

Comprende versione

ebook



Genetica

Giorgio **Binelli**
Daniela **Ghisotti**

Serena **Aceto**
Francesco **Acquati**
Beatrice **Bodega**
Silvana **Dolfini**
Renato **Fani**
Massimo **Galbiati**
Luca **Gianfranceschi**
Federica **Marini**
Silvia **Nicolis**
Sergio **Ottolenghi**
Massimiliano **Pagani**
Alberto **Pallavicini**
Annamaria **Poma**
Antonella **Russo**
Giuseppe **Saccone**
Salvatore **Saccone**



Genetica

Giorgio Binelli
Daniela Ghisotti



Giorgio Binelli e Daniela Ghisotti

GENETICA

Copyright © 2018 EdiSES S.r.l. – Napoli

9 8 7 6 5 4 3 2 1 0

2022 2021 2020 2019 2018

Le cifre sulla destra indicano il numero e l'anno dell'ultima ristampa effettuata

A norma di legge è vietata la riproduzione, anche parziale, del presente volume o di parte di esso con qualsiasi mezzo.

L'Editore

L'Editore ha effettuato quanto in suo potere per richiedere il permesso di riproduzione del materiale di cui non è titolare del copyright e resta comunque a disposizione di tutti gli eventuali aventi diritto.

Fotocomposizione:

ProMediaStudio di Antonella Leano – Napoli

Stampato presso

Petruzzi S.r.l. – Via Venturelli, 7/B – 06012 Città di Castello (PG)

per conto della

EdiSES S.r.l. – Piazza Dante, 89 – Napoli – Tel. 0817441706/07 Fax 0817441705

www.edises.it **info@edises.it**

ISBN 978 88 7959 968 9

[AUTORI]

Serena Aceto

Università degli Studi di Napoli "Federico II"

Francesco Acquati

Università degli Studi dell'Insubria

Giorgio Binelli

Università degli Studi dell'Insubria

Beatrice Bodega

Istituto Nazionale di Genetica Molecolare
"Romeo ed Enrica Invernizzi"

Silvana Dolfini

Università degli Studi di Milano

Renato Fani

Università degli Studi di Firenze

Massimo Galbiati

Università degli Studi di Milano

Daniela Ghisotti

Università degli Studi di Milano

Luca Gianfranceschi

Università degli Studi di Milano

Federica Marini

Università degli Studi di Milano

Silvia Nicolis

Università degli Studi di Milano-Bicocca

Sergio Ottolenghi

Università degli Studi di Milano-Bicocca

Massimiliano Pagani

Università degli Studi di Milano

Alberto Pallavicini

Università degli Studi di Trieste

Annamaria Poma

Università degli Studi dell'Aquila

Antonella Russo

Università degli Studi di Padova

Giuseppe Saccone

Università degli Studi di Napoli "Federico II"

Salvatore Saccone

Università degli Studi di Catania

[COORDINATORI]

Giorgio Binelli

Università degli Studi dell'Insubria

Daniela Ghisotti

Università degli Studi di Milano

[PREFERENZE]

Quando negli anni 1980 mi veniva chiesto che lavoro facessi e io rispondevo «il Genetista», mi trovavo spesso a dover dare qualche ulteriore indicazione relativa alla parola usata. Oggi il problema non si pone più. La maggior parte delle persone conosce la parola Genetica, così come DNA, termini che sono ormai largamente usati anche dai profani. È usuale sentir dire «questa caratteristica fa parte del suo DNA» o altre espressioni simili. Tutto ciò deriva dagli evidenti cambiamenti che la Genetica ha apportato al mondo moderno. Quindi, non abbiamo più bisogno di chiarire di *cosa* si occupano i genetisti, ma piuttosto di spiegare *come* se ne occupano e *quale contributo* la Genetica abbia dato e dia quotidianamente alla nostra vita.

Questo è lo scopo principale di questo libro, che tratta i fondamenti della Genetica a partire dagli aspetti classici fino ai più moderni approcci molecolari. Il testo vuole essere un approccio di base alla Genetica come viene insegnata nel triennio dei corsi di laurea di Biologia, Biotecnologie e Scienze Naturali nelle Università italiane, senza dimenticare di rispondere alle curiosità degli studenti su argomenti più specialistici presenti sia nel testo cartaceo sia nei box e nei video nella versione *e-book* associata al libro.

Al momento di decidere come impostare un libro di Genetica, si sono presentate due possibilità: impostare il libro in modo “storico”, partendo cioè dalle prime scoperte e raccontando lo svolgersi degli avvenimenti in modo cronologico, oppure partire da quanto oggi sappiamo sui geni e sul loro funzionamento e spiegare “linearmente” l’azione dei geni nella cellula e nell’organismo. La nostra scelta è caduta sul primo approccio, perché riteniamo che per uno studente possa essere affascinante seguire passo dopo passo il succedersi delle diverse scoperte, percorrendo tutte le tappe che hanno portato a svelare struttura e funzione dell’informazione genetica e come questa determini il comportamento delle cellule e degli organismi. Del resto, tutta la prima parte della Genetica, la cosiddetta Genetica classica, non aveva e non ha bisogno di nessuna nozione molecolare per essere compresa. Ci rendiamo pienamente conto, tuttavia, che è un po’ come giocare a carte scoperte (o sapendo già che il colpevole è il DNA...). Infatti, al giorno d’oggi, la maggior parte degli studenti sa che i geni sono composti di DNA, che questi stanno sui cromosomi e sono costituiti da una sequenza di basi nucleotidiche, che hanno un preciso significato in termini di aminoacidi in una proteina e che ogni individuo possiede due copie di un gene, ciascuna ereditata da un genitore. Nell’affrontare i diversi aspetti della Genetica classica, è stato fatto implicito riferimento a queste nozioni già note. Tuttavia, nulla vieta che il docente possa seguire il percorso didattico che ritiene più appropriato, grazie anche alla particolare veste editoriale di questo volume, con la possibilità di creare per via elettronica nuove combinazioni di argomenti.

Infatti, una scommessa è legata alla nuova veste di questo libro, che, oltre al formato cartaceo, presenta anche il formato *e-book*, cioè il formato elettronico. Questa scelta editoriale, se da un lato non abbandona gli amanti del cartaceo, dall’altro va incontro ai desideri della nuova generazione, sempre più legata all’uso di *tablet* o altri supporti elettronici per lo studio. Inoltre, i docenti possono “creare” un loro libro personalizzato, contattando l’editore e indicando quali parti del testo debbano essere incluse e quali “saltate” o spostate nell’ordine in modo da personalizzare il testo per il proprio corso. Ciò rende il testo duttile e facilmente adattabile alle diverse esigenze della didattica in Italia.

Il contributo al volume di molti genetisti esperti nei diversi aspetti della materia costituisce un ulteriore punto di merito al volume. Ci auguriamo, quindi, che questo nuovo testo incontri il gradimento dei docenti e degli studenti italiani, al netto dei numerosi errori che appariranno, nonostante i nostri sforzi, in questa prima edizione, e che vi invitiamo a segnalare.

Giorgio Binelli
Daniela Ghisotti

MATERIALE DI SUPPORTO PER I DOCENTI

I docenti che utilizzano il testo a scopo didattico possono scaricare dal sito **www.edises.it**, previa registrazione all'area docenti, le immagini del libro in formato PowerPoint.

[INDICE GENERALE]

Autori	III
Prefazione	V
Capitolo [1] Genetica: passato, presente e futuro	1
<i>Giorgio Binelli e Daniela Ghisotti</i>	
[1.1] Cenni storici	2
[1.1.1] Generazione spontanea e continuità della vita	2
[1.1.2] La riproduzione sessuale richiede l'unione di gameti materni e paterni	3
[1.1.3] Preformismo ed epigenesi	3
[1.2] Pietre miliari della Genetica	5
[1.2.1] Rivoluzione mendeliana	5
[1.2.2] I cromosomi sono le strutture cellulari che portano i caratteri ereditari	6
[1.2.3] Funzione dei geni	6
[1.2.4] Neo-darwinismo	6
[1.2.5] Genetica molecolare e sviluppo delle biotecnologie	7
[1.2.6] Importanza della Genetica nella vita e nella scienza	7
Capitolo [2] Riproduzione cellulare e cromosomi	11
<i>Silvana Dolfini</i>	
[2.1] Cellule eucariotiche e cromosomi	13
[2.1.1] Cenni sulla struttura delle cellule eucariotiche	13
[2.1.2] Cellule animali e cellule vegetali	13
[2.1.3] Cromatina e cromosomi	13
[2.1.4] Ciclo cellulare delle cellule eucariotiche	13
[2.2] Trasmissione dei cromosomi	17
[2.2.1] Mitosi	17
[2.2.2] Riproduzione sessuale	20
[2.2.3] Meiosi	20
[2.2.4] Confronto tra mitosi e meiosi	24
[2.2.5] Ciclo vitale degli eucarioti	24
[2.2.6] Significato e conseguenze genetiche della meiosi	26
Problemi svolti	29
Capitolo [3] Mendel e l'origine della Genetica	31
<i>Giuseppe Saccone</i>	
[3.1] Gli esperimenti di Mendel	32
[3.1.1] La selezione di 14 varietà di piante di pisello: 7 caratteristiche con due forme alternative	32

[VIII] Indice generale

[3.1.2]	La selezione di linee pure o parentali; le generazioni F_1 e F_2	33
[3.1.3]	Incroci reciproci	36
[3.1.4]	Incroci di piante della F_1 e identificazione del principio della segregazione	36
[3.1.5]	Reincrocio	40
[3.1.6]	L'assortimento indipendente di coppie di fattori ereditari	41
[3.2]	Incrocio con tre o più caratteri	41
[3.3]	Test del χ^2	45
	Problemi svolti	49

Capitolo [4] Estensione dell'analisi mendeliana **51**

Serena Aceto

[4.1]	Dominanza incompleta	52
[4.1.1]	Colore del fiore in <i>Antirrhinum majus</i>	52
[4.2]	Codominanza	53
[4.2.1]	Gruppi sanguigni: il sistema MN	53
[4.3]	Serie alleliche	54
[4.3.1]	Gruppi sanguigni: il sistema ABO	56
[4.3.2]	Sistema Rhesus (Rh) e incompatibilità materno-fetale	58
[4.4]	Alleli letali	60
[4.5]	Caratteri ereditari nell'uomo	61
[4.5.1]	Costruzione e analisi degli alberi genealogici	62
	Problemi svolti	68

Capitolo [5] Basi cromosomiche dell'eredità **71**

Luca Gianfranceschi

[5.1]	Numero cromosomico	72
[5.2]	Teoria cromosomica dell'ereditarietà	73
[5.3]	Determinazione del sesso	76
[5.3.1]	Determinazione del sesso nell'uomo e nei mammiferi	76
[5.3.2]	Determinazione del sesso in <i>Drosophila</i>	80
[5.3.3]	Altri sistemi di determinazione del sesso	82
[5.4]	Eredità legata al sesso	83
[5.4.1]	Caratteri legati al sesso	83
[5.4.2]	Caratteri influenzati dal sesso	84
[5.4.3]	Estensione dell'analisi degli alberi genealogici ai geni legati al sesso	85
[5.4.4]	Identificazione di caratteri legati al sesso	87
[5.4.5]	Compensazione del dosaggio dei geni legati al sesso	88
	Problemi svolti	91

Capitolo [6] Concatenazione **93**

Luca Gianfranceschi

[6.1]	Segregazione non indipendente dei geni	94
-------	---	-----------

[6.2] Frequenza di ricombinazione	97
[6.3] Mappe genetiche	99
[6.3.1] Frequenza di ricombinazione	99
[6.3.2] La prima mappa genetica costruita da Sturtevant	99
[6.3.3] Come si costruisce una mappa genetica	100
[6.3.4] Il test del χ^2 per verificare la presenza di concatenazione	101
[6.3.5] Correlazione tra mappa genetica e mappa fisica	102
[6.4] Meiosi e geni concatenati	103
[6.4.1] Basi fisiche della ricombinazione e legame con il <i>crossing-over</i>	103
[6.4.2] Dimostrazione che il <i>crossing-over</i> avviene dopo la duplicazione dei cromosomi	103
[6.4.3] Fase della meiosi in cui avviene il <i>crossing-over</i>	104
[6.5] Reincrocio a tre punti	104
[6.5.1] Deduzione dell'ordine dei geni e calcolo delle distanze genetiche	104
[6.5.2] Come stabilire l'ordine dei geni analizzando i dati del reincrocio a tre punti	106
[6.5.3] Interferenza e coefficiente di coincidenza	106
[6.6] <i>Crossing-over</i> mitotico	107
Problemi svolti	111

Capitolo [7] Funzione del gene 113

Annamaria Poma

[7.1] Garrod e le prime osservazioni sugli "errori congeniti del metabolismo"	114
[7.2] Beadle e Tatum e gli esperimenti con <i>Neurospora</i>	115
[7.3] Mutazioni con lo stesso fenotipo che colpiscono geni diversi	120
[7.3.1] Controllo genetico di una catena metabolica	120
[7.4] Interazione tra geni	122
[7.4.1] Interazione tra più geni	125
[7.4.2] Geni modificatori	127
[7.5] Complementazione	127
[7.6] Pleiotropia	127
[7.7] Effetto dell'ambiente	129
[7.8] Penetranza ed espressività	129
[7.9] Fenocopie	131
Problemi svolti	132

Capitolo [8] Genetica dei batteri e dei fagi 135

Daniela Ghisotti

[8.1] Batteri in laboratorio	136
[8.1.1] Crescita dei batteri	136
[8.1.2] Titolazione dei batteri	137
[8.2] Informazione genetica e struttura del genoma nei batteri	137
[8.2.1] Genetica dei batteri	137
[8.2.2] Cromosoma batterico e sua replicazione	138
[8.2.3] Plasmidi	138

[X] **Indice generale**

[8.3] Tipi di mutazioni studiabili e terreni selettivi	139
[8.3.1] Mutanti nei batteri	139
[8.3.2] Terreni selettivi	142
[8.4] Trasferimento genico verticale e orizzontale	142
[8.4.1] Coniugazione	142
[8.4.2] Trasformazione	149
[8.4.3] Trasduzione	151
[8.5] Genetica inversa applicata ai batteri	151
[8.6] Fagi	151
[8.6.1] Cenni sui fagi	151
[8.6.2] Morfologia dei fagi	151
[8.6.3] Fagi modello: T4 e λ	152
[8.7] Modalità di replicazione dei fagi	152
[8.7.1] Ciclo litico	152
[8.7.2] Ciclo lisogenico	154
[8.8] Quali mutazioni si studiano nei fagi?	157
[8.8.1] Mutanti della morfologia di placca	157
[8.8.2] Mutanti di spettro d'ospite	160
[8.8.3] Mutanti letali condizionali	160
[8.9] Costruzione di mappe genetiche nei fagi	161
[8.9.1] Incrocio tra fagi	161
[8.9.2] Mappatura per delezione	161
[8.10] Complementazione tra fagi	162
[8.11] Trasduzione	165
[8.11.1] Trasduzione generalizzata	165
[8.11.2] Trasduzione specializzata	165
Problemi svolti	167

Capitolo [9] Replicazione del DNA e cromosomi **171**

Federica Marini

[9.1] Struttura degli acidi nucleici	172
[9.1.1] Struttura chimica degli acidi nucleici	172
[9.1.2] Struttura chimica dei nucleotidi	173
[9.1.3] Struttura delle catene polinucleotidiche	174
[9.2] La doppia elica del DNA	175
[9.2.1] Strutture alternative del DNA	177
[9.3] Struttura dell'RNA	179
[9.4] Struttura dei cromosomi	179
[9.4.1] Cromosomi virali	180
[9.4.2] Cromosomi dei procarioti	180
[9.4.3] Cromosomi eucariotici	180
[9.5] Replicazione del DNA	184
[9.5.1] Introduzione e concetti chiave	184
[9.5.2] Chimica della sintesi del DNA	185

[9.5.3] DNA polimerasi, l'enzima che replica il DNA: struttura, funzione e proprietà enzimatiche	187
[9.5.4] Modello molecolare della replicazione del DNA: la forca replicativa	190
[9.5.5] Enzimologia della replicazione	196

Problemi svolti	201
------------------------	------------

Capitolo [10] Trascrizione e maturazione dell'RNA **203**

Francesco Acquati

[10.1] Aspetti generali dell'espressione genica	204
[10.1.1] Dogma centrale	204
[10.1.2] Aspetti generali della sintesi di un RNA: inizio, allungamento e terminazione	207
[10.2] Trascrittoma	209
[10.2.1] Diverse tipologie di RNA costituiscono il trascrittoma	209
[10.2.2] RNA codificanti: la struttura dell'RNA messaggero nei procarioti e negli eucarioti	210
[10.2.3] RNA non codificanti: tipologie e processi biologici implicati	211
[10.3] Proteine implicate nella trascrizione	218
[10.3.1] RNA polimerasi	218
[10.3.2] Fattori di trascrizione	219
[10.3.3] Proteine di modificazione della cromatina	220
[10.4] Trascrizione nei procarioti	221
[10.4.1] Promotori batterici	221
[10.4.2] Inizio della trascrizione nei procarioti	222
[10.4.3] Fase di allungamento della trascrizione nei procarioti	223
[10.4.4] Terminatori batterici e loro ruolo nella terminazione della trascrizione	223
[10.5] Trascrizione negli eucarioti	225
[10.5.1] Il problema dell'accessibilità del genoma	225
[10.5.2] Promotori dei geni eucariotici	226
[10.5.3] Elementi regolativi remoti: <i>enhancer</i> e silenziatori	228
[10.5.4] Inizio della trascrizione negli eucarioti	229
[10.5.5] Fasi di allungamento e di terminazione della trascrizione	233
[10.6] Maturazione dell'RNA	233
[10.6.1] <i>Capping</i> e poliadenilazione	234
[10.6.2] Geni interrotti e <i>splicing</i>	235
[10.6.3] Trasporto dell'mRNA dal nucleo al citoplasma	244
[10.6.4] <i>Editing</i> dell'RNA	244
Problemi svolti	249

Capitolo [11] Traduzione e codice genetico **251**

Annamaria Poma

[11.1] Codice genetico	252
[11.1.1] Introduzione e concetti chiave	252
[11.1.2] Struttura del codice genetico	252
[11.1.3] Decifrazione del codice genetico	255

[XII] Indice generale

[11.1.4]	Osservazioni sul codice genetico e sulle sue proprietà	258
[11.1.5]	Fenomeno del vacillamento	259
[11.1.6]	Assegnazione di codoni <i>in vivo</i>	259
[11.1.7]	Universalità del codice genetico	260
[11.1.8]	Codice genetico degli organelli cellulari	260
[11.2]	Traduzione	262
[11.2.1]	Aspetti generali della traduzione	262
[11.2.2]	tRNA: struttura e funzione	263
[11.2.3]	Caricamento del tRNA	264
[11.2.4]	Ribosomi: struttura e funzione	265
[11.2.5]	Traduzione: inizio, allungamento e terminazione	267
	Problemi svolti	272

Capitolo [12] Mutazione genica 273

Antonella Russo

[12.1]	Basi molecolari della mutazione genica	274
[12.1.1]	Principali classi di cambiamenti delle sequenze nucleotidiche	274
[12.1.2]	La molecola di DNA è intrinsecamente instabile	275
[12.1.3]	Le mutazioni possono essere introdotte nel corso della replicazione del DNA o di altri processi cellulari	276
[12.2]	Conseguenze della mutazione	278
[12.2.1]	Gli effetti fenotipici della mutazione dipendono dal tipo di alterazione e dalla posizione del sito mutato	280
[12.2.2]	Retromutazione, reversione, soppressione	288
[12.3]	Le mutazioni possono insorgere a causa dell'azione di agenti fisici o chimici	292
[12.4]	Metodi di studio della mutazione	295
	Problemi svolti	298

Capitolo [13] Stabilità del genoma. Meccanismi di riparazione, ricombinazione e trasposizione 301

Federica Marini

[13.1]	Sistemi di riparazione dei danni al DNA	302
[13.1.1]	Reversione diretta dei danni al DNA	303
[13.1.2]	Riparazione di errori di appaiamento (<i>mismatch</i>), inserzioni e delezioni di basi (MMR)	303
[13.1.3]	Riparazione per escissione di basi (BER)	306
[13.1.4]	Riparazione per escissione di nucleotidi (NER)	306
[13.2]	Ricombinazione	309
[13.2.1]	Riparazione dei tagli alla doppia elica del DNA	309
[13.2.2]	Ricombinazione durante la meiosi	314
[13.3]	Elementi trasponibili	324
[13.3.1]	Elementi trasponibili dei batteri	326
[13.3.2]	Elementi trasponibili degli eucarioti	328
	Problemi svolti	331

Capitolo [14] Citogenetica 333*Antonella Russo*

[14.1] Organizzazione molecolare e strutturale del cromosoma	334
[14.1.1] Il cromosoma eucariotico si rende visibile alla metafase	334
[14.1.2] Ruolo funzionale dei cromosomi nella regolazione della trascrizione	343
[14.1.3] Il corredo cromosomico di ciascuna specie definisce un cariotipo	344
[14.2] Variazioni nella struttura dei cromosomi	345
[14.2.1] Le alterazioni della struttura dei cromosomi possono implicare perdita, guadagno o riposizionamento del materiale ereditario	345
[14.2.2] Basi molecolari delle variazioni della struttura dei cromosomi	346
[14.2.3] Delezioni cromosomiche	347
[14.2.4] Duplicazioni cromosomiche	355
[14.2.5] Inversioni cromosomiche	356
[14.2.6] Traslocazioni	358
[14.3] Variazioni nel numero dei cromosomi	361
[14.3.1] Le alterazioni del numero di cromosomi coinvolgono l'intero assetto o singoli cromosomi	361
[14.3.2] Variazioni della ploidia	362
[14.3.3] L'aneuploidia comporta inevitabilmente un problema di sbilanciamento del dosaggio	365
[14.4] Evoluzione del cariotipo	368
Problemi svolti	373

Capitolo [15] Struttura del gene 375*Salvatore Saccone*

[15.1] Geni dei procarioti e degli eucarioti	376
[15.1.1] Definizione strutturale di gene	376
[15.1.2] Organizzazione generale dei geni	377
[15.1.3] Geni degli eucarioti e comparsa degli introni	378
[15.1.4] Geni e loro prodotti	380
[15.2] Organizzazione dei geni nel genoma	380
[15.2.1] Geni in copie multiple	381
[15.2.2] Famiglie geniche	381
[15.2.3] Organizzazione dei geni nei cromosomi	384
[15.2.4] Geni ortologhi e geni paraloghi	385
[15.3] Origine di nuovi geni	385
[15.3.1] Formazione delle famiglie geniche	385
[15.3.2] Meccanismi di formazione di nuovi geni	387
[15.3.3] Meccanismi di divergenza tra geni paraloghi	388
[15.4] Evoluzione di geni e proteine	388
[15.4.1] Mutazione e tasso di evoluzione	389
[15.4.2] Tasso di evoluzione delle sequenze aminoacidiche	390
[15.4.3] Tasso di evoluzione delle sequenze nucleotidiche	391

[XIV] Indice generale

Capitolo [16] Regolazione dell'espressione genica nei procarioti **393**

Daniela Ghisotti

[16.1] Geni costitutivi e geni regolati	394
[16.2] Regolazione a livello dell'inizio della trascrizione	394
[16.2.1] Regolazione negativa dell'operone lattosio	396
[16.2.2] Regolazione positiva dell'operone lattosio	401
[16.2.3] Regolazione negativa dell'inizio della trascrizione nell'operone triptofano	404
[16.2.4] Duttilità del sistema regolativo: utilizzo di sistemi simili per svolgere funzioni opposte	405
[16.3] Regolazione a livello della fase di allungamento della trascrizione	406
[16.3.1] Esempio dell'operone triptofano: regolazione per attenuazione	406
[16.4] Regolazione post-trascrizionale	409
[16.4.1] Stabilità relativamente bassa degli mRNA nei procarioti	409
[16.4.2] Regolazione mediante sRNA	409
[16.5] Regolazione post-traduzionale	410
[16.5.1] Blocco della funzione enzimatica da parte del prodotto finale della catena metabolica	410
[16.6] Regolazione del ciclo litico e lisogenico del fago λ	411
[16.6.1] Genoma di λ	411
[16.6.2] Scelta del fago λ tra ciclo litico e ciclo lisogenico	411
Problemi svolti	413

Capitolo [17] Regolazione dell'espressione genica negli eucarioti **415**

Sergio Ottolenghi

[17.1] La trascrizione è regolata da meccanismi combinatori	416
[17.1.1] Mantenimento e flessibilità dei programmi trascrizionali in cellule staminali pluripotenti	419
[17.1.2] Programmi trascrizionali di cellule staminali tissutali, progenitori indifferenziati e cellule mature	422
[17.2] Splicing alternativo e relazioni fra isoforme di mRNA e prodotto proteico finale	423
[17.2.1] Modificazioni post-trascrizionali al 3'-UTR	426
[17.2.2] Circuiti regolativi basati sullo <i>splicing</i> alternativo	426
[17.2.3] Sequenze dell'mRNA che ne controllano stabilità e traducibilità	427
[17.2.4] Sequenze specifiche dell'mRNA che ne controllano localizzazione e/o traducibilità	429
[17.3] Controllo post-traduzionale e suoi effetti sulla regolazione dell'espressione genica	432
[17.4] Regolazione globale	433
[17.5] Applicazioni delle conoscenze sui programmi trascrizionali e regolativi	436
[17.6] Regolazione da microRNA	436
[17.6.1] Scoperta dei microRNA in <i>C. elegans</i> e dei meccanismi dei loro effetti regolativi	436
[17.6.2] Espressione dei microRNA	438
[17.6.3] Interazione microRNA-mRNA e controllo combinatorio	439
[17.6.4] Processi regolati da microRNA	439
[17.6.5] Reti regolative che coinvolgono diversi RNA interagenti con un singolo microRNA	440
[17.7] Meccanismi regolativi nelle malattie ereditarie e in fenotipi varianti non patologici	441
[17.7.1] Meccanismi trascrizionali attivi in <i>cis</i>	441
[17.7.2] Effetti trascrizionali in <i>trans</i> : mutazioni che coinvolgono geni codificanti fattori trascrizionali	450
[17.8] Patologia genetica dello <i>splicing</i> dell'RNA	451
[17.8.1] Mutazioni attive in <i>cis</i>	451

[17.8.2] Mutazioni attive in <i>trans</i>	453
[17.9] Patologia genetica di recettori di segnali esterni	455

Capitolo [18] Epigenetica 459

Beatrice Bodega e Massimiliano Pagani

[18.1] Introduzione all'epigenetica	460
[18.2] Basi molecolari e livelli di regolazione epigenetica	460
[18.3] Metilazione del DNA	461
[18.4] Codice istonico	463
[18.4.1] Introduzione	463
[18.4.2] Regolazione della cromatina mediante le modificazioni covalenti degli istoni	464
[18.4.3] <i>Cross-talk</i> delle modificazioni istoniche	467
[18.4.4] Utilizzo di varianti istoniche	468
[18.5] Proteine che regolano le modificazioni epigenetiche	468
[18.5.1] Reclutamento delle proteine agli istoni	468
[18.5.2] Localizzazione delle modificazioni istoniche nel genoma	469
[18.5.3] Rimodellatori della cromatina	470
[18.6] ncRNA nella regolazione epigenetica	470
[18.6.1] Categorie e funzioni dei ncRNA	470
[18.6.2] Ruolo dei ncRNA nella regolazione epigenetica della trascrizione	471
[18.7] Struttura tridimensionale del genoma	471

Capitolo [19] Genetica dello sviluppo animale 475

Silvia Nicolis

[19.1] Identificazione e studio dei geni dello sviluppo	476
[19.1.1] Mutanti spontanei di geni dello sviluppo	476
[19.1.2] Geni omologhi	478
[19.1.3] Studio dell'espressione genica	479
[19.1.4] Mutanti generati in laboratorio	479
[19.2] Sistemi modello della genetica dello sviluppo	486
[19.2.1] <i>Drosophila</i>	486
[19.2.2] Topo	486
[19.2.3] <i>Xenopus</i>	486
[19.2.4] Pollo	486
[19.2.5] <i>Caenorhabditis elegans</i>	486
[19.2.6] <i>Zebrafish</i>	487
[19.2.7] Sistemi cellulari modello di differenziamento (<i>MyoD</i> ; <i>GATA-1</i>)	488
[19.3] Geni e sviluppo precoce	488
[19.3.1] Sviluppo precoce in <i>Drosophila</i>	488
[19.3.2] Primi eventi dello sviluppo nel topo	498
[19.3.3] Sviluppo precoce e origine degli assi corporei nei vertebrati: studi in <i>Xenopus</i>	502

[XVI] **Indice generale**

[19.4] Geni dello sviluppo più avanzato in topo	510
[19.4.1] Geni implicati nello sviluppo del sistema nervoso centrale	510
[19.4.2] Geni e sviluppo del muscolo	522
[19.4.3] Geni e sviluppo del sistema ematopoietico	527

Capitolo [20] DNA ricombinante **531**

Renato Fani

[20.1] Ingegneria genetica	532
[20.1.1] Clonaggio dei geni	532
[20.1.2] Costruzione di una molecola di DNA ricombinante	536
[20.1.3] Riconoscimento dei trasformanti	539
[20.2] Sequenziamento del DNA	544
[20.2.1] Cenni storici	544
[20.2.2] Metodo di Sanger	545
[20.2.3] NGS (<i>Next Generation Sequencing</i>)	545
[20.3] Reazione a catena della polimerasi (PCR)	549
[20.3.1] Principi di base della PCR	549
[20.3.2] PCR <i>in situ</i> e FISH	552
[20.3.3] RT-PCR	552
[20.3.4] PCR quantitativa	554
[20.3.5] Marcatori molecolari e varianti della PCR	555
[20.3.6] Applicazioni della PCR	556
[20.4] Ibridazione DNA/DNA e DNA/RNA	556
[20.4.1] Concetti generali	556
[20.4.2] Ibridazione DNA/DNA - <i>Southern blotting</i>	556
[20.4.3] Ibridazione DNA/RNA (<i>Northern blotting</i>)	560
[20.4.4] <i>Western blotting</i>	560
[20.5] Rilevamento dei polimorfismi genetici	560
[20.5.1] RFLP (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)	561
[20.5.2] Polimorfismi di sequenza e polimorfismi di lunghezza	562
[20.5.3] SNP e metodi per la loro individuazione	564
[20.5.4] <i>Fingerprinting</i> molecolare	564

Capitolo [21] Genomica ed evoluzione molecolare **569**

Alberto Pallavicini

[21.1] Ambiti della genomica	570
[21.1.1] Storia del sequenziamento dei genomi	570
[21.1.2] Biomedicina e genomica: genomica traslazionale e farmacogenomica	574
[21.1.3] Ecologia e genomica	574
[21.2] Definizione della struttura dei genomi	576
[21.2.1] Introduzione	576
[21.2.2] Assemblaggio dei genomi	578

[21.2.3]	Assemblaggio dei trascrittomi	579
[21.2.4]	Annotazione di genomi	580
[21.3]	Genomica comparata	582
[21.3.1]	Genomi procariotici	583
[21.3.2]	Genomi mitocondriali e plastidiali	586
[21.3.3]	Genomi eucariotici: funghi	587
[21.3.4]	Genomi eucariotici: piante	588
[21.3.5]	Genomi eucariotici: animali	589
[21.4]	Evoluzione molecolare	591
[21.4.1]	Evoluzione molecolare e filogenesi molecolare	591
[21.4.2]	Scelta dei marcatori molecolari	593
[21.4.3]	Allineamenti multipli tra le sequenze nucleotidiche e proteiche e misura della diversità molecolare	593
[21.4.4]	Metodi di costruzione degli alberi filogenetici (distanze e caratteri)	594
 Capitolo [22] Genetica di popolazioni		 601
<i>Giorgio Binelli</i>		
[22.1]	Genetica di popolazioni	602
[22.1.1]	Popolazioni e loro caratteristiche	603
[22.1.2]	Legge di Hardy-Weinberg	604
[22.1.3]	Verifica dell'equilibrio di Hardy-Weinberg	607
[22.1.4]	Stima delle frequenze alleliche per marcatori dominanti	607
[22.2]	Mutazione	607
[22.2.1]	Retromutazione – un nuovo equilibrio per le frequenze alleliche	609
[22.3]	Variabilità genetica	609
[22.3.1]	Teorema di Fisher	611
[22.4]	Migrazione o flusso genico	611
[22.5]	Selezione naturale	612
[22.5.1]	Selezione contro il recessivo	615
[22.5.2]	Equilibrio selezione-mutazione	616
[22.5.3]	Selezione contro il dominante	616
[22.5.4]	Selezione contro l'eterozigote	617
[22.5.5]	Selezione a favore dell'eterozigote	618
[22.5.6]	Carico genetico	619
[22.5.7]	Ipotesi neutralista	620
[22.6]	Deriva genetica	620
[22.7]	Inbreeding	624
[22.7.1]	Alleli uguali in stato e per discesa	624
[22.7.2]	Consanguineità	624
[22.7.3]	Coefficiente di <i>inbreeding</i>	625
[22.7.4]	Effetti dell' <i>inbreeding</i>	626
[22.7.5]	Equilibrio di Wright	628
[22.7.6]	Struttura genetica	628
[22.7.7]	Statistiche <i>F</i>	628

[XVIII] Indice generale

[22.8] Il caso delle piccole popolazioni	629
Problemi svolti	634

Capitolo [23] Genetica quantitativa 637

Giorgio Binelli

[23.1] Genetica dei caratteri quantitativi	638
[23.2] Basi statistiche necessarie ed essenziali	638
[23.2.1] Campioni e popolazioni	638
[23.2.2] Media e varianza	639
[23.2.3] Regressione	640
[23.3] Studio dei caratteri quantitativi	641
[23.4] Fase biometrica della genetica quantitativa	644
[23.4.1] Ereditabilità in senso lato	646
[23.4.2] Ereditabilità in senso stretto	647
[23.5] Rivoluzione molecolare e mappatura dei QTL	648
[23.5.1] Mendeliano o quantitativo?	649
[23.5.2] Una situazione molto complessa	652
[23.6] Geni candidati e mappatura per associazione	652
[23.7] Una visione evolutiva	655
Problemi svolti	657

Appendice Organismi Geneticamente Modificati (OGM) 661

Massimo Galbiati

[A.1] Che cosa è un OGM?	662
[A.2] Che cosa significa "modificato geneticamente"?	663
[A.3] Come si modifica il genoma di una pianta?	664
[A.4] Come si costituisce una pianta transgenica?	666
[A.5] Qual è l'impatto in agricoltura?	668
[A.5.1] Piante HR	668
[A.5.2] Piante IR	669
[A.6] Quali altre piante <i>biotech</i> ?	670
[A.6.1] Papaya hawaiana resistente ai virus	670
[A.6.2] Mais, canna da zucchero e soia resistenti alla siccità	671
[A.6.3] "Golden Rice": (pro-)vitamina A dal riso	672
[A.6.4] <i>Biopharming</i> : farmaci e vaccini dalle piante	674
[A.7] Quali biotecnologie vegetali per il futuro?	676
[A.7.1] Dal DNA nucleare al DNA plastidiale: la trasformazione dei cloroplasti	676
[A.7.2] La nuova frontiera dell'ingegneria genetica: il <i>genome editing</i>	677
Mini-glossario	678

Indice analitico 679

Alla fine del volume è riportato l'elenco dei box di approfondimento presenti nei capitoli



Capitolo [18]

Epigenetica

CONTENUTI DEL CAPITOLO

- *Metilazione del DNA*
- *Modifiche della cromatina e degli istoni*
- *Ruolo di proteine e ncRNA che regolano le modificazioni epigenetiche*
- *Struttura tridimensionale del genoma*

INTRODUZIONE

Il termine epigenetica fu coniato da Conrad Waddington (1905-1975) nel 1942, in riferimento a “quella branca della Biologia che studia le interazioni causali fra i geni e i loro prodotti, che pongono in essere il fenotipo”. Si attribuisce ad Aristotele (384-322 a.C.) la prima introduzione del concetto di epigenesi, cioè lo studio dello sviluppo di una forma organica a partire da ciò che non ha forma.

Oggi per epigenetica s'intende lo studio di qualsiasi diversità fenotipica che non sia correlata a differenze genotipiche, ovvero tutto ciò che concerne meccanismi di ereditarietà nei quali l'informazione genetica non è limitata alla sequenza del DNA. I meccanismi epigenetici, inoltre, sono la chiave per comprendere la relazione tra organismo e ambiente e come essa influenzi l'espressione genica.

[18.1] INTRODUZIONE ALL'EPIGENETICA

L'organismo umano è costituito da almeno 200 tipi cellulari, differenti per morfologia, struttura e funzione. Nello stesso individuo, tutti i tipi cellulari (con poche eccezioni) condividono la medesima informazione genetica (genotipo), eppure il loro modo di rispondere a stimoli esterni e interni cambia, determinandone la funzione (fenotipo).

I tipi cellulari che compongono il nostro organismo hanno un'identità diversa pur avendo lo stesso genoma, ovvero possiedono diversi **epigenomi** che definiscono il programma di espressione genica. Tale diversificazione è un processo che avviene durante lo sviluppo dell'organismo, quando il genoma viene programmato per dare luogo ai diversi epigenomi (Fig. 18.1). La programmazione dell'epigenoma è alla base di processi quali il differenziamento, il mantenimento dell'identità cellulare e la plasticità cellulare. La regolazione genica è, infine, intimamente correlata all'organizzazione fisica del DNA e, in particolare, al modo in cui esso è organizzato nella cromatina.

[18.2] BASI MOLECOLARI E LIVELLI DI REGOLAZIONE EPIGENETICA

L'espressione genica è orchestrata in modo cellula-specifico attraverso differenti livelli di regolazione epigenetica, che vanno oltre l'interazione canonica tra sequenze di DNA e fattori di trascrizione e implicano la metilazione del DNA, le varianti istoniche, le modificazioni degli istoni, il rimodellamento della cromatina e la presenza di proteine e RNA regolatori non codificanti con molteplici funzioni; l'insieme di tutte queste caratteristiche definisce uno specifico epigenoma (Fig. 18.2). L'epigenoma contribuisce a qualità, stabilità ed ereditabilità di

programmi trascrizionali specifici delle cellule che subiscono profondi cambiamenti durante lo sviluppo, il differenziamento cellulare e/o i cambiamenti metabolici.

La struttura di base è costituita dalla cromatina che, grazie alle modifiche epigenetiche, può modulare l'informazione genetica e consente di avere molteplici livelli di lettura del DNA. L'informazione genetica posseduta da una cellula è molto estesa (la somma delle lunghezze di tutte le molecole di DNA in una cellula raggiunge i 2 m), tanto da necessitare un impacchettamento ordinato di circa 200.000 volte: l'informazione deve essere accessibile al macchinario trascrizionale e al contempo deve essere condensata per poter essere ospitata in un nucleo con un diametro di pochi micrometri. La struttura della cromatina rende tale impacchettamento ordinato e accessibile: il DNA si avvolge per 147 pb attorno a un ottamero istonico (tetramero H3-H4 e due dimeri H2A-H2B), costituendo l'unità base della cromatina, il nucleosoma. La presenza dell'istone H1 e l'interazione tra i nucleosomi consentono il passaggio da una fibra più lassa (del diametro di 10 nm) a una fibra cromatinica più condensata (del diametro di 30 nm); tale fibra si organizza in anse che costituiscono dei domini funzionalmente e topologicamente definiti, i quali a loro volta si ancorano su supporti proteici di composizione variabile a seconda della fase del ciclo cellulare. La cromatina rappresenta, quindi, una piattaforma su cui il genoma si organizza dinamicamente in risposta a una varietà di segnali endogeni ed esogeni. Una prima storica distinzione descriveva due classi di cromatina a seconda dello stato di condensazione: l'eucromatina, più lassa e accessibile alla trascrizione, e l'eterocromatina, più compatta

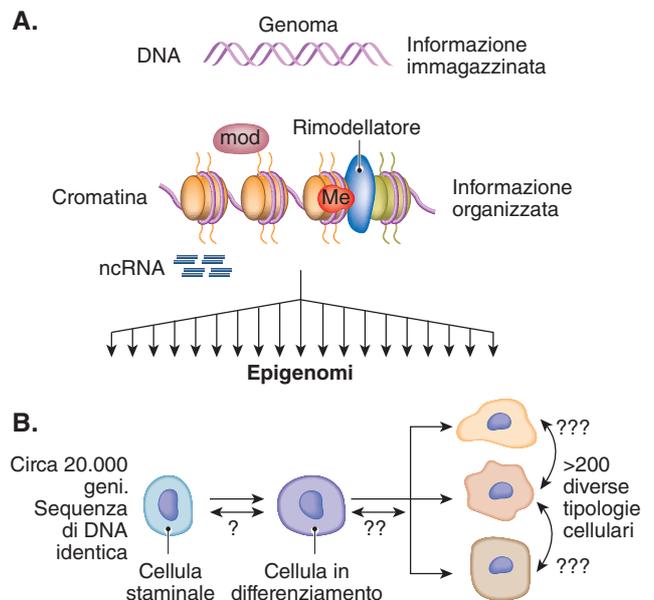


FIGURA 18.1 ▶ Da un unico genoma a molti epigenomi. **(A)** Da un unico genoma possono originare molteplici epigenomi, grazie a specifiche combinazioni della struttura della cromatina. **(B)** Durante lo sviluppo degli organismi multicellulari si assiste alla diversificazione degli epigenomi a partire da un uovo fecondato a cellule via via più specializzate. Ciascuna di queste è caratterizzata da un epigenoma diverso.

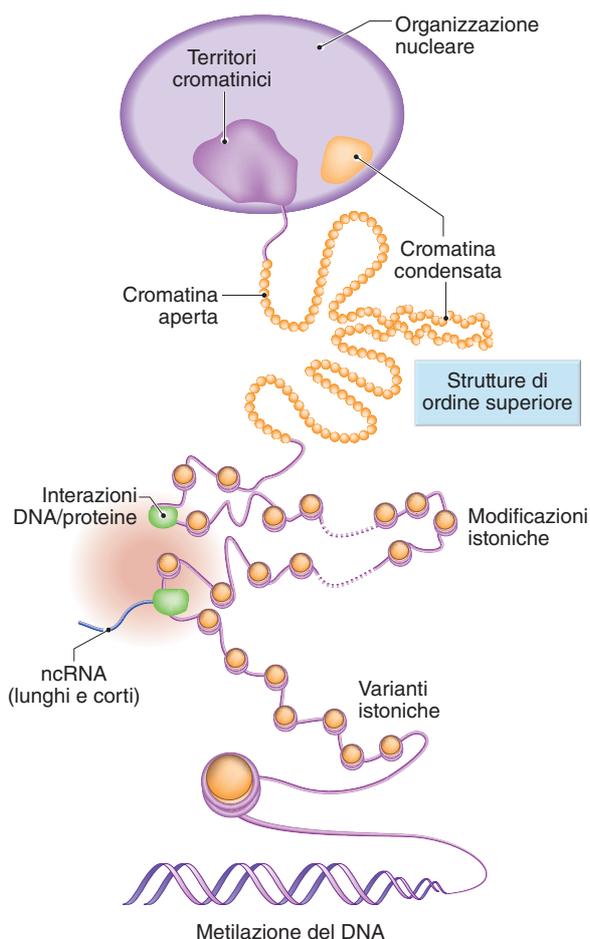


FIGURA 18.2 ► Il genoma è finemente organizzato nel nucleo mediante diversi livelli di regolazione epigenetica. La regolazione epigenetica consiste in cambiamenti della struttura della cromatina mediati dalla metilazione del DNA, dalle varianti istoniche all'interno del nucleosoma, da modifiche post-traduzionali delle code istoniche, dall'associazione con proteine e RNA non codificanti (ncRNA) che mediano il ripiegamento della cromatina e dalla struttura tridimensionale della cromatina; tutte queste modifiche sono responsabili dell'architettura del nucleo e della struttura tridimensionale del genoma.

e scarsamente trascritta. Cambiamenti della struttura della cromatina, principalmente modifiche post-traduzionali delle regioni *N*-terminali degli istoni, varianti istoniche (istoni con residui aminoacidici differenti) e metilazione del DNA sui residui di citosina, consentono di spiegare, almeno in parte, i diversi livelli di condensazione all'interno della stessa macromolecola e, in modo speculare, il quadro di attività trascrizionale che si delinea all'interno di una cellula. Metilazione del DNA e modifiche post-traduzionali degli istoni costituiscono, inoltre, segnali per reclutare "proteine effettrici", enzimi che consentono il rimodellamento delle interazioni tra i nucleosomi o tra questi e il DNA, regolando quindi lo stato di condensazione e l'accessibilità della cromatina. Recentemente è stato dimostrato come anche i ncRNA (RNA non codificanti o *non-coding RNA*, vedi Cap. 10) possano partecipare al processo di reclutamento di tali proteine. Anche la struttura tridimensionale della cro-

matina, e in particolare la regolazione delle interazioni mediate da proteine tra porzioni di DNA distanti, contribuisce a rendere ancora più dinamica la cromatina. La plasticità e la dinamica delle strutture di ordine superiore sono elementi chiave dei processi di trascrizione e di altri processi biologici inerenti al DNA. Il mantenimento di un determinato epigenoma è fondamentale per lo sviluppo, il differenziamento e il mantenimento dell'identità cellulare, pur mantenendo le cellule responsive all'ambiente. Se da un lato le modifiche epigenetiche sono stabili (trasmissibili durante le divisioni cellulari), dall'altro devono essere reversibili per poter garantire responsività all'ambiente esterno.

[18.3] METILAZIONE DEL DNA

La metilazione del DNA può considerarsi il primo livello di modificazione epigenetica e determina di norma una riduzione dell'espressione genica, inibendo il legame degli attivatori trascrizionali. Il processo consiste in una modificazione biochimica che prevede il legame covalente di un gruppo metilico ($-\text{CH}_3$) a livello del carbonio 5 della base azotata citosina (C), quasi esclusivamente nel contesto del dinucleotide 5'-CpG-3' (Fig. 18.3). Il termine CpG si riferisce alla base citosina (C) legata tramite un gruppo fosfato alla base guanina (G) nella sequenza nucleotidica del DNA. La maggior parte dei dinucleotidi CpG nel genoma umano è metilata; tuttavia, le sequenze CpG non metilate non sono distribuite casualmente, ma sono solitamente raggruppate nelle cosiddette "isole CpG", che si trovano prevalentemente in prossimità dei promotori di molti geni, in particolare modo di geni *housekeeping* e di alcuni geni tessuto-specifici.

Gli enzimi che stabiliscono, riconoscono e rimuovono la metilazione del DNA sono suddivisi in tre classi: *writer*, *reader* ed *eraser*. I *writer* sono gli enzimi che catalizzano l'aggiunta di gruppi metilici a residui di C,

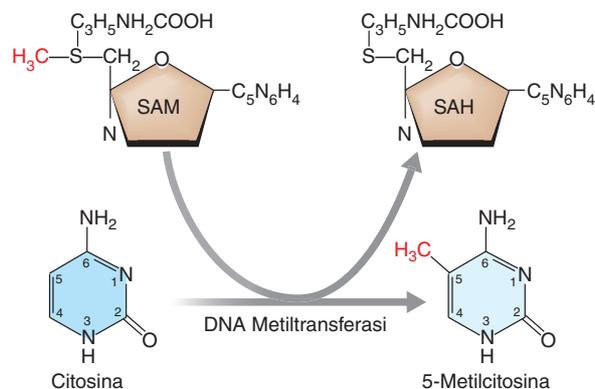


FIGURA 18.3 ► Citosina e 5-metilcitosina. La DNA metiltransferasi è responsabile di una modificazione biochimica che prevede il legame covalente di un gruppo metilico ($-\text{CH}_3$) a livello del carbonio 5 della base azotata citosina (C), generando 5-metilcitosina grazie alla concomitante conversione di S-adenosilmetionina (SAM) in S-adenosilomocisteina (SAH).

ovvero le DNA metiltransferasi (DNMT). Nei mammiferi sono conosciute due classi di DNMT: DNMT3A/B, metiltransferasi responsabili di stabilire un nuovo schema di metilazione in un DNA non modificato, in altre parole deputate alla metilazione *de novo* del DNA; DNMT1, metiltransferasi attiva durante la replicazione del DNA, per copiare e dunque mantenere il *pattern* di metilazione dal filamento parentale a quello appena sintetizzato, grazie alla sua particolare affinità per le sequenze emimetilate (Fig. 18.4). I *reader* riconoscono e legano i gruppi metilici: sono una classe di proteine con alta affinità per la C metilata e contribuiscono alla repressione della trascrizione dovuta a questa modifica. Si tratta di tre famiglie diverse di proteine: corepressori trascrizionali quali MBD (*methyl-CpG-binding protein*), UHRF (*ubiquitin-like containing PHD and RING finger domain*) e proteine *zinc-finger* (Fig. 18.5). Gli

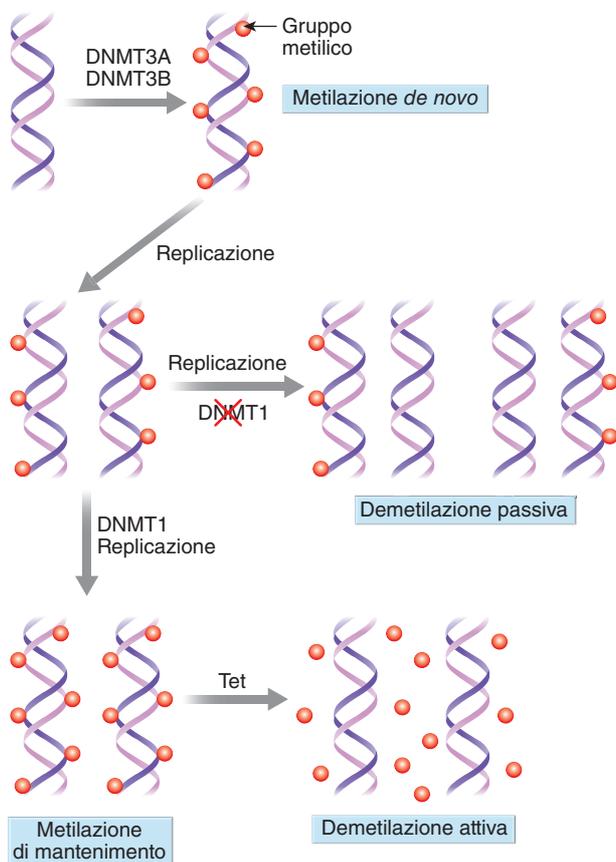


FIGURA 18.4 ► Meccanismi di metilazione e demetilazione del DNA. Durante le prime fasi dello sviluppo, i *pattern* di metilazione sono inizialmente stabiliti dalle DNA metiltransferasi *de novo* (DNMT3A e DNMT3B). In seguito alla replicazione del DNA e alla divisione cellulare, questi marcatori di metilazione sono mantenuti nelle cellule figlie dalla DNA metiltransferasi di mantenimento DNMT1, che ha una preferenza per il DNA emimetilato. Se DNMT1 è inibita o assente quando la cellula si divide, il filamento di nuova sintesi del DNA non viene metilato e con i successivi cicli di divisione cellulare ciò si traduce in una demetilazione passiva. Al contrario, una demetilazione attiva può avvenire attraverso la modificazione enzimatica della 5-metilcitosina a dare citosina grazie all'azione degli enzimi Tet.

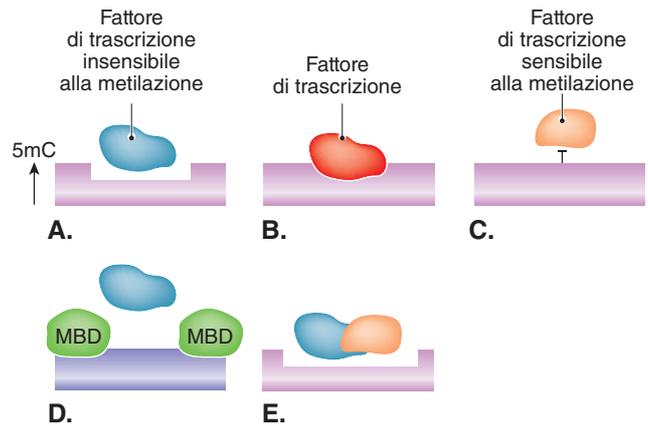


FIGURA 18.5 ► Potenziali scenari per il ruolo della 5-metilcitosina e il legame di fattori di trascrizione. (A) Un fattore di trascrizione insensibile alla metilazione del DNA si lega al DNA indipendentemente dallo stato di metilazione. (B) Un fattore di trascrizione si lega specificamente allo stato metilato del suo sito di legame. (C) Un fattore di trascrizione sensibile alla metilazione è bloccato dalla 5-metilcitosina. (D) Proteine con il dominio di legame alle CpG metilate (MBD) si legano allo stato metilato, determinando una repressione indiretta. (E) Un fattore di trascrizione insensibile alla metilazione agisce come fattore pioniere e crea un sito di ridotta metilazione che consente il legame a un fattore sensibile alla metilazione.

eraser modificano e rimuovono i gruppi metilici. La demetilazione può essere data da demetilazione/ossidazione che produce un substrato riconosciuto dal meccanismo di riparazione BER (*base excision repair*), il quale riposiziona una C non metilata. Un altro sistema prevede l'intervento degli enzimi Tet (*ten-eleven translocation*), i quali aggiungono un gruppo idrossilico sul gruppo metilico della C metilata, così da formare l'idrossimetilcitosina, e in seguito catalizzano ossidazioni successive fino a portare alla C non metilata (Fig. 18.4). Nei vertebrati, la metilazione del DNA sembra agire di concerto con altre modifiche epigenetiche per prevenire l'attivazione trascrizionale ed è generalmente associata a uno stato represso della cromatina. In particolar modo, la metilazione di un promotore a monte di un gene causerebbe la sua repressione, che a sua volta può essere revertita tramite demetilazione della stessa sequenza. In altre parole, i diversi *pattern* di metilazione regolano l'accensione e lo spegnimento di alcuni geni. Si ipotizza che la metilazione del DNA sia evoluta come meccanismo di difesa dell'ospite per silenziare il DNA estraneo proveniente da sequenze virali o elementi trasponibili e ripetuti.

La modificazione epigenetica della metilazione del DNA è essenziale per il normale sviluppo, controllando l'espressione di geni coinvolti in specifici stadi embrionali e nel differenziamento cellulare e altri processi chiave, tra cui l'*imprinting* genomico (BOX 18.1), l'inattivazione del cromosoma X, il silenziamento di elementi ripetuti e la cancerogenesi.

BOX 18.1 *Imprinting*

Normalmente, entrambe le copie di ciascun gene, derivanti una dalla linea materna e una da quella paterna, hanno la stessa potenzialità di essere attive in qualsiasi cellula, dando perciò origine a un'espressione detta biallelica. Un gene si dice invece sottoposto a *imprinting* se non vengono espressi entrambi gli alleli, bensì uno solo di essi, e se questa espressione differenziale dipende dal fatto che l'allele derivi dalla madre o dal padre. Questa regolazione interessa solo un centinaio dei circa 20.000 geni del genoma umano e i geni soggetti a *imprinting* sono generalmente organizzati in *cluster* contenenti anche un gene il cui prodotto è un RNA non codificante. Si tratta di una regolazione tipicamente epigenetica, in quanto viene ereditata pur non essendo legata a un cambiamento di sequenza. L'espressione differenziale è infatti regolata dalla metilazione del DNA a livello di una regione di regolazione del *cluster* detta **DMR (regione a metilazione differenziale** o *differentially DNA-methylated region*), è tipicamente repressiva, avviene a livello dei gameti e viene mantenuta dopo la fecondazione. Ciò implica che la genitorialità viene data al genitore che fornisce l'allele silente. L'*imprinting* viene quindi detto *materno* se un allele ereditato dalla madre è trascrizionalmente silente, mentre è attivo quello ereditato dal padre. Viceversa, l'*imprinting* viene detto *paterno* se l'allele derivante dal padre è silenziato, mentre è attivo quello derivante dalla madre, che quindi non ha ricevuto *imprinting*. Questo tipo di regolazione modula l'espressione fisiologica dei geni ed è quindi molto interessante per lo studio dei meccanismi di regolazione epigenetica, ma è anche implicato in patologie, molte delle quali neurologiche. La maggior parte dei geni regolati da *imprinting* ha, infatti, funzioni legate allo sviluppo dell'embrione, della placenta e del neonato, ma anche a processi neurologici. Esempi classici di disordini umani legati ad alterazioni dell'*imprinting* sono le sindromi di Prader-Willi, di Angelman, di Silver-Russell, di Beckwith-Wiedemann (BWS), l'osteodistrofia ereditaria di Albright e la disomia 14 uniparentale. Molti dei geni coinvolti codificano fattori di crescita (come IGF2 nel caso della sindrome di Beckwith-Wiedemann) o fattori che interferiscono con la loro azione (come GRB10 nella sindrome di Silver-Russell). Generalmente i geni espressi in linea paterna favoriscono la crescita, mentre i geni espressi in linea materna la riducono. La BWS prende il nome da Wiedemann e Beckwith, che per primi la caratterizzarono nel 1964 e nel 1969. Si tratta di una sindrome generalmente sporadica, seppur nel 10-15% dei casi sia stata riportata una trasmissione autosomica dominante. La sindrome viene definita "da ipercrescita", in quanto le caratteristiche principali della patologia sono la macrosomia (aumentata massa muscolare alla nascita) e la macroglossia (aumentata massa della lingua), occhi prominenti, presenza di una o più pieghe nella parte anteriore del lobo dell'orecchio e altre caratteristiche legate a iperaccrescimento, inclusa l'organomegalia. La mortalità è stimata intorno al 21% ed è dovuta a problemi respiratori e a difficoltà nell'ingestione di cibo dovute alla macroglossia, nonché all'elevata frequenza di tumori addominali (10-20%). La maggioranza dei pazienti non ha anomalie cromosomiche, bensì alterazioni epigenetiche, generalmente a carico della regione 11p15.5, caratterizzata da un *cluster* di geni contigui sottoposti a *imprinting* che comprende IGF2 (espressione paterna), H19 (espressione materna), CDKN1C (espressione materna), KVLQT1 (espressione materna) e KCNQ1OT1 (o LIT1, espressione paterna). Questi geni sono organizzati in due domini separati sottoposti a *imprinting*, detti ICR1 e ICR2 (*Imprinted Controlled Region*), rispettivamente telomerico e centromerico. La regione ICR1 è normalmente metilata solo nella copia di derivazione paterna del cromosoma 11. L'ipermetilazione del dominio ICR1 spiega circa il 5% dei casi di BWS. Questa alterata regolazione causa perdita dell'attività del gene H19, che codifica un lungo RNA non codificante con funzione di soppressore. Ne consegue l'espressione biallelica del gene IGF2 (*Insulin-like Growth Factor 2*), che codifica un mitogeno fetale che stimola la crescita in molti tessuti diversi. La regione ICR2 è invece normalmente metilata soltanto a livello della copia materna del cromosoma 11. In circa il 50% dei casi di BWS è presente ipometilazione nella linea materna di questa regione, che causa un'aumentata attività del gene KCNQ1OT1 o LIT1, che codifica un lungo RNA non codificante espresso normalmente in linea paterna, dove reprime il gene CDKN1C. La perdita di *imprinting* causa aumento di attività del gene KCNQ1OT1, con eccessiva repressione dei geni limitrofi, incluso CDKN1C, normalmente coinvolto in giusta dose nella limitazione della crescita e della divisione cellulare. Una riduzione eccessiva dell'attività di questo gene causa quindi sovraccrescita e altre caratteristiche tipiche della BWS.



[18.4] CODICE ISTONICO

[18.4.1] Introduzione

La cromatina è costituita da DNA, istoni e proteine non istoniche e rappresenta la struttura sulla quale si organizza il genoma nei nuclei eucariotici.

L'unità funzionale della cromatina è il nucleosoma: 147 coppie di basi di DNA che si avvolgono attorno a un ottamero istonico costituito da una coppia di ciascuno degli istoni H2A, H2B, H3, H4 (Fig. 18.6).

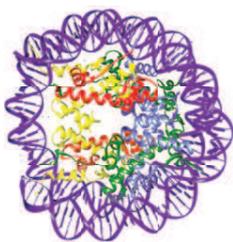
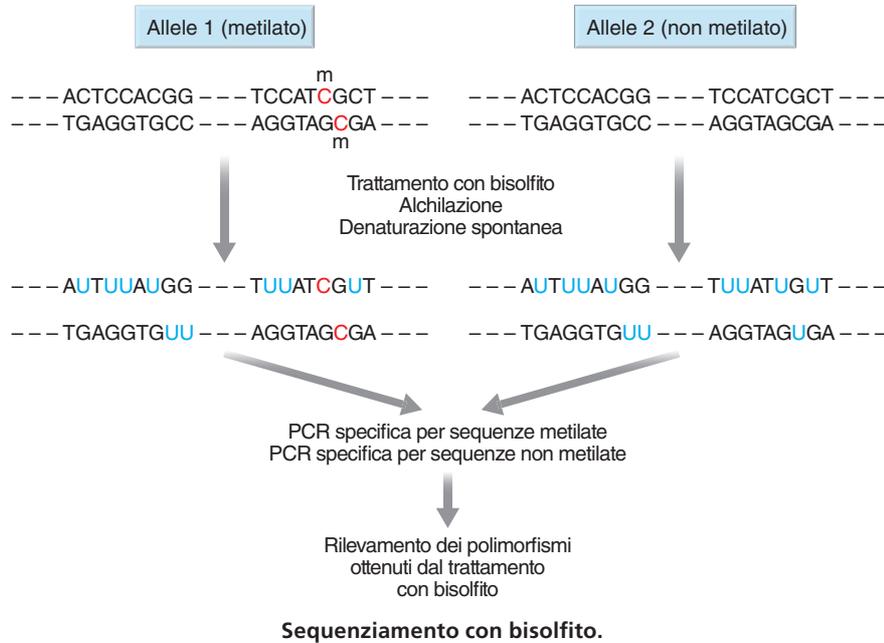
Nel 1960, gli studi pionieristici di Vincent Allfrey evidenziarono come gli istoni fossero soggetti a **modifica-**

zioni covalenti post-traduzionali (PTM, Post-Translational Modifications), ma le prime nozioni su come queste modificazioni potessero influenzare la struttura della cromatina furono ottenute soltanto nel 1997, a seguito dell'ottenimento della struttura del nucleosoma mediante analisi cristallografica.

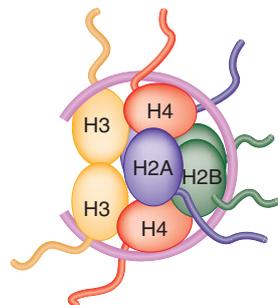
Tale struttura mostrò che le code *N*-terminali degli istoni protrudevano dal nucleosoma, prendendo contatto con i nucleosomi adiacenti: prese allora piede l'ipotesi che le modificazioni covalenti post-traduzionali delle code istoniche potessero interferire con le interazioni internucleosomiche, producendo un effetto globale sulla struttura della cromatina (Fig. 18.6).

BOX 18.2 Sequenziamento con bisolfito per determinare le regioni metilate del DNA

Con la terminologia sequenziamento con bisolfito si indicano in generale tecniche di analisi sulla metilazione del DNA dopo trattamento con bisolfito, che converte i residui di citosina (C) in uracile (U), lasciando i residui di 5-metilcitosina (5-mC) intatti. Per questo motivo, tale trattamento introduce specifici cambiamenti nella sequenza del DNA che dipendono dallo stato di metilazione dei singoli residui di C, con una risoluzione al singolo nucleotide. In particolare, un'analisi di sequenziamento leggera come timina (T) le C non metilate e come C le 5-mC (**Figura**).



A.



B.

FIGURA 18.6 ▶ Struttura del nucleosoma. (A) Un esempio di modello di struttura del nucleosoma derivante da analisi cristallografica. **(B)** Rappresentazione schematica della struttura del nucleosoma con l'ottamero istonico attorno a cui si avvolge il DNA. La formazione del nucleosoma prevede dapprima la deposizione degli istoni H3/H4 (tetrameri), a cui segue la deposizione degli istoni H2A/H2B (dimeri). Le code istoniche protrudono dal core istonico.

Gli studi degli ultimi vent'anni hanno rivelato come le modifiche covalenti degli istoni, assieme a quelle del DNA, possano cooperare alterando l'organizzazione e la funzione della cromatina e come abbiano un ruolo nella regolazione di tutti i processi a carico del DNA, come la trascrizione, la riparazione dei danni al DNA e la re-

plicazione, rappresentando per complessità il secondo livello di regolazione epigenetica della cromatina.

[18.4.2] Regolazione della cromatina mediante le modificazioni covalenti degli istoni

Finora sono stati identificati almeno 60 differenti residui aminoacidici su cui possono avvenire modifiche covalenti degli istoni, di certo una sottostima del numero di modificazioni che potenzialmente potrebbero aver luogo. L'identificazione di queste modificazioni è avvenuta prevalentemente grazie all'impiego di anticorpi specifici e della spettrometria di massa.

La tecnica che ha rivoluzionato la conoscenza sul significato funzionale delle PTM è l'immunoprecipitazione della cromatina (ChIP, *Chromatin Immunoprecipitation*, **BOX 18.3**), che ha consentito di mettere in correlazione la ricchezza di modificazioni istoniche in determinati *loci* genomici con una funzione specifica (trascrizione, riparazione dei danni, replicazione).

Le modificazioni covalenti dei residui istonici oggi conosciute includono metilazione, acetilazione, fosforilazione, ubiquitinazione, sumoilazione, deaminazione, β-N-glicosilazione, ADP-ribosilazione, isomerizzazione

BOX 18.3 ChIP: la tecnica di elezione per lo studio della localizzazione genomica dei regolatori della cromatina

L'immunoprecipitazione della cromatina (ChIP, *Chromatin ImmunoPrecipitation*) è il metodo più comune per esaminare l'associazione di specifici fattori, istoni modificati e proteine con una regione d'interesse di DNA endogeno e permette quindi di determinare dove un fattore di trascrizione interagisca con un gene candidato o di monitorare la presenza di istoni con modificazioni post-traduzionali in specifiche regioni genomiche.

La ChIP è il vero cavallo di battaglia delle analisi cromatiniche; a partire da essa si sono sviluppate numerose tecnologie avanzate, ma l'idea alla base della ChIP è al cuore di tutte.

Il protocollo generale è il seguente:

- mediante l'uso di formaldeide o raggi UV si formano legami crociati (*cross-link*) tra il DNA e le proteine associate sulla cromatina in cellule vive o in tessuti (questo passaggio è omissa nella *Native ChIP*), fissando così le interazioni DNA-proteine e proteine-proteine;
- i complessi DNA-proteine vengono scissi in frammenti di DNA di circa 500 pb tramite sonicazione o digestione con nucleasi;
- frammenti di DNA associati con le proteine d'interesse vengono selettivamente immunoprecipitati, utilizzando un anticorpo specifico per una data proteina;
- i frammenti di DNA vengono purificati e viene valutato l'arricchimento di specifiche sequenze di DNA, che rappresentano regioni sul genoma con cui la proteina d'interesse è associata *in vivo*. La strategia più semplice per valutare questo arricchimento consiste nell'analizzare i campioni tramite PCR in real-time (RT-qPCR).

Tuttavia, a partire da questa tecnica di base si sono evolute molte varianti, a partire dal metodo con cui analizzare il DNA immunoprecipitato: caricandolo su un *chip* (*microarray*) o procedendo con il sequenziamento (*next-generation sequencing*). Molte altre varianti hanno poi consentito di migliorare l'accuratezza della mappatura del sito di legame delle proteine di interesse (ChIP-exo), di combinare la ChIP con l'analisi della struttura 3D per individuare regioni del DNA che interagiscono tra loro tramite la proteina di interesse (ChIA-PET), di diminuire il numero di cellule necessarie in partenza per l'analisi (*carrier ChIP*, *CchIP* o *micro-ChIP*, μ ChIP), di velocizzare il protocollo (*fast ChIP*, *qChIP* o *Quick and Quantitative ChIP*, Q^2 ChIP), o ancora di aumentare il *throughput* e la possibilità di automazione (*Matrix ChIP*).

Nonostante l'enorme valore dei metodi di ChIP, è importante essere a conoscenza dei loro limiti: 1) il saggio ChIP spesso produce bassi segnali in confronto ai controlli negativi, che possono portare a risultati inconcludenti; 2) è difficile determinare il sito preciso di legame di un fattore per la limitata risoluzione del saggio; 3) non si tratta di un saggio funzionale e pertanto da solo non è in grado di dimostrare il significato funzionale di una proteina o di un istone modificato in una regione genomica di interesse; 4) sono necessari anticorpi che riconoscano la proteina bersaglio con un alto grado di specificità e che la facciano efficientemente precipitare, anche dopo *cross-linking*.

delle proline, *clipping* delle code istoniche, carbossilazione (BOX 18.4). Tali modificazioni avvengono su specifici aminoacidi, sono tutte dovute a enzimi dedicati e la maggior parte di esse è reversibile, cioè esistono altri enzimi in grado di rimuoverle: per questo sono molto dinamiche e in grado di mutare velocemente a seguito di stimoli ambientali.

In maniera semplificata, le modificazioni istoniche esercitano la loro funzione attraverso due meccanismi, che agiscono però in maniera concertata: il primo riguarda la loro capacità di influenzare le interazioni elettrostatiche degli istoni con le macromolecole circostanti (DNA, nucleosomi adiacenti), mentre il secondo riguarda la capacità che tali modificazioni hanno di reclutare o respingere altri regolatori epigenetici (vedi Par. 18.5).

La prima modificazione istonica a essere stata caratterizzata è l'**acetilazione**, che avviene sui residui di lisina, con conseguente neutralizzazione della carica positiva dell'aminoacido e indebolimento dell'interazione tra istoni e DNA. Si tratta di una modificazione molto dinamica, regolata dall'attività opposta di due famiglie di enzimi: le istone acetiltransferasi (HAT, *histone acetyl-transferase*), che aggiungono il gruppo acetilico, e le istone deacetilasi (HDAC, *histone deacetylase*), che rimuovono il gruppo funzionale.

La **fosforilazione** è una modificazione molto rappresentata e avviene su residui di serina, treonina e tirosina, alterando con l'aggiunta di un gruppo fosfato la carica del residuo; è regolata dall'attività di chinasi e fosfatasi, che aggiungono e rimuovono, rispettivamente, il gruppo fosfato da una molecola donatrice di ATP.

La **metilazione**, al contrario delle modificazioni sopra citate, non altera la carica del residuo, può avvenire su residui di lisina o arginina e può realizzarsi come mono-, di- o trimetilazione delle lisine o come mono- o dimetilazione simmetrica o asimmetrica delle arginine; ciascuno dei differenti livelli di metilazione può avere un significato funzionale completamente differente. La metilazione è operata da metiltransferasi specifiche per le lisine o le arginine e può essere revertita da specifiche demetilasi.

Da un punto di vista funzionale, una particolare combinazione di PTM può avere effetti sulla riparazione del DNA: uno dei primi segnali per la riparazione di un danno parte dalla fosforilazione dell'istone H2A e dalla metilazione dell'istone H3 in siti specifici; riguardo alla replicazione del DNA, invece, è stato dimostrato un ruolo positivo per l'acetilazione di diverse lisine sull'istone H4, assieme alla metilazione della lisina in posizione 4 dell'istone H3.

Inoltre, le modificazioni istoniche possono avere sulla trascrizione una vasta gamma di effetti molto studiati, che possono essere suddivisi in due categorie: quelli che sono associati con l'attivazione trascrizionale (acetilazione, metilazione, fosforilazione e ubiquitinazione) e quelli che sono correlati con la repressione trascrizionale (metilazione, ubiquitinazione, sumoilazione, deaminazione e isomerizzazione delle proline); è necessario considerare che una stessa modificazione di fatto può avere un ruolo differente a seconda della posizione del residuo modifi-

cato e del contesto, ovvero delle PTM dei residui circostanti. L'utilizzo di anticorpi specifici per le modificazioni istoniche in ChIP, accoppiato con tecnologie di *next-generation sequencing* (vedi Cap. 20), ha consentito di comprendere che le modificazioni istoniche lungo il genoma non sono uniformemente distribuite. Sono state messe in luce alcune caratteristiche comuni: l'acetilazione, ad esempio, è correlata con l'attivazione trascrizionale ed è particolarmente frequente nelle regioni degli *enhancer*, del promotore e al 5' delle regioni codificanti.

BOX 18.4 Modificazioni istoniche

Gli istoni sono estensivamente modificati post-traduzionalmente per regolare il compattamento dei nucleosomi e il legame di proteine che riconoscono specificamente residui istonici modificati. Le modificazioni rispondono a limitazioni steriche di natura chimica e possono conseguentemente cumularsi su uno stesso istone o su istoni limitrofi, a patto di essere compatibili chimicamente, dando così origine a un vero e proprio alfabeto letto dalla cellula per regolare opportunamente l'espressione genica e il compattamento del DNA nel nucleo.

Di seguito sono descritte alcune delle modifiche a oggi conosciute e la loro funzione (quando caratterizzata).

Metilazione

È una delle modificazioni più diffuse. La più studiata avviene a carico delle lisine (che possono essere mono-, di- o trimetilate) e delle arginine (mono- o simmetricamente e asimmetricamente dimetilate), ma attualmente si conoscono molti altri residui soggetti a questa regolazione, come la glutammina, l'acido aspartico e la prolina. La reazione è catalizzata da metilasi, che sfruttano cofattori come la S-adenosilmetionina per attuare la modifica. La modificazione è reversibile a opera delle demetilasi. A differenza di altre modificazioni, come acetilazione e fosforilazione, la metilazione non causa alterazioni nella carica e può avere funzione sia repressiva che attivatrice, a seconda di quale residuo sia modificato e in quale contesto istonico. Tipicamente, la trimetilazione della lisina 27 sull'istone H3 (H3K27me3) è letta come repressiva, mentre la trimetilazione della lisina 4 sullo stesso istone (H3K4me3) è tipicamente attivatrice. A complicare la lettura del codice, esistono tuttavia anche situazioni in cui entrambe le modificazioni sono presenti sullo stesso istone. In questo caso il gene è detto bivalente (o "poised"), ovvero pronto per essere represso o attivato repentinamente in risposta a stimoli ambientali.

Fosforilazione

Gli istoni sono tipicamente fosforilati a livello dei residui di serina, treonina e tirosina oppure a livello di arginina, istidina e lisina (seppure questi ultimi siano meno caratterizzati). I gruppi fosfato vengono aggiunti e rimossi da istone chinasi e fosfatasi, rispettivamente. Il trasferimento del gruppo fosfato avviene a partire dall'ATP e causa l'introduzione di una carica negativa che può influenzare le interazioni elettrostatiche nella cromatina. Proprio per questo motivo, la fosforilazione svolge un ruolo importante, ad esempio, in seguito a danni al DNA, facilitando il reclutamento degli enzimi di riparazione grazie al rilassamento della struttura della cromatina. In altri casi la modifica può essere associata alla regolazione trascrizionale o alla divisione cellulare per mitosi e meiosi.

Acetilazione

Questa modificazione è condotta da istone acetiltransferasi, le quali sfruttano il coenzima acetil-CoA per catalizzare il trasferimento di un gruppo acetilico al gruppo aminico della lisina. L'acetilazione causa la neutralizzazione della carica positiva della lisina, potenzialmente riducendo le interazioni tra istoni e DNA e quindi aprendo la cromatina all'interazione con fattori di trascrizione e RNA polimerasi, promuovendo quindi la trascrizione. Questa modificazione viene rimossa da deacetilasi, che quindi ristabiliscono la carica positiva a livello delle lisine, stabilizzando l'architettura della cromatina e agendo quindi prevalentemente da repressore trascrizionale.

Deiminazione

Questa reazione coinvolge la conversione dell'arginina in citrullina. Nelle cellule di mammifero è catalizzata dalla peptidil deiminasi PAD14, con conseguente neutralizzazione della carica positiva dell'arginina, dato che la citrullina non presenta carica netta.

β -N-glicosilazione

Nei mammiferi sembra esserci un solo enzima, la O-GlcNAc transferasi, in grado di modificare serine e treonine con un residuo di β -N-acetilglucosamina. L'enzima utilizza come substrato la UDP-GlcNAc per il trasferimento dello zucchero. Questa modificazione è altamente dinamica ed è caratterizzata da elevato *turnover*, benché sia presente ugualmente un solo enzima in grado di rimuovere lo zucchero aggiunto, detto β -N-acetilglucosaminidasi (O-GlcNAcasi). Ad oggi, questa modificazione è nota solo a carico di H2A, H2B e H4.

ADP-ribosilazione

Gli istoni possono essere mono- o poli-ADP-ribosilati su residui di glutammato e arginina, ma poco è noto della funzionalità di questa modificazione, benché si pensi sia legata alla carica negativa che conferisce. Anche in questo caso la modificazione è reversibile ed è stata caratterizzata su tutti gli istoni.

Ubiquitinazione e sumoilazione

L'*ubiquitinazione* consiste, contrariamente alle modificazioni descritte in precedenza, in una modificazione covalente derivante dall'attacco alle lisine istoniche di un polipeptide di 76 aminoacidi, l'ubiquitina, attraverso l'azione sequenziale di tre enzimi, detti E1-attivatore, E2-coniugatore ed E3-ligasi. Il complesso enzimatico determina specificità di substrato e grado di ubiquitinazione (mono- o poli-). Per quanto riguarda gli istoni, la monoubiquitinazione sembra essere la più rilevante, benché l'effetto di queste modificazioni sia poco caratterizzato. I pochi siti noti e caratterizzati per essere ubiquitinati sembrano essere coinvolti nel silenziamento genico (H2AK119ub1), ma anche nella regolazione dell'inizio e dell'allungamento della trascrizione (H2BK123ub1). Pur trattandosi di una modificazione covalente, l'ubiquitina può essere rimossa a opera di isopeptidasi.

La *sumoilazione* è in relazione all'ubiquitinazione, in quanto coinvolge l'attacco covalente di molecole simili all'ubiquitina attraverso l'azione di enzimi analoghi. Questa modificazione sembra funzionare antagonizzando acetilazione e ubiquitinazione e potrebbe, di conseguenza, avvenire sugli stessi residui.

Clipping delle code istoniche

È probabilmente il modo più drastico di rimuovere modificazioni istoniche, rimuovendo la coda *N*-terminale in cui risiedono. Questa modificazione è ancora poco caratterizzata, ma sembra essere mediata dalla catepsina L durante il differenziamento delle cellule staminali nel topo.

Isomerizzazione delle proline

Il legame peptidico delle proline si interconverte naturalmente tra le conformazioni in *cis* e in *trans*, ruotando di 180°. Le prolina isomerasi facilitano questa interconversione, che ad oggi è ancora poco caratterizzata.

[18.4.3] Cross-talk delle modificazioni istoniche

Le PTM degli istoni non rimangono delle entità a sé, ma esiste una raffinata influenza reciproca tra le differenti modificazioni istoniche: esse agiscono di concerto e costituiscono una piattaforma per l'organizzazione dei successivi livelli di regolazione epigenetica. Il codice istonico, rappresentato dalla combinazione dei grup-

pi funzionali aggiunti sui residui delle code istoniche, genera dei segnali specifici per attrarre o respingere complessi multiproteici deputati alla regolazione dell'espressione genica (Fig. 18.7).

Questa interazione (*cross-talk*) ha luogo attraverso meccanismi multipli: le diverse modificazioni possono competere per lo stesso sito, come ad esempio acetilazione, metilazione e ubiquitinazione, che avvengono tutte a carico delle lisine (I); la presenza di una modificazione istonica può escludere (II) o richiama-

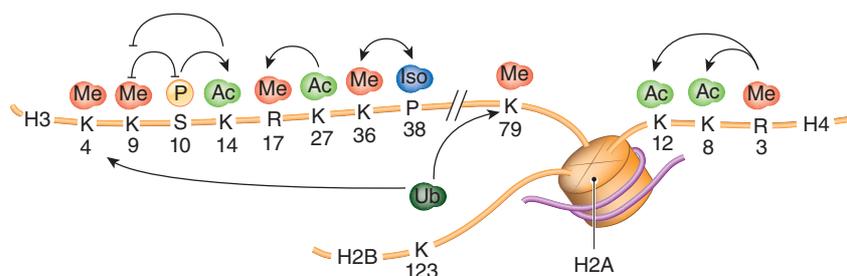


FIGURA 18.7 ► Il dialogo (*cross-talk*) tra le modificazioni istoniche è un fattore importante per lo stato trascrizionale della cromatina. L'influenza positiva e negativa di una modificazione istonica sull'altra è evidenziata, rispettivamente, da una freccia o da una linea con estremità piatta. Alcune modificazioni, come metilazione (Me), fosforilazione (P), acetilazione (Ac), ubiquitinazione (Ub) e isomerizzazione (Iso), richiamano o escludono altre modificazioni istoniche. Questo *cross-talk* tra le modificazioni si integra con altri meccanismi per stabilire lo stato trascrizionale della cromatina. K: lisina; S: serina; R: arginina; P: prolina.

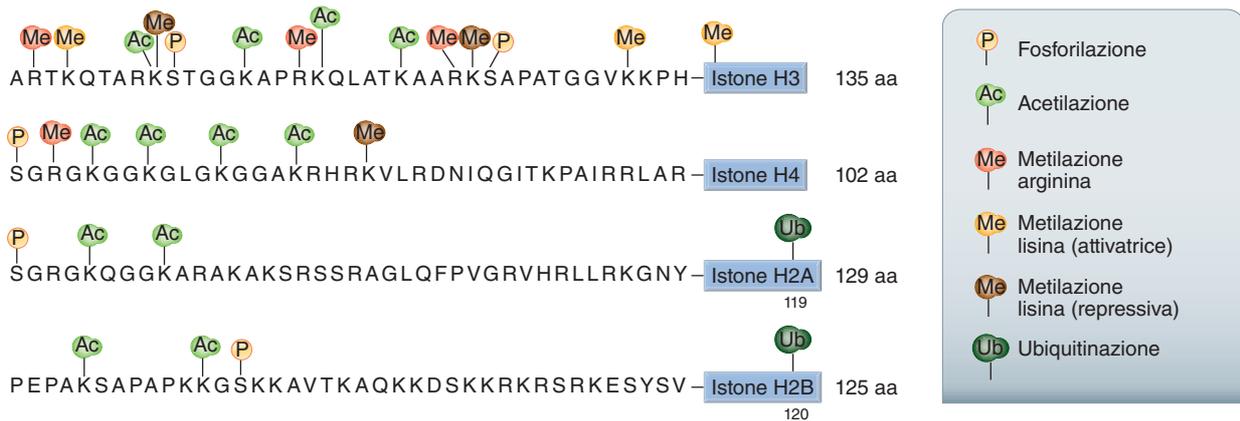


FIGURA 18.8 ▶ Le modifiche istoniche si suddividono in attivatrici e repressive a seconda del loro effetto sulla trascrizione. Le code amino-terminali degli istoni costituiscono gran parte della massa nucleosomale e sono il bersaglio delle modificazioni covalenti degli istoni. Le modificazioni possono anche avvenire in minima misura nella parte globulare dell'istone, come mostrato (la parte globulare è stilizzata in un rettangolo). Le modificazioni attivatrici sono acetilazione, metilazione delle arginine e metilazione di alcune lisine, come H3K4 e H3K36. Modificazioni di tipo repressivo includono la metilazione di H3K9, H3K27 e H4K20 e le ubiquitinazioni a carico di numerosi altri siti.

re (III) un'altra modificazione; l'attività enzimatica di una proteina reclutata può variare in base alle modificazioni del substrato (IV). Le diverse modificazioni istoniche, infine, possono cooperare per reclutare efficientemente regolatori o rimodellatori della cromatina (Fig. 18.8) e cooperare con la metilazione del DNA.

[18.4.4] Utilizzo di varianti istoniche

La presenza di varianti istoniche costituisce un successivo livello di complessità nella regolazione epigenetica della cromatina (Fig. 18.9). Infatti, l'utilizzo di varianti istoniche è stato implicato nella regolazione trascrizionale e nel controllo dell'ereditarietà dell'epigenoma; in particolare, le varianti istoniche sembrano modificare le proprietà della particella nucleosomale e incidere sull'attività della RNA polimerasi. Il processo di sviluppo e differenziamento prevede l'utilizzo di specifiche tipologie di varianti istoniche.

Le varianti istoniche di H2A sono molto ben caratterizzate. H2A.X è necessaria per segnalare la presenza di danno al DNA e per indurne la riparazione. H2A.Z è essenziale per un corretto sviluppo ed è coinvolta nell'attivazione genica; nell'uomo si trova nei nucleosomi in prossimità del sito di inizio della trascrizione (TSS, *transcriptional start site*) di geni attivi.

Anche le varianti istoniche di H3 hanno dei significati funzionali ben definiti. H3.3 differisce da H3 per pochi aminoacidi, ma è di solito localizzata in regioni ricche di geni e trascrizionalmente attive; tale variante presenta, inoltre, un profilo di modificazioni post-traduzionali che riflette la competenza alla trascrizione delle regioni che la possiedono. Anche l'identità dei centromeri eucariotici è epigeneticamente definita dalla presenza di nucleosomi contenenti la variante di H3 CenpA (*centromere protein A*).

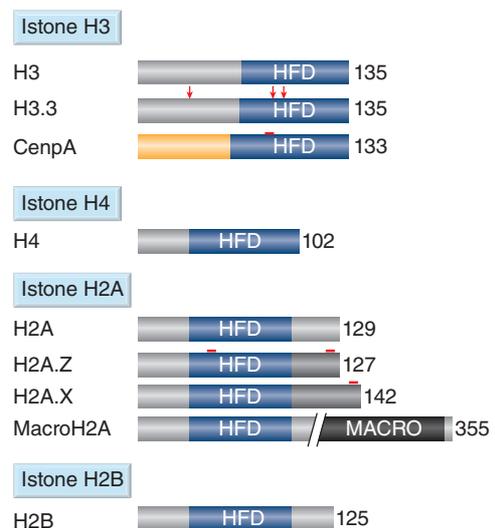


FIGURA 18.9 ▶ Le varianti istoniche differiscono dagli istoni canonici per pochi aminoacidi. Le varianti istoniche sono coinvolte in vari processi, dalla replicazione del DNA alla riparazione dei danni al DNA alla costruzione di regioni genomiche di eterocromatina. Qui sono rappresentati in maniera schematica i domini proteici degli istoni, tra cui il dominio di dimerizzazione HFD, mentre le regioni in grigio scuro, giallo, nero o indicate da simboli in rosso indicano le differenze delle varianti istoniche rispetto agli istoni canonici.

[18.5] PROTEINE CHE REGOLANO LE MODIFICAZIONI EPIGENETICHE

[18.5.1] Reclutamento delle proteine agli istoni

Le proteine dette *writer* sono in grado, se opportunamente reclutate sulla cromatina, di modificare covalentemente gli istoni. L'influenza che tali modificazioni

hanno sull'attività trascrizionale dipende però dai complessi proteici che sono in grado di decifrare il codice che ne deriva; quest'ultima tipologia di proteine appartiene alla cosiddetta classe dei *reader*. I *reader*, una volta legati alla cromatina, sono in grado di interagire con altri *writer* o *reader*, così come con un'altra categoria di regolatori epigenetici, i rimodellatori ATP-dipendenti, che aumentano l'accessibilità del DNA nucleosomale; è dall'integrazione di più meccanismi di regolazione che si determina lo stato trascrizionale della cromatina. Il legame agli istoni modificati è mediato da specifici domini conservati e condivisi da differenti classi di regolatori epigenetici (Fig. 18.10).

I cambiamenti della struttura della cromatina – principalmente modificazioni post-traduzionali delle regioni *N*-terminali degli istoni, varianti istoniche, metilazione del DNA sui residui di citosina – consentono di spiegare, almeno in parte, i diversi livelli di condensazione all'interno della stessa macromolecola di DNA e in modo speculare il quadro di attività trascrizionale che si delinea all'interno di una cellula.

[18.5.2] Localizzazione delle modificazioni istoniche nel genoma

La cromatina rappresenta una piattaforma in cui il genoma si organizza dinamicamente in risposta a una varietà di segnali endogeni ed esogeni.

Come già accennato, la cromatina è storicamente distinta in eucromatina ed eterocromatina; quest'ultima, a sua volta, può essere facoltativa, caratterizzata da geni che diventano repressi con lo sviluppo, o costitutiva,

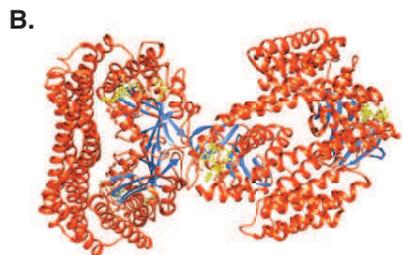
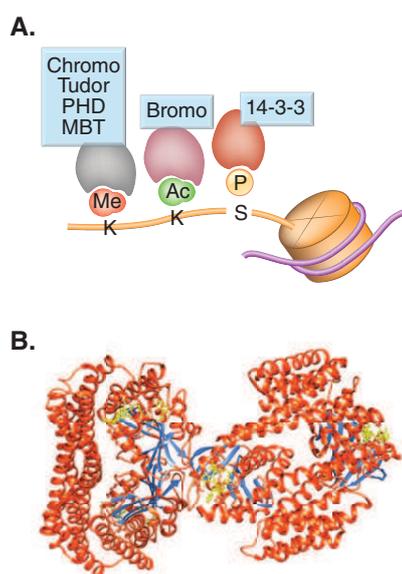


FIGURA 18.10 ► Il reclutamento dei regolatori della cromatina sugli istoni avviene grazie a domini conservati. **(A)** Le proteine si associano a specifiche modificazioni istoniche grazie alla presenza di domini proteici molto conservati. Le lisine (K) metilate sono riconosciute da domini Chromo, Tudor, PHD, MBT; le lisine (K) acetilate da domini Bromo; le serine (S) fosforilate da domini 14-3-3. **(B)** Struttura cristallografica del complesso 14-3-3 zeta:serotonina *N*-acetiltransferasi.

comprendente regioni, quali i centromeri e i telomeri, costitutivamente repressi.

Sia l'eterocromatina che l'eucromatina sono arricchite e/o impoverite in modo specifico di particolari modificazioni istoniche; esistono delle regioni che demarcano i confini tra un dominio e l'altro che prendono il nome di elementi *boundary*, legate da particolari proteine, tra cui CTCF (fattore che lega le sequenze CCCTC), con un ruolo nel definire i diversi "tipi" di cromatina.

18.5.2.1 Eterocromatina facoltativa e costitutiva

L'eterocromatina facoltativa è caratterizzata da geni che sono espressi durante lo sviluppo e il differenziamento e che diventano repressi con la progressiva specificazione di una cellula. Tra i regolatori epigenetici responsabili dello stabilirsi di questo genere di eterocromatina vi sono le proteine *Polycomb* (PcG).

Un esempio ben conosciuto di eterocromatina facoltativa è fornito dall'inattivazione del cromosoma X nelle femmine di mammifero (vedi BOX 5.8). Il cromosoma X inattivo è riconoscibile per la trimetilazione della lisina 27 dell'istone H3 (H3K27me3), modificazione che viene apportata dal complesso PRC2 (*polycomb repressive complex 2*). Il complesso viene reclutato sul cromosoma X da inattivare grazie a *XIST*, un ncRNA (*non-coding RNA*) che è espresso dal cromosoma X stesso (vedi Par. 18.6). Il complesso PRC2 è costituito da *proteine core* in grado di legare H3K27me3 e da un enzima che media la trimetilazione dei residui circostanti non metilati. In questo modo la modificazione istonica si propaga ai residui adiacenti, stabilendo l'eterocromatinizzazione del cromosoma.

L'eterocromatina costitutiva è invece mantenuta da un altro meccanismo di tipo repressivo, mediato dalla trimetilazione della lisina 9 dell'istone H3 (H3K9me3). La proteina *reader* HP1 (*heterocromatin protein 1*) agisce da mediatore in questo tipo di silenziamento. HP1 riconosce e lega H3K9me3/me2: una volta avvenuto il legame, HP1 dimerizza e recluta a sua volta la metiltransferasi specifica per H3K9, Suv39 (*suppressor of variegation 3-9*), la quale metila residui circostanti, che possono reclutare altre proteine HP1; si genera un *feedback* positivo per cui l'eterocromatinizzazione mediata da queste proteine si diffonde nelle regioni circostanti con H3 non modificati (Fig. 18.11).

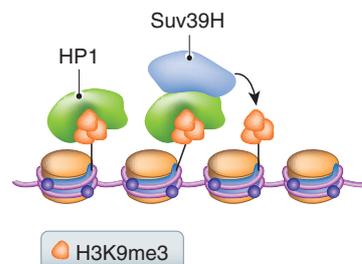


FIGURA 18.11 ► HP1 media la diffusione della trimetilazione di H3K9. HP1 riconosce e si lega a H3K9me3, quindi recluta l'enzima Suv39H, che media la trimetilazione delle lisine 9 degli istoni H3 adiacenti non metilati. Tale meccanismo favorisce la diffusione di questa modificazione nelle regioni adiacenti e, di conseguenza, l'eterocromatinizzazione della cromatina.

Genetica

Accedi all'ebook e ai contenuti digitali > Espandi le tue risorse > con un libro che **non pesa** e si **adatta** alle dimensioni del tuo **lettore**



All'interno del volume il **codice personale** e le istruzioni per accedere alla versione **ebook** del testo e agli ulteriori servizi. L'accesso alle risorse digitali è **gratuito** ma limitato a **18 mesi dalla attivazione del servizio**.

