

## ITIS “G.C.FACCIO” VERCELLI – DIPARTIMENTO DI CHIMICA

-----  
**Prof. Paolo Rosso**

### Appunti di genetica

La genetica è lo studio dell'ereditarietà e di tutti i meccanismi legati alle caratteristiche dei processi genetici. La genetica classica ha avuto origine nel diciannovesimo secolo con gli studi dell'abate Mendel ; osservando le caratteristiche delle piante di pisello, l'abate si rese conto che i caratteri del vegetale non erano dettati dal caso, ma bensì da leggi rigorose che la natura aveva già scritto nel suo libro. Debbono però trascorrere circa cinquant'anni per avere studi più rigorosi dal punto di vista scientifico. Lo studio sui moscerini si rivelò fondamentale per comprendere come i caratteri erano scritti nella cellula dell'insetto, come ad esempio il colore degli occhi o la forma delle ali. I caratteri che si ripetevano con più frequenza furono definiti **normali**, le forme insolite **mutanti**. Lo studio si basava sull'incrocio sperimentale e sul calcolo aritmetico delle probabilità di frequenza. Questi studi si completarono nel ventesimo secolo e tutta questa fase prese il nome di genetica classica. La nuova genetica ha avuto inizio intorno agli anni cinquanta con la scoperta del DNA ad opera di Watson e Crick, ma bisogna attendere solamente intorno agli anni settanta per avere la tecnica nota come Dna ricombinante aprendo le porte all'ingegneria genetica. Per regolamentare questo delicato tema scientifico, nel 1974 il comitato etico che si era insediato, decise di limitare gli esperimenti sul Dna ricombinante e successivamente di avere inizio a frequenti incontri per controllare i lavori delicati perché potevano incidere sulle coscienze degli uomini. La prima conferenza viene fatta ad Asilomar nel 1975, la discussione verteva sui pericoli per l'intero pianeta dalle manipolazioni genetiche, come il creare nuove specie batteriche incontrollabili o le manipolazioni su cibi per alimentazione animale e umana, o l'impatto sull'ambiente.

### Caratteristiche delle cellule

Le cellule sono di due tipi una detta procariota con nucleo primitivo, l'altra detta eucariota con nucleo sviluppato. Le prime sono tipiche degli organismi semplici quali i batteri, la seconda è tipica degli organismi pluricellulare cioè i più evoluti . Le prime cellule sono dotate di un rivestimento esterno detta parete cellulare non presente nello secondo tipo dove invece c'è la membrana cellulare. Tra parete e membrana cellulare c'è una forte differenza dal punto di vista strutturale la prima ha una forte resistenza alla pressione osmotica, e agli agenti meccanici costituendo una vera e propria corazza rigida e allo stesso tempo porosa, ma capace di una risposta immunitaria. Osservata al microscopio elettronico appare dotata di circonvoluzioni e canali. La molecola di cui è formata viene detta *peptidoglicano* chiamato anche *mureina*. Esso è costituito catene di polisaccaridi con legame beta 1—4 tenute assieme da molecole aminoacidi che dipendono dal tipo di batterio. Infatti i **Gram-positivi** contengono poche sostanze legate alla molecola principale e hanno altre molecole legate quali gli *acidi tecnici*, esteri della glicerina con acido fosforico e gli ossidrili liberi della glicerina vengono legati dalla *alanina* , dal *N-acetil-D-glucosamina*, e dal glucosio alfa. I **Gram-negativi** sono ricchi di lipoproteine e lipopolisaccaridi. La differenza è evidente nella colorazione di Gram:

Soluzioni applicate	Gram +	Gram -
Violetto di genziana	Le cellule si colorano di violetto	Le cellule si colorano di violetto
Soluzione di iodio	All'interno delle cellule si forma un complesso VG-I. Le cellule rimangono violette.	Le cellule rimangono violette
Alcol etilico	Le pareti si disidratano il diametro Dei pori si contrae il complesso non Può uscire dalle cellule che rimangono No violette	I lipidi sono estratti dalle pareti cellulari La porosità aumenta ed il complesso VG-I è estratto dalla cellula.
Safranina	Le cellule non sono influenzate rimangono colorate di <b>violetto</b>	Le cellule assorbono questo colorante diventano <b>rosse</b> .

In questa tabella sono riassunte le principali caratteristiche delle cellule:

Gruppi	Cellula Procariota	Cellula Eucariota
Struttura del nucleo	Priva di parete nucleare	Presenta la parete nucleare
Ribosomi	Presenti, 70S	Presenti 70S e 80S
Mitocondri	Assenti	Presenti

Strutture del Golgi	Assenti	Presenti
Reticolo endoplasmatico	Assente	Presente

## Cromosomi

Il nome deriva dalla parola d'origine greca *chromo* che significa colore e *soma* che significa corpo. Queste strutture si colorano in fase di preparazione delle cellule. Tutte le specie animali possiedono lo stesso numero di cromosomi, l'uomo ne possiede 46, il mais 20, il moscerino della frutta ne possiede otto. I cromosomi sono raggruppati in coppie così l'uomo ne possiede 23. I due membri di una stessa coppia sono definiti omologhi. I cromosomi sono ben definiti e visibili quando la cellula si duplica. Non sono visibili in fase di stasi. La parte centrale del cromosoma si chiama *centromero*, le estremità si chiamano *telomeri*. Il processo di divisione del cromosoma viene detto **mitosi**. Le cellule che contengono i cromosomi omologhi sono dette **diploidi**. Le cellule che contengono un solo cromosoma sono dette **aploidi**. La *meiosi* è il processo che porta alla formazione delle cellule con cromosomi aploidi. Lo schema che porta alla ricombinazione cellulare durante la fecondazione è riassunta nella pagina posteriore. Ogni cellula maschile e femminile ricostruisce il proprio corredo da aploide a diploide. Il sesso è specificato dal cromosoma X e Y. Questi cromosomi sono così definiti per la loro forma. Analizzando la forma con l'aspetto e la colorazione dei cromosomi si possono stabilire le eventuali alterazioni. Ad esempio nella sindrome di Down vi sono tre coppie sul cromosoma 21, si parla di *trisomia del cromosoma 21*, nel linfoma di Burkitt vi è un riarrangiamento sui cromosomi 8 e 14.

## Cosa sono i geni

Solo nel 1910 è stato introdotto questo termine. I geni possono produrre diversi caratteri e le differenti versioni del gene sono chiamate *allele*, ad esempio il colore della buccia dei piselli, dei capelli. Mendel già sapeva che esistono due alleli per ogni carattere ereditario e che ciascun allele deriva da uno dei genitori. Al momento delle ricombinazioni

Due alleli possono essere identici e l'organismo si definirà omozigote, oppure diversi e quindi eterozigoti. Ad esempio se definiamo i due diversi alleli che determinano il colore dei semi verdi e giallo avremo le seguenti coppie:

Colore verde verde	Omozigote
Colore giallo giallo	Omozigote
Colore verde giallo	Eterozigote

La stessa considerazione si può fare per la superficie liscia o rugosa:

Superficie liscia liscia	Omozigote
Superficie rugosa rugosa	Omozigote
Superficie liscia rugosa	Eterozigote

I caratteri si trasmettono in maniera indipendente, così

Colore verde superficie liscia
Colore giallo superficie rugosa
Colore verde superficie rugosa
Colore giallo superficie liscia

Fu Morgan ad individuare gli alleli sui cromosomi, il cromosoma è formato da un filamento unico di DNA. I caratteri si scambiano attraverso porzioni di DNA che si scambiano tramite il crossing-over

## Relazione tra geni e proteine

Un gene specifica la sequenza di una proteina e sono le proteine che specificano le funzioni delle cellule ad esempio gli enzimi. Nel 1950 i ricercatori studiando un batterio E.coli fu possibile stabilire che ogni gene specifica una proteina, ma con la scoperta della struttura del DNA fu possibile definire in modo inequivocabile la relazione che esiste tra DNA e proteine. La struttura del DNA era legata alla capacità di riconoscere gli aminoacidi di sequenziali al fine di definire la proteina con senso compiuto. Il gene non era più un'entità astratta, ma una sequenza di nucleotidi ordinata e durante la

ricombinazione di DNA provenienti dai genitori si formano nuove combinazioni genetiche quindi nuovi caratteri e nuove proteine.

### **In natura i geni possono spostarsi**

La risposta è affermativa i geni possono spostarsi da una cellula all'altra. Basti pensare alla riproduzione dove i geni sono rimescolati originando nuovi caratteri. Studiando i batteri si può osservare come i geni possono trasferirsi:

#### **Trasformazione batterica**

S'intende l'alterazione del DNA batterico con l'assunzione di segmenti di DNA dal mezzo di coltura. Fu appunto con questo meccanismo che si riuscì a modificare il genoma di una cellula batterica, rendendo competente la cellula batterica verso prodotti o substrati sino allora incogniti. Il gene così trasmesso diventa parte integrante della cellula ed è trasmesso alle cellule figlie. La tecnica è valida per le cellule procariote ed eucariote.

#### **Coniugazione batterica**

Indica il trasferimento diretto di DNA da una cellula all'altra, tramite contatto con un ponte che si chiama *Pilo sessuale*; si parla quindi di passaggio di pezzi di cromosoma o addirittura di tutto il cromosoma. I geni trasferiti sono integralmente inseriti nel cromosoma il numero di geni trasferiti dipende dal tempo di contatto tra le cellule. L'inserimento dei geni può avvenire in più punti della molecola circolare di DNA.

#### **Traduzione batterica**

I fagi possono acquisire pezzi di DNA dei batteri. I fagi acquisiscono il DNA batterico frammentato in piccoli pezzi nel corso di un'infezione, questo frammento va a sostituire il segmento corrispondente nel DNA della cellula ricevente, che viene trasmesso alle progenie. Il pezzo di DNA virale, può rimanere in fase latente per molto tempo senza interferire sulla vita della cellula; altrimenti vi può essere un ciclo litico, dove il virus si avvale delle strutture della cellula per riprodursi e distruggere la cellula ospite. Il ciclo continua con una nuova infezione.

#### **I cloni questi sconosciuti**

Per clone s'intende una popolazione d'organismi geneticamente identici. Tutti gli individui derivano da un'unica cellula con un unico patrimonio genetico. Il clonaggio di un virus inizia con l'infezione di una cellula, che porta alla formazione di entità simili. E' possibile creare un numero infinito di cloni. Tecnicamente è possibile creare dei cloni facendo una semina di cellule in apposito terreno di coltura contenuto in piastre di Petri. Durante l'infezione è possibile distinguere le cellule clonate dai virus, perché si formano uno strato di cellule trasparenti su di uno strato di cellule batteriche non infettate, fatte crescere nella capsula. Questo è il segnale che si sono formati i cloni. In questo modo è possibile preparare un numero infinito di molecole di DNA provenienti da un unico virus e da un'unica cellula batterica, giacché i virus infettano un'unica cellula batterica.

#### **L'ingegneria genetica e la tecnica del DNA ricombinante**

Si utilizzano le stesse tecniche viste per la traduzione ovvero pezzi di DNA estraneo si possono inserire in DNA di cellule riceventi. I pezzi inseriti sono integrati e fanno parte del patrimonio della cellula acquisendo caratteri nuovi derivati da più cellule. Diversi sono però i problemi che emergono e cercheremo di affrontarli uno per volta:

1. Per traghettare gli inserti di DNA all'interno della cellula dove replicarsi.
2. Come procurarsi gli inserti di DNA che si vogliono studiare o clonare
3. Come procurarsi il DNA puro

Alla prima domanda si può rispondere che osservando la natura si è visto come pezzi di DNA denominati inserti potevano passare da una cellula all'altra semplicemente utilizzando dei vettori. Un primo vettore sono le particelle di virus che aggredendo un batterio possono prelevare dei geni e trasferirli su di un'altra cellula. Però con il passare del tempo si è visto che in natura vi sono altri vettori quali i plasmidi che sono polimeri di DNA circolare che si replicano in modo indipendente dal cromosoma cellulare e possono essere trasferite con il contatto fra due cellule. I primi risultati misero in evidenza che coniugazione batterica e plasmidi erano correlati. Per alcuni plasmidi l'efficienza del processo replicativo è così elevata che all'interno di una sola cellula possono formarsi migliaia di copie del DNA plasmidico. Oggi l'inserimento di un DNA inserito con un plasmide viene eseguito in laboratorio operando su soluzioni in provetta,

con un procedimento simile a quello con cui si inseriscono gli inserti ai vettori fagici. Oggi si inseriscono plasmidi con DNA ricombinante all'interno delle cellule batteriche. Ogni colonia assumerà un solo plasmide. La messa a punto di altri plasmidi ha portato alla scoperta di due tipi di vettori.

1. **I vettori trargetto** che sono costruiti in modo da replicarsi all'interno di due cellule differenti. Ad esempio il lievito ed E. coli, possono riprodursi all'interno delle cellule, dove nella cellula batterica si possono clonare, mentre all'interno della cellula non batterica possono esprimersi oppure replicarsi.
2. **I vettori di espressione** che consentono ad un gene clonato di trovare espressione vale a dire essere trascritto e tradotto. Ad esempio E. coli viene utilizzata per trovare espressione l'ormone della crescita, il luogo di inserimento è vicino al promotore per la beta galattosidasi.

Alla seconda domanda è possibile rispondere poiché intorno al 1950 in campo biochimico, furono scoperti enzimi denominati *bisturi molecolari*, un gran numero di molecole che sono in grado di agire sul DNA. Questi enzimi detti di restrizione sono in grado di tagliare il DNA in punti ben specifici, a loro volta proteggono il proprio DNA da certi danni, modificando le basi di nucleotidi del proprio corredo cromosomico, aggiungendo gruppi metile alle basi del DNA. Una volta protetto il gruppo, le endonucleasi non hanno alcun effetto. Una volta spezzato il DNA, i vari frammenti possono essere separati mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide o agar, sapendo che il DNA porta gruppi carichi negativamente, che migreranno verso il polo positivo. Quanto sono più piccoli i frammenti tanto maggiore sarà la velocità di migrazione. Dopo aver terminato il processo di migrazione, i frammenti sono colorati, così si evidenziano i frammenti sul gel sotto forma di bande. Poiché ogni nucleasi taglia il DNA a livello di diverse sequenze, utilizzando più enzimi si otterranno diversi frammenti.

Nella prossima tabella sono forniti un esempio d'enzimi ed i siti di taglio:

Bam HI	G GATCG CCTAG G
Eco RI	G AATTC CTTAA G
Hae III	GG CC CC GG
Hind III	A AGCTT TTCGA A
Hpa II	C CGG GGC C
Not I	GC GGCCGC CGCCGG CG
Pst I	CTGCA G G ACGTC

Per avere la sicurezza che un inserto sia stato assunto dal DNA plasmidico, questi piccoli pezzi di materiale genetico vengono inseriti nei geni che conferiscono resistenza agli antibiotici, si procede alla semina in terreni di coltura contenenti gli antibiotici che conferiscono resistenza. L'analisi della crescita mi darà la certezza che gli inserti si sono integrati. Alla terza ed ultima domanda è possibile rispondere con le tecniche di ultracentrifugazione, colorazione ed analisi strumentale del DNA, assorbe nel UV, in questo modo dove aver rotto le cellule con ultrasuoni o azione meccanica, si possono eseguire centrifugazioni a diverse velocità per purificare il preparato e successivamente operare un'ultracentrifugazione. Oppure si può operare un' elettroforesi per separare i frammenti di DNA.

### Come è possibile verificare se l'inserto è stato clonato

Vedere la *figura cinque* per essere certi se un inserto è stato introdotto, prendere la piastra dove sono cresciute le placche fagiche su di un tappeto di cellule, ricordo che sono aree trasparenti, si posa un disco di nitrocellulosa e si preme delicatamente, per prelevare un certo numero di cellule. Il disco ora contiene il DNA fagico dove si ipotizza la presenza del clone, il disco viene introdotto in una piastra di Petri e trattato alla temperatura di 90° C, in questo modo il DNA si svolgerà formando due eliche. A questo punto si aggiunge una sonda di DNA o RNA radioattivo per il fosforo 31 con la medesima sequenza del gene clonato, si lascia agire un venti minuti, quindi si rimuove la sonda che non si è legata mediante lavaggio con acqua sterilizzata. Si espone il disco all'azione dei raggi X, contro una pellicola sensibile ai raggi. Solamente il clone in cui è avvenuta l'associazione con la sonda, forma una macchia scura sulla pellicola. E' quindi possibile evidenziare il clone e la posizione di origine.

### Clonare il RNA è possibile

Clonare il RNA è possibile la tecnica prevede l'utilizzo di un enzima denominato *trascrittasi inversa*, dove una copia del RNA viene trasformata in DNA complementare. L'enzima DNA polimerasi sintetizza un secondo filamento. Introducendo il tutto in un opportuno vettore è possibile clonare il RNA.

### La tecnica del blotting del DNA

Vedere *la figura sei* per rendersi conto di questa tecnica e della sua efficacia. Essa serve per tipizzare inserti di DNA clonati e per definire l'impronta del DNA studiato. I frammenti di DNA ottenuti dal taglio con più enzimi, vengono separati mediante elettroforesi. Colorati con specifiche sostanze, al gel viene sovrapposto un foglio di nitrocellulosa e pressato per fare in modo che molecole di DNA inserti venga trasferito sul foglio. Il foglio viene mantenuto ad una temperatura di 90° C per dissociare la doppia elica, e fatto reagire con una sonda radioattiva di DNA o di RNA. Eliminate le sonde non legate mediante lavaggio, si sottopone il foglio all'analisi dei raggi X. Risulterà solamente la banda o le bande, dove si è legata la sonda radioattiva.

## **La struttura del gene**

I geni degli eucarioti, sono discontinui ovvero un gene che sintetizza una proteina non è necessariamente in un unico tratto, infatti vi sono delle sequenze interposte o **introni** non codificanti nessuna proteina, mentre vi sono delle sequenze codificanti dette **esoni**. Gli introni vengono rimossi quando l'RNA passa dal nucleo al citoplasma, se questo processo è difettoso vi possono essere errori gravi nella lettura della proteina. Alcuni introni possono però raggomitolarsi su se stessi autoscindersi senza bisogno di enzimi.

## **Amplificazione del DNA inserto senza clonazione**

La tecnica della PCR, consente di ottenere in poche ore, milioni di copie di una sequenza di DNA. Questo è possibile perché viene usata un enzima estratto dal bacillo turigensis, batterio che cresce nelle acque termali e quindi resistente ad alte temperature. Le varie fasi sono qui descritte:

1. I filamenti vengono svolti mediante riscaldamento
2. I filamenti vengono trattati con brevi inserti singoli di DNA presenti in eccesso
3. Si aggiunge l'enzima DNA polimerasi
4. I brevi inserti fungono da inneschi per l'enzima che dà inizio alla copia.
5. Al termine di questa fase ciascuno dei filamenti originali è stato copiato una volta.
6. Si ripete il processo nuovamente sino ad ottenere il numero di copie volute.

Vedere *la figura sette* per avere un quadro meglio definito. La stessa tecnica può essere utilizzata per copiare RNA inserti, è necessario trasformare il RNA in DNA e poi procedere con il modo appena visto.

## **Clonazione animale**

Era il 27 Febbraio 1977 che alcuni ricercatori di un istituto a Edimburgo, annunciarono al mondo di aver clonato un animale, con una tecnica stupefacente, i ricercatori hanno prelevato alcune cellule dalla ghiandola mammaria di una pecora adulta di razza Finn Dorset di circa sei anni che era all'ultimo trimestre di gravidanza. Le cellule in coltura sono state resa quiescenti mediante impoverimento del terreno colturale. A questo stadio è stata prelevata una cellula uovo non fertilizzata dall'ovaio di un'altra pecora e di tale cellula è stato asportato meccanicamente il nucleo, contenente il DNA, al suo posto è stata introdotto il nucleo della prima pecora; questo è stato possibile con un campo elettrico che rende permeabili la cellula e quindi c'è la possibilità di introdurre il nucleo. La nuova cellula è stata impiantata chirurgicamente nell'utero di una terza pecora, con il ciclo pronto ad accogliere e sviluppare la nuova cellula. Dopo 148 giorni è nata la pecora chiamata Dolly. Sono state utilizzate ben 277 cellule uovo con inseriti altrettanti nuclei, solo poche si sono sviluppate, ma solo una cellula ha sviluppato la pecora. Tale tecnica oggi viene sperimentata sull'uomo per la clonazione terapeutica, i nuclei contenenti il DNA, trapiantati in cellule con organismi cellulari nuovi e pieni di energia, possono produrre nuovi tessuti. Questa tecnica unita a quella del trasferimento dell'embrione, hanno consentito alla scienza di raggiungere livelli di conoscenza sempre più avanzati. Oggi grazie alla genetica è già possibile curare malattie che fino a qualche anno fa erano ritenute inguaribili. Con la possibilità di clonare tessuti umani si potranno sconfiggere altre malattie che al momento non hanno ancora una cura efficace.

## **Fusione cellulare**

La parete batterica può essere depolimerizzata in vari modi un esempio è quello di trattare con il lisozima. I batteri senza la membrana cellulare vengono detti nudi o protoplasmi, sono stabili in mezzi isotonici e possono essere indotti a fondersi in soluzioni di PEG contenenti ioni magnesio. La proprietà fondamentale dei protoplasmi fusi è che, per incubazione, possono rigenerare la parete batterica, originando un organismo normale, ma geneticamente alterato. La fusione cellulare consente di avere un'alterazione genica multipla dove le molecole di DNA si scambiano attraverso un meccanismo di crossing over pezzi di geni. Il risultato è di avere un DNA con geni provenienti da entrambi gli acidi. Spesso si nota che se l'incrocio avviene fra cellule animali da ceppi diversi, spesso si assiste alla revisione di una delle specie nel giro di poche generazioni. La fusione viene usata per ottenere incroci fra cellula animali o vegetali. Un esempio può essere quello che si ottiene incrociando cellule di mieloma murino con cellule produttrici di anticorpi, per ottenere ibridomi. Le cellule vengono clonate ed in coltura producono gli anticorpi monoclonali. Gli ibridomi vengono

iniettati nella pancia di topi compatibili, quest'ultimi sviluppano un tumore e le cellule secernano anticorpi monoclonali in quantità di 20 mg/ml. Oggi si sono sviluppati reattori per la produzione di queste sostanze per avere maggior quantità di prodotto ed un minor costo.

La selezione viene fatta seguendo questo protocollo scientifico: le cellule dei due ceppi, vengono trattati con enzimi litici, si creano i due tipi di protoplasti; le due cellule vengono mantenute in due terreni di coltura uno formato da un mezzo minimo per rilevare retro mutazioni, l'altro terreno è un mezzo completo per determinarne la vitalità. Se i dati hanno dato esito positivo, si mescolano almeno un milione di ibridomi di ogni ceppo in soluzione isotonica. Si tratta con PEG e ioni magnesio, si esegue un lavaggio per eliminare le cellule che non hanno costruito la membrana in mezzo ipertonico. Si passa ad una revisione delle cellule formate impiantandole in terreno minimo di coltura ed un terreno completo, in questo modo si possono eliminare gli eventuali organismi che hanno subito una mutazione.

## **Tecnica del trasferimento nucleare**

La tecnica del trasferimento nucleare consiste nel prendere una cellula di un individuo che non sia in fase di duplicazione, togliere il nucleo utilizzando tecniche conosciute ed inserirlo in un protocollo, ed inserire il nucleo in un'altra cellula che ne sia stata a sua volta privata del proprio nucleo, normalmente si usa una cellula uovo non fecondata, in questo caso il materiale citoplasmatico è intatto e quindi totipotente, si può duplicare con strutture intatte perché ancora giovani, il nuovo nucleo contiene le informazioni genetiche della cellula di origine in questo caso le cellule che si originano per duplicazione, hanno le stesse caratteristiche della cellula madre. In questo modo si ottengono tessuti identici al donatore di origine; le cellule che si originano sono cellule clonate. Questa tecnica viene utilizzata per ottenere tessuti da donatori con patologie varie è possibile coltivare tessuti che possono essere trapiantati al posto di tessuti danneggiati. Nello stesso modo si ottengono mono strati di cellule. Questa clonazione può in futuro risolvere i problemi che in passato neanche si poteva ipotizzare. Diverso è il caso della pecora clonata, dove è stata creato un nuovo animale. Questa tecnica permette di ottenere solamente parte di tessuti, in futuro si potranno anche avere organi da trapiantare senza problemi di compatibilità o di rigetto e scusate se è poco.