UAU } Tyr	UGU } Cys	THIRD BASE
		UUC } Phe	UCC } Ser	UAC } Tyr	UGC } Cys	
		UUA } Leu	UCA } Ser	UAA } Stop	UGA } Stop	
		UUG } Leu	UCG } Ser	UAG } Stop	UGG } Trp	
	C	CUU } Leu	CCU } Pro	CAU } His	CGU } Arg	
		CUC } Leu	CCC } Pro	CAC } His	CGC } Arg	
		CUA } Leu	CCA } Pro	CAA } Gln	CGA } Arg	
		CUG } Leu	CCG } Pro	CAG } Gln	CGG } Arg	
	A	AUU } Ile	ACU } Thr	AAU } Asn	AGU } Ser	
		AUC } Ile	ACC } Thr	AAC } Asn	AGC } Ser	
		AUA } Met	ACA } Thr	AAA } Lys	AGA } Arg	
		AUG } Met	ACG } Thr	AAG } Lys	AGG } Arg	
	G	GUU } Val	GCU } Ala	GAU } Asp	GGU } Gly	
		GUC } Val	GCC } Ala	GAC } Asp	GGC } Gly	
		GUA } Val	GCA } Ala	GAA } Glu	GGA } Gly	
		GUG } Val	GCG } Ala	GAG } Glu	GGG } Gly	

- è **universale** (presente in tutti gli organismi viventi)
- costituito da **codoni** (sequenza di 3 nucleotidi che codificano per un amminoacido); essendo 4 i nucleotidi, i possibili codoni sono $4^3=64$
- degenerato** (poiché gli amminoacidi sono 20 e i codoni 64, ne risulta che un amminoacido può essere codificato da più codoni)
- La **terza base** è meno specifica
- 61 codoni specificano amminoacidi, **3** non specificano amminoacidi ma segnalano la fine della catena proteica, sono detti “**non senso**” e sono: UAA, UAG e UGA
- non esiste “**punteggiatura**”
- codone d’inizio sempre **AUG**



Modificazioni post-traduzionali

- ❑ **Eliminazione** di alcuni amminoacidi come la metionina
- ❑ **Aggiunta o modificazione** di gruppi chimici (es. il gruppo eme dell'Hb)
- ❑ **Formazione di legami** tra alcuni amminoacidi
- ❑ **Formazione di legami tra proteine diverse** in modo da costituire un complesso macromolecolare