

Soluzioni del Capitolo 12

- 12.1** a. 4; b. 10; c. 7; d. 8; e. 2; f. 3; g. 5; h. 1; i. 6; j. 9.
- 12.2** Alcune proteine non istoniche hanno un ruolo puramente strutturale (per esempio, le proteine che formano lo scheletro), altre sono attive durante la replicazione (DNA polimerasi) e nel processo di ricombinazione (proteine del complesso sinaptonemale). Altre ancora sono necessarie per la segregazione dei cromosomi (proteine del cinetocore). La classe di proteine non istoniche più abbondante è quella che promuove e regola la trascrizione e il processamento dell'RNA.
- 12.3** Interfase, fattore di contrazione = 40; metafase, fattore di contrazione 10 000. È probabile che la compattazione aggiuntiva durante la metafase sia necessaria per consentire ai cromosomi di comportarsi come unità indipendenti durante la divisione cellulare impedendo l'intrecciarsi del DNA di cromosomi diversi. Al contrario, i cromosomi devono essere meno compattati durante l'interfase per consentire la trascrizione dei geni. (Durante la fase M si verifica pochissima trascrizione genica.)
- 12.4** Gli istoni del core (H2A, H2B, H3 e H4) formano l'unità di impacchettamento più elementare del DNA, il nucleosoma. Il core è un ottamero formato da due molecole di ciascun istone del core. Le 160 coppie di basi di DNA compiono quasi due giri attorno al core istonico, che per questo risulta essere 7 volte più compatto rispetto al DNA nudo. Circa 40 bp formano un linker che congiunge un nucleosoma al successivo. L'istone H1 si trova fuori dal core, sembra essere associato con il DNA nelle regioni in cui questo entra ed esce dalla struttura del core del nucleosoma. La rimozione dell'istone H1 causa uno svolgimento del DNA del nucleosoma stesso, ma la struttura dei nucleosomi rimane intatta con 140 bp di DNA ancora avvolto attorno a ogni core istonico.
- H1 è coinvolto nel successivo livello di compattazione, formando una fibra di 300 Å.
- 12.5** a. Un genoma aploide umano è costituito da 3×10^9 bp. Se ogni nucleosoma ha una spaziatura di 200 bp, allora $3 \times 10^9 \text{ bp} / 2 \times 10^2 \text{ bp} = 1,5 \times 10^7$ nucleosomi per coprire il DNA di un genoma umano aploide. (Sebbene corretta matematicamente, questa stima è in realtà in eccesso perché non tutte le parti del genoma sono contenute uniformemente nei nucleosomi più densamente impacchettati.) Il genoma umano è diploide e dopo la fase S ogni cellula possiede 2 cromatidi per ciascun cromosoma, quindi $4 (1,5 \times 10^7 \text{ nucleosomi}) = 6 \times 10^7$ nucleosomi necessari per cellula. Infine, ogni nucleosoma contiene due molecole di H2A, quindi subito dopo il completamento della fase S le cellule avrebbero bisogno di circa $1,2 \times 10^8$ molecole di H2A.
- b. Le proteine istoniche devono essere sintetizzate durante o subito dopo la fase S, quando i cromosomi si sono appena replicati. Durante questo lasso di tempo, ci sarebbe un nuovo DNA nudo che richiede nucleosomi.
- c. Ogni cellula deve produrre circa 6×10^7 molecole di ciascun tipo di istone durante la fase S del ciclo cellulare. [La parte (a) sopra ha citato la necessità di $1,2 \times 10^8$ molecole di qualsiasi tipo di istone alla fine della fase S; come si può osservare nella Figura 12.18, solo la metà di queste molecole deve essere sintetizzata a ogni ciclo cellulare perché l'altra metà delle molecole è già presente e viene riciclata.] Nelle cellule umane, la fase S dura generalmente tra 3 e 6 ore, a seconda del tipo di cellula. Questo fatto implica che molte molecole di queste proteine devono essere prodotte in un breve periodo di tempo. Copie multiple dei geni degli istoni vogliono dire più copie che le cellule possono trascrivere contemporaneamente, consentendo una produzione più rapida degli mRNA degli istoni e quindi delle proteine corrispondenti.

12.6 La cromatina è il complesso di DNA e proteine (istoniche e non istoniche) che compongono i cromosomi eucariotici. Il nucleosoma protegge il DNA dalla digestione con enzimi ad attività DNasica come la nucleasi micrococcica, quindi tali enzimi attaccano preferenzialmente il DNA linker (di collegamento) tra i nucleosomi. Pertanto, i pattern nelle corsie A e B riflettono la distribuzione dei nucleosomi nella cromatina: 200 bp è un singolo nucleosoma, 400 bp sono due nucleosomi ecc.

Se il trattamento con nucleasi avviene solo per un breve periodo, si verificherà la digestione del DNA a doppio filamento in alcune regioni del linker ma non in altre, producendo frammenti di cromatina con uno o più nucleosomi come nella corsia A.

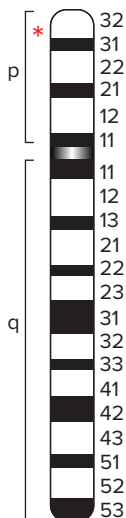
Periodi più lunghi di trattamento con nucleasi provocano una maggiore degradazione: l'enzima attaccherà tutte le regioni linker, in modo che tutta la cromatina verrà ridotta a unità di singoli nucleosomi (corsia B).

Infine, se la cromatina viene trattata con la nucleasi per un tempo sufficientemente lungo, tutto il DNA del linker verrà digerito, lasciando solo il core dei nucleosomi, ciascuno con circa 160 bp di DNA come si vede nella corsia C. Questi core nucleosomali presumibilmente contengono ancora l'istone H1; in caso contrario, il DNA che rimane nel core sarebbe leggermente più corto a ~140 bp (vedi Problema 12.4).

Questi tipi di esperimenti sono stati effettivamente eseguiti negli anni Settanta e hanno fornito un supporto significativo per l'immagine emergente del nucleosoma.

12.7 a. p rappresenta il braccio corto; q rappresenta il braccio lungo.

b. Nel diagramma seguente, il centromero è grigio e * indica la posizione di un gene a 3p32:



12.8 Assumiamo che un'intera banda G debba essere eliminata per rilevare una delezione mediante l'analisi del cariotipo. Quindi la domanda si riduce a: quanti geni ci sono in una banda G? Il numero medio di coppie di basi per banda G è $(3 \times 10^9 \text{ bp/genoma aploide}) / (2000 \text{ bande G/genoma aploide}) = 1,5 \times 10^6 = 1\,500\,000 \text{ bp/banda G}$. Il numero medio di coppie di basi per gene è $(3 \times 10^9 \text{ bp/genoma aploide}) / (28\,000 \text{ geni/genoma aploide}) \approx 107\,000 \text{ bp/gene}$. Pertanto, il numero di geni per banda G è $(1\,500\,000 \text{ bp/banda G}) / (107\,000 \text{ bp/gene}) = 14 \text{ geni/banda G}$. Questo calcolo è ovviamente solo una stima media estremamente approssimativa.

12.9 a. *Drosophila*, etrocromatina costitutiva: DNA centromerico, cromosoma Y; etrocromatina facoltativa: PEV. Specie umana, etrocromatina costitutiva: DNA centromerico, cromosoma Y; etrocromatina facoltativa: X inattivo (corpo di Barr).

12.10 Il risultato implica che la K27 dell'istone H3 sia normalmente modificata da co-attivatori o co-repressori che legano gli enhancer di molti geni diversi. Presumibilmente, la proteina H3 mutante il cui K27 non può essere modificato (H3K27M) a volte sostituisce il normale H3 in questi geni e fa sì che i geni vengano attivati o repressi in modo inappropriato. Ulteriori studi hanno dimostrato che l'H3K27 è normalmente metilato da un co-repressore e il K27 metilato funge da "richiamo" per le proteine che chiudono la struttura della cromatina.

12.11 a. Le mutazioni *Su(var)* diminuiscono la quantità di PEV. In presenza dell'allele mutante *Su(var)*, nell'occhio ci saranno meno macchie bianche e più macchie rosse se confrontato con quello di una mosca omozigote *Su(var)*⁺. La situazione opposta, maggior numero di macchie bianche rispetto a quelle rosse (wild type), si osserva quando una mosca è eterozigote per la mutazione *E(var)*.

b. Il fenotipo prodotto da mutazioni *Su(var)* ed *E(var)* induce a pensare che le proteine codificate da questi geni siano coinvolte nella condensazione della cromatina. Assumendo che le mutazioni siano alleli nulli, i geni *Su(var)*⁺ codificano proteine che costituiscono e assistono la diffusione dell'etrocromatina. I geni *E(var)*⁺ sembrano codificare proteine che restringono la diffusione dell'etrocromatina.

12.12 Nella donna 2, solo il cromosoma X che ha XIC può essere inattivato; il cromosoma X con la delezione di XIC sarà sempre attivo. Tutte le cellule

della donna 2 esprimeranno le proteine $A^S B^S C^F C^S D^F D^S$. (Entrambi gli alleli dei geni autosomici sono espressi perché gli autosomi non sono soggetti a inattivazione.)

Nella donna 3, sarà inattivato molto probabilmente il cromosoma X non traslocato. In caso contrario, verrebbero inattivati molti geni autosomici situati sul cromosoma traslocato contenente XIC, per cui si avrebbe meno prodotto proteico, mentre, al contrario, i geni del cromosoma X che si trovano sul cromosoma traslocato reciproco non saranno inattivati e saranno quindi espressi in maniera eccessiva. Tali cellule avrebbero gravi squilibri nella quantità di molti prodotti genici e probabilmente morirebbero. Per questo motivo, la donna 3 avrà molto probabilmente solo cellule che esprimono le proteine $A^F B^F C^F C^S D^F D^S$. (Se i punti di rottura della traslocazione fossero vicini ai telomeri sia del cromosoma X sia dell'autosoma, le cellule potrebbero tollerare gli squilibri nella quantità di prodotti genici perché in questo modo sarebbero interessate solo poche proteine. In questi casi, la donna 3 potrebbe avere alcune cellule che esprimono A^F , B^F , C^F , C^S , D^F , D^S e altre cellule che esprimono A^S , B^F , B^S , C^F , C^S , D^F .)

12.13 a. Se un feto contenesse un cromosoma 19 in più, possiamo supporre che le cellule fetali produrrebbero il 50% in più di proteina repressore rispetto alle cellule di un feto con il normale numero di due cromosomi 19. Questa quantità di proteina repressore potrebbe impedire la trascrizione di *Xist* da entrambi i cromosomi X, e quindi nessuno dei due X verrebbe inattivato, provocando un sovradosaggio di prodotti genici legati all'X. L'inattivazione del cromosoma X si verifica normalmente durante l'embriogenesi precoce, quindi la mancata formazione di un corpo di Barr sarebbe letale prima che l'embrione possa diventare un feto.

b. Le porzioni extra del cromosoma 19 nei feti abortiti non possono contenere copie funzionali del gene per la proteina repressore *Xist*, poiché ciò comporterebbe letalità prima che la gravidanza fosse riconosciuta. Al contrario, le porzioni del cromosoma 19 mai presenti in nessuno dei feti abortiti potrebbero contenere il gene repressore.

c. Forse il numero superiore di nascite maschili è dovuto all'aborto spontaneo di feti XX i cui genomi hanno una duplicazione di una piccola regione del cromosoma 19 che include il gene repressore. Ci si aspetta che i feti XY con tale duplicazione siano vitali.

12.14 a. Rainbow e CC sono entrambi *Oo*. Le macchie arancioni sono cloni di cellule in cui X^O è diventato il corpo di Barr e le macchie nere sono cloni cellulari in cui è stato inattivato X^o . (Un gene autosomico chiamato *white-spotted*, o anche *piebald* [abbreviato, gene *S*] produce le aree bianche della pelliccia. Un allele dominante di *S* produce la pelliccia bianca [*S* è epistatico su *O* e su *o*], ma negli eterozigoti *Ss*, l'allele *S* dominante ha un'espressività variabile, quindi alcune macchie hanno un colore dettato dagli alleli del gene *O*. Rainbow e CC sono eterozigoti *Ss*.)

b. CC ha solo macchie nere, indicando che, a eccezione di quelle nelle sue regioni bianche, tutti i melanociti del follicolo pilifero di CC (le cellule che producono i pigmenti dei peli) hanno inattivato X^o . Una possibilità è che il nucleo della cellula somatica di Rainbow utilizzato per produrre CC avesse precedentemente inattivato X^o e che l'inattivazione dell'X fosse non casuale perché i cromosomi non erano stati completamente riprogrammati nell'ooocita o nello zigote. In altre parole, non tutti i cambiamenti molecolari associati alla formazione del corpo di Barr erano stati riprogrammati né prima né dopo la fecondazione. Un'altra possibilità è che tutti i precursori dei melanociti abbiano per caso inattivato X^o . Questo secondo scenario sembra improbabile dato che quando vengono prese le decisioni su quale X inattivare, sono già presenti molti precursori dei melanociti.

c. Dato che CC ha solo macchie nere mentre Rainbow ha macchie di entrambi i colori, sembra ragionevole prevedere che un diverso clone di Rainbow possa avere solo macchie arancioni. In alternativa, un clone potrebbe avere macchie nere e arancioni come Rainbow, ma è improbabile che le macchie si trovino nelle stesse posizioni in cui si trovano su Rainbow.

d. CC ha lo stesso genotipo di Rainbow (*Oo*). Supponendo che tutte le cellule somatiche di CC abbiano inattivato X^o , i cloni di CC potrebbero avere macchie nere come CC (se l'inattivazione dell'X non viene riprogrammata) o potrebbero essere calicò come Rainbow (se l'inattivazione dell'X viene riprogrammata e quindi è casuale).

12.15 A 50 nucleotidi/secondo, una molecola di DNA polimerasi (DNAP) potrebbe sintetizzare circa 270 kb in 3 ore. Poiché DNAP può sintetizzare il DNA in entrambe le direzioni a partire da un'origine di replicazione, potrebbero avere fino a 540 kb di DNA tra un'origine e quella adiacente. Pertanto, il numero minimo di origini previsto per

un genoma di 3 miliardi di coppie di basi sarebbe di circa 3×10^9 paia di basi per genoma/ $5,4 \times 10^5$ paia di basi per origine = $0,55 \times 10^4$ origini = 5500 origini di replicazione.

12.16 a. Per replicare il cromosoma più lungo (66 Mb) da un'origine bidirezionale di replicazione situata al centro, dovrebbero essere copiati lungo ciascuna forcella di replicazione 33 Mb in un ciclo di 8 minuti (480 s), quindi $33\,000\,000 \text{ bp} / 480 \text{ s} = 68\,750 \text{ bp/s} \approx 69 \text{ kb/s}$. Pertanto, se fosse utilizzata un'unica origine di replicazione e la replicazione richiedesse tutti gli 8 minuti del ciclo, la velocità di polimerizzazione sarebbe $0,069 \text{ Mb/s}$ o $69\,000 \text{ bp}$ (69 kb) al secondo.

b. Se le origini bidirezionali di replicazione si trovano ogni 7 kb, ognuna dovrebbe replicare 3,5 kb in un ciclo di divisione cellulare di 8 minuti. La velocità di polimerizzazione dovrebbe essere di $3,5 \text{ kb} / 480 \text{ s} = 7,3 \text{ bp/s}$, una velocità molto più ragionevole che è circa 1000 volte più lenta di quella richiesta nella parte (a).

Gli scienziati hanno effettivamente osservato la progressione delle forcelle di replicazione negli embrioni precoci di *Drosophila* e hanno accertato che la più veloce progredisce a circa 50 bp/s. Se tutte le origini di replicazione "scattassero" contemporaneamente e fossero esattamente a 7 kb di distanza e tutte le forcelle viaggiassero alla stessa velocità, le cellule avrebbero bisogno di poco più di 1 minuto per completare la fase S. In realtà, tuttavia, alcune origini sono più distanti e alcune iniziano a replicare in tempi diversi (vedi Figura 12.17), spiegando perché la fase S è invece di circa 8 min.

12.17 a. Il DNA alla coordinata 33 ha iniziato la replicazione prima nella fase S rispetto alla regione alla coordinata 35. Di conseguenza, più cellule nella popolazione S avranno già replicato la regione a 33 rispetto a quella a 35. Le cellule hanno quattro copie di una qualsiasi regione autosomica che abbia già replicato, mentre le cellule in G1 hanno solo due copie di una qualsiasi regione autosomica.

Due possibilità non esclusive potrebbero spiegare le differenze in queste regioni: o la regione vicino a 33 è più vicina a un'origine di replicazione rispetto alla regione vicino a 35, o l'origine di replicazione per il replicone che include 33 si attiva prima del replicone della regione che include 35.

b. Si studiano le regioni corrispondenti ai picchi in queste figure, nelle cui vicinanze ci deve essere almeno un'origine di replicazione. Un problema irrisolto da questi dati è la relazione tra i picchi osservati e i singoli repliconi. È possibile che la

regione tra una depressione e l'altra possa rappresentare un singolo replicone, il che implica che il replicone medio in queste cellule sia 1-2 Mb. Ma è anche possibile che i repliconi siano più piccoli, quindi un singolo picco nei dati potrebbe rappresentare diversi repliconi vicini che si attivano tutti più o meno nello stesso momento della fase S.

c. Una linea orizzontale. Tutte le regioni del campione G2 sarebbero già state replicate, mentre nessuna del campione G1 sarebbe stata replicata. Pertanto, il rapporto dovrebbe essere 2 per ogni coordinata lungo il cromosoma.

d. Il pattern di attivazione delle origini di replicazione è una caratteristica ereditaria comune dei cromosomi umani. Cioè, se un'origine si attiva precocemente in un individuo, è probabile che si attivi precocemente in tutti gli individui.

12.18 a. Ai telomeri dei cromosomi umani si trovano sequenze ripetute 5' TTAGGG 3'.

b. La telomerasi consente di replicare le estremità dei cromosomi; l'enzima da una parte allunga l'estremità 3' utilizzando come stampo l'RNA dell'enzima, dall'altra fornisce il primer che altrimenti mancherebbe per la replicazione del filamento lento, in cui, una volta eliminato il primer al 5', la DNA polimerasi, in assenza di un'estremità 3'OH libera, non avrebbe modo di colmare il gap creatosi. In assenza del primer fornito dalla telomerasi, i cromosomi si accorcerebbero ogni ciclo di divisione cellulare.

Shelterin protegge le estremità libere del cromosoma dalla digestione della nucleasi e dalle fusioni end-to-end. Quando i cromosomi vengono rotti (per esempio, dai raggi X), le estremità rotte che si formano non sono legate da riparo. Di conseguenza, questi frammenti cromosomici spesso si accorciano a causa della digestione della nucleasi e i frammenti rotti possono fondersi tra loro in modo errato (per esempio, collegando erroneamente parti di cromosomi non omologhi).

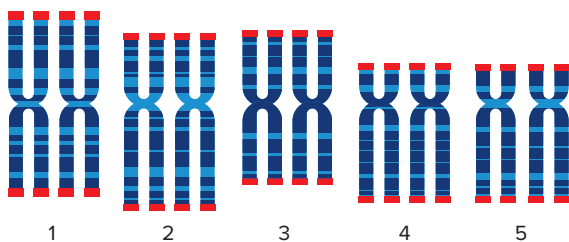
c. Il componente RNA della telomerasi è un RNA non codificante che viene trascritto da un gene; diversi geni codificano per i componenti proteici della telomerasi.

d. La Figura 12.21 mostra entrambe le funzioni della componente RNA della telomerasi. Attraverso l'accoppiamento di basi complementari con le estremità 3' a filamento singolo ai telomeri presenti dopo la replicazione del DNA, l'RNA della telomerasi funge da modello per l'estensione delle estremità 3' dei telomeri. Inoltre, l'RNA della telomerasi funge da primer per riempire lo spazio vuoto sul filamento opposto.

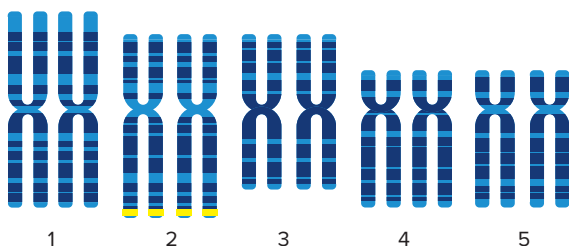
12.19 a. In assenza di telomerasi, i telomeri diventeranno più corti a ogni divisione cellulare. Alla fine, quando i geni essenziali vengono intaccati, le cellule muoiono. L'assenza di telomerasi potrebbe avere un effetto importante sulla disponibilità di cellule staminali che proliferano per rinnovare i tessuti. Gli animali invecchieranno prematuramente se la disponibilità di cellule staminali viene interrotta. Se l'espressione della telomerasi venisse riattivata, l'accorciamento dei telomeri si arresterebbe.

b. La maggior parte delle cellule somatiche dovrebbe avere una vita limitata. Le cellule somatiche che non sono cellule staminali e non sono destinate a proliferare indefinitamente non esprimono la telomerasi. Quando le cellule somatiche esprimono in modo inappropriato la telomerasi, potrebbero continuare a dividersi quando non dovrebbero. Si vedrà nel Capitolo 23 che l'immortalità e l'iperproliferazione sono due aspetti del fenotipo delle cellule tumorali. Pertanto, gli individui le cui cellule somatiche sovraesprimono la telomerasi potrebbero sviluppare tumori.

12.20 a. La sonda 5' CCCTAA 3' si ibriderà ai telomeri, come mostrato in rosso nell'idiogramma sottostante. Poiché i telomeri di tutti i cromosomi hanno la stessa sequenza ripetuta, con la sonda tutti i telomeri appariranno marcati.



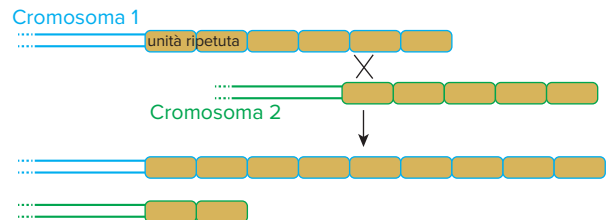
b. Per marcare un'estremità di un particolare cromosoma, dovrebbe essere utilizzata una sonda corrispondente a una sequenza genica univoca. Se quel gene è vicino al telomero del braccio q del cromosoma 2, per esempio, l'idiogramma sarebbe simile a quello sottostante (il segnale di ibridazione è giallo).



12.21 In nessuno dei casi (a-d) ci si aspetterebbe che i cromosomi abbiano esattamente lo stesso numero

di sequenze ripetute telomeriche. Il motivo è che l'enzima telomerasi non copia le ripetizioni che sono già presenti, ma aggiunge unità ripetute. L'enzima può aggiungere quantità diverse di unità ripetitive a ciascun telomero, a seconda del numero di fasi di traslocazione che subisce (vedi Figura 12.21).

12.22 a. I telomeri possono allungarsi per mezzo di crossing-over ineguale tra le ripetizioni dei telomeri (rettangoli giallo scuro nel diagramma che segue). L'appaiamento sfalsato è possibile perché i telomeri contengono unità identiche ripetute in tandem.

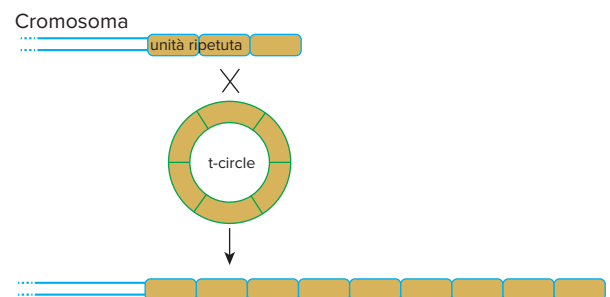


Un'altra caratteristica dei telomeri è che avranno sporgenze a filamento singolo al 3' dell'elica parentale, quando i primer di RNA della telomerasi vengono rimossi dall'elica neosintetizzata (non mostrati nel diagramma sopra; vedi Figure 12.21 e 12.22). Questi filamenti singoli possono invadere altri cromosomi con sequenze omologhe, favorendo il crossing-over.

b. Questo crossing-over potrebbe in teoria verificarsi tra tutti i telomeri, perché hanno le stesse ripetizioni telomeriche.

Si potrebbe evidenziare il crossing-over tra telomeri non omologhi aggiungendo una sequenza di DNA sintetico a un telomero di un cromosoma e quindi trovare cellule in cui quella sequenza di DNA sintetico si è spostata su un cromosoma non omologo, come rilevato dall'ibridazione *in situ*.

c. Il crossing-over tra un telomero e un *t-circle* aumenterebbe la lunghezza del telomero di un valore equivalente alla dimensione del *t-circle*.



12.23 a. Le regioni centromeriche dei cromosomi umani sono costituite principalmente da sequenze

DNA satellite, detto alfoide, costituito da unità di 171 bp ripetute anche milioni di volte a ogni centromero.

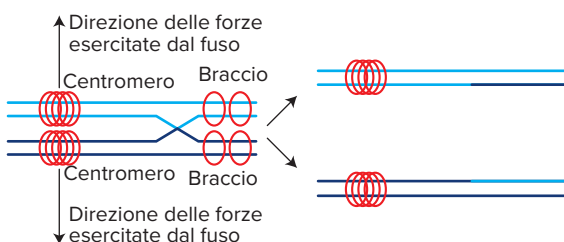
b. La coesina tiene uniti i cromatidi fratelli fino all'anafase, quando viene degradata e i cromatidi fratelli vengono rilasciati. Il cinetocore attacca i cromatidi alle fibre del fuso provenienti dai poli e contiene proteine motorie che muovono i cromosomi, una volta separati, verso i poli opposti.

12.24 Questa regione di circa 3 Mb è il centromero del cromosoma 8. L'eterocromatina centromerica è piena di elementi trasponibili, DNA satellite e altre sequenze ripetitive che non possono essere assemblate dai normali programmi di analisi del genoma. L'assenza di dati nelle regioni centromeriche è quindi una caratteristica comune di molti esperimenti di genomica.

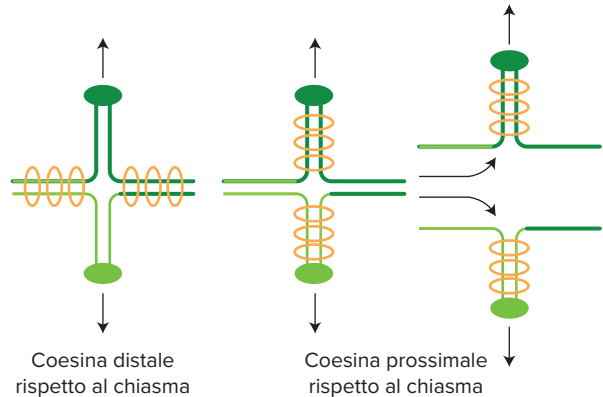
12.25 Shugoshin previene la scissione di Rec8 e, nel contesto della mitosi, ciò significherebbe che i cromatidi fratelli non si separerebbero e non si muoverebbero ai poli opposti (nelle cellule che esprimono sia Rec8 sia Shugoshin). L'effetto sarebbe l'aneuploidia; entrambi i cromatidi di ciascun omologo finirebbero casualmente in una cellula figlia o nell'altra. Come si vedrà nel Capitolo 14, le cellule con assetti incompleti di cromosomi sono dette aneuploidi.

12.26 a. I cromosomi mostrati a sinistra nella figura sono in profase/metafase della meiosi I; sono in fase di crossing-over. A destra, sono in anafase della meiosi I. Le linee azzurre sono i cromatidi fratelli di un omologo e le linee blu scuro sono i cromatidi fratelli dell'altro omologo.

b. Nel diagramma che segue, i complessi delle coesine sono indicati come ovali rossi. Lungo i bracci, per semplicità, gli unici complessi mostrati sono quelli distali al sito di ricombinazione; cioè, più lontano dal centromero rispetto al sito di ricombinazione. (I complessi delle coesine si trovano in realtà lungo tutti i bracci, non solo distalmente al sito di ricombinazione.) Le coesine tengono insieme i cromatidi fratelli formando un "cestino" di proteine che circonda entrambe le doppie eliche. (Vedi Figura 12.26.)



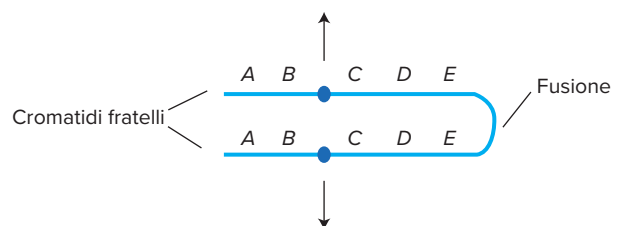
c. Il bivalente a sinistra nel diagramma è tenuto insieme da complessi delle coesine situati distalmente al sito di ricombinazione. Per visualizzare questo fatto, si veda la figura qui sotto. Le coesine distali al sito di ricombinazione (cioè al chiasma) tengono insieme i cromosomi omologhi che compongono il bivalente, mentre quelle prossimali non possono farlo.



d. Shugoshin protegge i complessi delle coesine al centromero (ma non quelli lungo i bracci del cromosoma) dalla scissione da parte dell'enzima separasi durante la meiosi I. Si noti che i complessi delle coesine al centromero devono rimanere intatti durante la meiosi I perché entrambi i cromatidi fratelli devono muoversi come un'unità durante questo tipo di divisione; è solo a partire dall'anafase della meiosi II che la coesione centromerica può essere persa. Al contrario, i complessi di coesione lungo i bracci (in particolare quelli distali ai chiasmi) devono essere degradati all'inizio dell'anafase della meiosi I in modo che i cromosomi omologhi possano segregare ai poli opposti del fuso.

12.27 a. Le estremità dei cromosomi normalmente non si fondono insieme perché sono protette dalle proteine che formano il complesso shelterin (vedi Figura 12.22).

b. Schema della struttura di un ponte cromosomico e delle forze esercitate su di esso durante l'anafase mitotica:



c. Il cromosoma di fusione mostrato qui sopra nella parte (b) si comporta come un ponte durante

te la mitosi perché i centromeri sono tirati ai poli opposti. (Si ricordi che questi centromeri sono quelli dei cromatidi fratelli che devono essere tirati ai poli opposti durante l'anafase mitotica.)

d. È probabile che il ponte si rompa durante l'anafase, il che significa che ogni cellula figlia avrà un cromosoma rotto. Questa rottura potrebbe verificarsi ovunque nella regione "stirata" tra i due centromeri. Durante la successiva mitosi, i cromatidi fratelli dei cromosomi rotti si fonderanno e formeranno di nuovo un ponte. È da notare che il fuso mitotico possa esercitare una forza sufficiente per rompere i legami covalenti fosfodiesterici.

12.28 a. L'apertura della cromatina in corrispondenza dei promotori per consentire la trascrizione comporta l'acetilazione degli istoni, in particolare H3 e H4; la chiusura della cromatina per silenziare la trascrizione o formare l'eterocromatina (inclusa la formazione del corpo di Barr) comporta la metilazione e la deacetilazione degli istoni.

b. Gli istoni varianti sono necessari al centromero per l'assemblaggio dei cinetocori.

12.29 a. CdLS mostra eterogeneità di locus; la mutazione in uno qualsiasi dei cinque diversi geni può causare la malattia. Uno o più geni sono legati all'X; gli altri sono autosomici.

b. Tutti e cinque i geni associati a CdLS sono aploinsufficienti; la quantità di proteine prodotte da un allele non è sufficiente.

c. È improbabile che le persone con CdLS abbiano figli. Questa infertilità potrebbe riflettere gli effetti della malattia sull'espressione genica nelle cellule somatiche (anomalie morfologiche e comportamentali) e sulle cellule della linea germinale (segregazione cromosomica alterata che produce gameti con il numero non bilanciato di cromosomi).

12.30 a. La corretta segregazione dei cromosomi mitotici verrebbe compromessa da mutazioni nei geni che codificano (I) proteine del complesso delle coesine, (II) separasi, (III) proteine del cinetocore, comprese le proteine motorie che aiutano i cromosomi a muoversi sull'apparato del fuso, (IV) componenti del checkpoint del fuso che fa innescare l'inizio dell'anafase solo se si sono stabilite le corrette connessioni tra le fibre del fuso e i cinetocori. (V) Anche le mutazioni che alterano la sequenza di DNA comprendente un centromero potrebbero avere effetti simili nel compromettere la segregazione dei cromosomi mitotici.

b. Per cercare le mutazioni che influenzano la segregazione dei cromosomi mitotici, sono neces-

sarie cellule contenenti uno YAC con un marcatore che conferisce un fenotipo visibile, come il colore della colonia. Si trattano queste cellule di lievito con un mutageno e si ricercano le colonie in cui alcune cellule hanno perso lo YAC a causa della errata segregazione mitotica. Si potrebbe anche provare a mutare il DNA centromerico di questo YAC usando la mutagenesi *in vitro*. Se il centromero fosse colpito, lo YAC non segregherebbe correttamente e andrebbe perso. Anche qui, questa perdita potrebbe essere monitorata se lo YAC portasse un marcatore genetico che risultasse in un fenotipo visibile, come il colore della colonia.

12.31 a. Un plasmide contenente solo il gene *URA3*⁺ deve integrarsi nel cromosoma per essere replicato e mantenuto perché non ha origine di replicazione.

b. Un plasmide *URA3*⁺, ARS può essere mantenuto come plasmide o può integrarsi nel cromosoma. Se rimane come plasmide, non sarà molto stabile quando non viene più applicata la selezione per *URA3*⁺; poiché manca di un centromero, il plasmide verrebbe perso da molte delle cellule figlie durante i successivi cicli di divisione mitotica.

c. Un plasmide *URA3*⁺, ARS, CEN potrebbe essere mantenuto solo come plasmide separato nella cellula. Se si integrasse nel cromosoma, ci sarebbero due centromeri su quel cromosoma e durante la mitosi il cromosoma si romperebbe. Il plasmide sarebbe stabile da una generazione all'altra senza selezione perché la sequenza centromerica dirige la sua segregazione.

d. Oltre alle sequenze ARS e CEN, un cromosoma artificiale lineare richiede i telomeri. Inoltre, come spiegato nel testo, un cromosoma di lievito artificiale deve essere lungo circa 100 kb di DNA per separarsi con grande precisione. I ricercatori non capiscono ancora il motivo di quest'ultimo requisito.

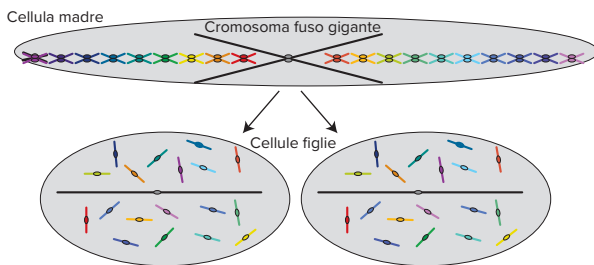
12.32 I frammenti subclonati che contengono il DNA centromerico sono quelli che mostrano un'alta percentuale di colonie *Trp*⁺ dopo 20 generazioni senza selezione per il plasmide. Questi sottocloni includono i frammenti *Bam*HI da 5,5 kb, *Bam*HI-*Hind*III da 2,0 kb e *Sau*3A da 0,6 kb. Poiché il più piccolo di questi frammenti ha un'elevata stabilità mitotica e le sue estremità sono entro i confini degli altri frammenti, la sequenza centromerica deve essere contenuta all'interno del frammento *Sau*3A da 0,6 kb.

12.33 Il lievito che porta il cromosoma SynIII verrebbe trasformato con un plasmide che esprime la

ricombinasi *Cre*. Dopo aver fatto crescere il lievito per un po' di tempo, le cellule sopravvissute sarebbero state piastrate per recuperare le singole colonie, i cui genomi sarebbero stati saggiati per le delezioni indotte da *Cre/loxP*. Poiché le colonie sono state selezionate per la vitalità, mancheranno solo dei geni e delle combinazioni di geni che sono superflui per la vitalità in laboratorio. In questo modo, i ricercatori possono vedere le diverse combinazioni di geni che possono essere delete all'interno dello stesso genoma.

Per determinare quali geni aggiuntivi (se presenti) possono essere eliminati, le singole colonie con diverse delezioni recuperate dal primo round di espressione di *Cre* possono essere utilizzate per ripetere l'esperimento: crescita con espressione di *Cre* seguita da recupero delle colonie sopravvissute e analisi del genoma. Per determinare la struttura di uno o più genomi minimi, gli scienziati possono sottoporre ogni ceppo di delezione iniziale a cicli di delezioni indotte da *Cre/loxP* fino a quando è impossibile recuperare colonie con ulteriori delezioni.

12.34 a. Diagramma della mitosi in una cellula di lievito eterozigote per un singolo cromosoma gigante e un normale complemento di 16 cromosomi:



b. Affinché una spora di lievito sia vitale, deve essere euploide, cioè deve avere un assetto completo di cromosomi. Si noti che poiché la meiosi in un diploide produrrebbe una progenie aploide, una spora priva anche di un singolo cromosoma di lievito renderebbe una cellula non vitale, senza alcuna copia di decine o addirittura centinaia di geni.

c. Poiché il singolo cromosoma gigante è stato creato dalla fusione estremità con estremità di ciascuno dei 16 cromosomi, ciascuno dei 16 omologhi normali può appaiarsi con il cromosoma fuso. In altre parole, tutti i cromosomi si "appaiano" insieme.

d. Potrebbe verificarsi un crossing-over tra il singolo cromosoma gigante e ciascuno dei 16 cromosomi normali "appaiati" con esso.

e. I crossing-over tra i 16 cromosomi normali e l'unico cromosoma fuso gigante produrranno un gran pasticcio: cromosomi con più centromeri e frammenti cromosomici senza centromeri. Eventuali spore risultanti sarebbero aneuploidi e non vitali. Un esempio semplificato di cosa accadrebbe se solo due dei cromosomi normali (anziché tutti e 16) si ricombinassero con un cromatide (anziché entrambi) del cromosoma gigante è illustrato di seguito. Si può osservare che in realtà il problema è notevolmente amplificato dal fatto che, anche in una singola meiosi, 16 cromosomi normali sono in grado di ricombinare con il cromosoma fuso gigante.

