

## Keywords:

*dna, rna, genetica*

## ARTICOLO

Info Autore :

<sup>1</sup> Già professore associato in chimica clinica e biologia molecolare clinica  
Sapienza - Università di RomaMario Pezzella <sup>1</sup>

## NON SOLO DNA...

Nel 1953 James Watson e Francis Crick scoprirono nelle cellule eucariote la sua struttura e il meccanismo di replicazione del DNA.

La molecola, depositaria dell'informazione genetica codificata è costituita da due filamenti di nucleotidi legati fra loro ognuno dei quali composto da desossiribosio, un gruppo fosforico ed una delle quattro basi quali adenina (A) e guanina (G) appartenenti alla classe delle purine, timina(T) e citosina (C) alla classe delle pirimidine. In particolare adenina e timina interagiscono tra loro per mezzo di due legami idrogeno, mentre guanina e citosina per mezzo di tre legami idrogeno. Ogni base è legata con legame idrogeno ad una base della catena opposta. L'adenina può formare legami idrogeno solo con la timina e la guanina solo con la citosina. Le due catene appaiate sono complementari la sequenza di una catena determina la sequenza dell'altra, avvolte intorno allo stesso asse, in modo da formare una doppia elica.

Il codice genetico consiste di tre codoni, costituiti dalla sequenza di tre nucleotidi presenti sull'mRNA, ognuno associato ad uno particolare amminoacido dei 20 esistenti. Ad ogni tripletta corrisponde un solo specifico amminoacido. Le sequenze sono altamente variabili e non esistono due individui con la stessa identica sequenza. Utilizzando gruppi di tre lettere si possono avere fino a 64 combinazioni in grado di codificare i venti diversi amminoacidi esistenti. Poiché esistono 64 triplette possibili e solo 20 amminoacidi, il codice genetico è detto ridondante, alcuni amminoacidi possono infatti essere codificati da più triplette diverse ma ad ogni tripletta corrisponde un solo amminoacido.

Esistono infine tre triplette che non codificano alcun

amminoacido, ma rappresentano codoni di stop ed indicano il punto in cui, all'interno del gene, termina la sequenza che codifica la proteina corrispondente.

La scoperta dell'RNA (acido ribonucleico) risale all'inizio del 1900. Verso la metà del secolo apparve chiaro che l'RNA era diverso dal DNA per struttura e funzione. Le prime molecole di RNA ad essere scoperte sono state l'RNA messaggero (mRNA), l'RNA di trasferimento (tRNA) e l'RNA ribosomiale (rRNA) coinvolte nella sintesi proteica.

Negli ultimi anni è stato identificato un gran numero di molecole di RNA aggiuntive non codificanti non coinvolte nella sintesi proteica ma nella regolazione dell'espressione genica.

L'RNA è una catena composta da nucleotidi la cui struttura chimica differisce da quella del DNA in tre modi fondamentali.

- In primo luogo, lo zucchero è un ribosio, mentre nel DNA è un desossiribosio.
- In secondo luogo, nell'RNA le basi nucleotidiche sono A, G, C e U (uracile) invece di A, G, C e T. U e T hanno proprietà di accoppiamento di basi simili e quindi le basi dell'uracile si accoppiano con l'adenina.
- In terzo luogo, l'RNA è una molecola a singolo filamento, che può in talune situazioni piegarsi per formare una struttura secondaria bidimensionale a forma di ansa a forcina, dovuta all'accoppiamento di basi distanti l'una dall'altra 5-10 nucleotidi o a stelo in seguito all'appaiamento da un minimo di 50 fino ad alcune centinaia di nucleotidi tra regioni complementari. All'interno della stessa molecola, per ulteriori piegamenti, possono formarsi complesse strutture terziarie tridimensionali acquisendo una varietà di conformazioni che rendono la molecola capace di svolgere un'ampia gamma di funzioni reagendo oltre che con se stessa con altri RNA, con il DNA e con le proteine.

Negli eucarioti i geni non consistono in tratti contigui, ma contengono sequenze di DNA non codificante denominate introni mentre le informazioni utili alla sintesi proteica sono contenute in sequenze chiamate esoni. Durante la formazione della maggior parte delle molecole di mRNA alcuni domini possono catalizzare il processo di taglio e saldatura denominato splicing dell'RNA scoperto da un gruppo di ricercatori, diretti da Philip Sharp e Richard Roberts vincitori del premio Nobel per la medicina nel 1993 per i loro studi sullo splicing.

E' stato rilevato che una sequenza interna del filamento di RNA, chiamata introne non contenente sequenze con informazioni utili alla sintesi proteica, viene rimossa e le due catene risultanti, gli esoni, vengono saldate insieme in modo di avere un filamento continuo di mRNA contenente tutte le informazioni necessarie per la sintesi proteica.

## RNA NELLA SINTESI PROTEICA

Le proteine sono sintetizzate nella cellula mediante un processo in due fasi. Nella prima fase il gene che codifica per la proteina da produrre viene trascritto in mRNA e successivamente tradotto in una o più proteine. L'mRNA viene prodotto nel nucleo della cellula dall'enzima RNA polimerasi II, utilizzando come stampo un filamento della doppia elica del DNA. L'mRNA trascritto porta la sequenza codificante per dirigere la sintesi proteica.

La trascrizione viene avviata in un sito specifico del DNA chiamato promotore, solitamente situato a 25-35 coppie di basi di distanza a monte del punto di inizio. La sequenza del promotore definita negli eucarioti TATA box, riconosciuta da una proteina chiamata Transcription Factor IID (TF IID), definisce il punto di inizio e la direzione della trascrizione.

Gli organismi eucarioti, possiedono 3 diverse classi di RNA polimerasi che differiscono sia per la struttura che per la funzione dell'RNA neosintetizzato: l'RNA polimerasi I presiede alla sintesi degli RNA ribosomiali, l'RNA polimerasi II catalizza la sintesi degli RNA messaggeri e l'RNA polimerasi III catalizza la sintesi degli RNA di trasferimento e dei piccoli RNA-ribosomiali.

L'enzima RNA polimerasi ha il compito di svolgere i due filamenti di DNA e di usarne uno come stampo per trascrivere le informazioni genetiche su un nuovo filamento di RNA.

Una volta che il Transcription Factor IID si lega, anche l'RNA polimerasi II e altre proteine si combinano per iniziare la sintesi del trascritto dell'mRNA. L'RNA polimerasi II si muove lungo lo stampo DNA, aggiungendo basi complementari.

La trascrizione termina quando la RNA polimerasi II incontra un codone di stop, una tripletta di basi che non codifica per alcun amminoacido.

Allo scopo di impedire la degradazione dell'mRNA il prodotto della trascrizione viene ricoperto in 5' dall'aggiunta di un nucleotide di guanina ed in 3' da una coda poli-A di circa 250 nucleotidi di adenina che, fungendo da cappuccio e coda, consentono di passare indenni dal nucleo al citoplasma.

Nella seconda fase, chiamata traduzione, i ribosomi, composti da RNA e proteine, legano gli amminoacidi tra loro formando le proteine. L'mRNA viene quindi decodificato per produrre una specifica proteina. Le informazioni contenute nell'mRNA vengono interpretate dall'RNA di trasporto (tRNA) in quanto gli amminoacidi specifici vengono portati dal tRNA ai ribosomi complessi macromolecolari responsabili della sintesi proteica. Man mano che vengono trasportati in sequenza dal tRNA gli amminoacidi vengono uniti mediante legame chimico peptidico tra un gruppo carbossilico ed uno amminico con eliminazione di una molecola d'acqua per formare una proteina. Questi contengono una sequenza di tre nucleotidi che è complementare al codone sull'mRNA e trasporta un amminoacido che corrisponde a quella sequenza.

All'inizio della traduzione, un tRNA si lega all'mRNA nel codone di inizio AUG che determina l'inizio della Sintesi Proteica. Questo è seguito dal legame di un secondo tRNA che corrisponde al codone dell'mRNA adiacente. I due amminoacidi vicini legati ai tRNA sono uniti tra loro da un legame peptidico. Una volta formato il legame peptidico, il primo tRNA si stacca lasciando dietro di sé il suo amminoacido. Pertanto la sequenza di mRNA viene tradotta in una catena di amminoacidi legati da legami peptidici. La traduzione termina quando il ribosoma incontra un codone di stop (UAG, UAA E UGA) che codifica la fine della sintesi proteica.

## RNA REGOLATORI

Negli ultimi vent'anni è diventato evidente che gli RNA sono coinvolti oltre che nel trasporto degli amminoacidi ai ribosomi, influenzando molti normali processi cellulari e patologici, anche nella regolazione dell'espressione genica mediante il processo di interferenza definito RNAi (RNA interference). È stato scoperto che un breve RNA a doppio filamento, complementare a una specifica sequenza di mRNA, si lega ad esso impedendo di produrre una proteina per cui il gene corrispondente viene "silenziato".

L'attività di RNAi nel 1998 è stata scoperta da due ricercatori americani, Andrew Zachary Fire e Craig Cameron Mello PhD, presso il Carnegie Institution di Washington, che nel tentativo di manipolare l'espressione di geni nel *Caenorhabditis elegans*, verme nematode fasmidario, lungo circa 1 mm, che vive nel suolo, in regioni temperate, hanno scoperto che l'iniezione di RNA a doppio filamento silenziava l'espressione del gene bersaglio in modo molto più efficace rispetto all'aggiunta di RNA a filamento singolo solitamente studiato.

Nel 2006 Fire e Mello hanno vinto il Premio Nobel per la Medicina e Fisiologia per i loro lavori nel campo della "RNA interference" che rappresenta un approccio completamente nuovo alla scoperta e allo sviluppo di farmaci. L'RNAi è un processo naturale nelle cellule eucariote ed è mediata da piccole molecole di RNA (miRNA) interferenti che sono in grado di riconoscere tratti di mRNA relativi al gene bersaglio.

La formazione del tratto di RNA a doppio filamento si associa ad un complesso enzimatico denominato Risc (RNA induced silencing) in grado di degradare ed inattivare il segmento di RNA bersaglio impedendo la relativa sintesi a livello dei ribosomi.

Le conoscenze scientifiche acquisite sulla RNAi hanno portato alla produzione di una classe innovativa di farmaci. È stato quindi possibile selezionare sequenze complementari all'mRNA target silenziando l'RNA messaggero (mRNA), il precursore genetico, che codifica per le proteine coinvolte nella patogenesi, bloccandone la sintesi. L'RNAi è stato ampiamente studiato all'interno di

diversi organismi tra cui il lievito, il moscerino della frutta, le piante e l'uomo.

Al momento sono state identificate tre classi di RNAi come regolatori dell'espressione genica.

La prima classe è costituita da miRNA trascritti da diversi loci nel genoma umano e prodotti come lunghi RNA che si piegano mediante l'accoppiamento di basi tra regioni complementari all'interno della stessa molecola per formare una struttura a doppia elica (dsRNA, double-stranded RNA) che innesca il processo di degradazione di RNA bersaglio contenente sequenze complementari al dsRNA.

Sono stati identificati circa 1.000 geni che codificano per i miRNA nell'uomo, regolando diversi processi biologici la cui disfunzione è associata a numerose malattie tra cui tumori, malattie cardiache e disturbi immunologici.

RNAi è un meccanismo complesso in cui intervengono enzimi cellulari attraverso cui molecole di RNA a doppio filamento (dsRNA, double-stranded RNA) innescano un processo di degradazione di RNA bersaglio contenenti sequenze complementari e conseguente inibizione del processo di traduzione.

Nella fase iniziale lunghe molecole di RNA a doppio filamento (dsRNA) sono digerite e tagliate dall'enzima DICER in frammenti siRNA (small interfering RNA) di minore lunghezza, di circa 21 – 35 nucleotidi.

Dei due filamenti siRNA uno, senso, viene separato, scartato e degradato mentre l'altro filamento antisense viene legato al componente multiproteico chiamato RISC (RNA induced silencing complex, complesso silenziatore indotto dall'RNA) che dirige il filamento RNA a legarsi al suo mRNA complementare.

Successivamente un altro enzima, chiamato Argonaute, un componente del RISC, responsabile della degradazione degli RNA, seleziona l'RNA bersaglio mediante formazione di legami idrogeno fra il siRNA guida e sequenze complementari presenti nell'RNA bersaglio. Una volta riconosciuto l'RNA bersaglio, la proteina Argonaute/Slicer lo taglia idrolizzando un singolo legame fosfodiesterico e producendo due frammenti che vengono poi digeriti da ribonucleasi citoplasmatiche.

La loro degradazione ha come conseguenza l'inibizione della traduzione del gene per cui la proteina codificata da tale mRNA non viene prodotta.

L'RNAi è un metodo efficace per inibire l'espressione dei geni in organismi che, come i Mammiferi, sono difficili da manipolare geneticamente. Attualmente le funzioni di uno specifico gene vengono studiate seguendo il percorso dell'RNAi mediante progettazione e produzione di molecole siRNA sintetiche con una sequenza complementare al gene in studio.

L'RNA a doppio filamento viene introdotte nelle cellule per abbattere temporaneamente l'espressione di un determinato gene di cui risulta possibile identificare la funzione dalla riduzione degli effetti fenotipici della sua espressione.

Gli siRNA possono essere progettati e prodotti sinteticamente per silenziare l'espressione di un gene impedendo la produzione della proteina che guida la malattia. Attualmente la terapia con siRNA è in fase di sperimentazione in una serie di patologie tra cui tumori, malattie del fegato e infezioni virali.

La possibilità di dirigere siRNA alle cellule specifiche di cui è richiesto il silenziamento genico rappresenta una delle principali sfide per il suo uso.

Da quando è stato scoperto il meccanismo di interferenza dell'RNA (RNAi), questo è diventato per il suo potenziale terapeutico, un promettente bersaglio farmacologico per il trattamento di diverse malattie. Sono già in atto molti tentativi per tradurre la scienza dell'interferenza dell'RNA in una classe innovativa di medicinali che possono essere identificati utilizzando strumenti bioinformatici per selezionare sequenze complementari all'mRNA target silenziando l'RNA messaggero (mRNA), il precursore genetico, che codifica per le proteine coinvolte nella patogenesi, bloccandone la sintesi.

La RNAi e le terapie basate sulla RNAi stanno attraendo un numero sempre maggiore di industrie farmaceutiche e biotecnologiche. La Alnylam Pharmaceuticals azienda all'avanguardia nella terapia con RNAi, con casa madre negli Stati Uniti, che annovera tra i co-fondatori Phil Sharp e Craig Mello, è particolarmente impegnata in studi sul trattamento dell'amiloidosi ATTR ereditaria (hATTR), grave malattia genetica causata da una mutazione che interessa la funzione della proteina presente nel sangue chiamata transtiretina (TTR) prodotta principalmente nel fegato e codificata dal

gene TTR situato sul cromosoma 18. L'amiloidosi cardiaca da accumulo di transtiretina (ATTR) è una malattia rara caratterizzata da una progressiva infiltrazione del miocardio da parte di depositi di amiloide formati dalla proteina plasmatica transtiretina che determinano insufficienza cardiaca con ricorrenti episodi di scompenso. La terapia con RNAi, di elevato valore clinico, mira a silenziare il gene che codifica per la transtiretina.

Una applicazione che ha raggiunto i trial clinici è stata quella per il trattamento per la degenerazione maculare legata all'età e nell'edema maculare diabetico.

I primi studi prevedevano l'iniezione di siRNA direttamente nell'occhio ma tale tipo di terapia si è dimostrato non possibile in tutte le condizioni per cui le ricerche sono state poi volte alla progettazione di molecole in grado di trasportare siRNA attraverso il flusso sanguigno fino alla cellula malata.

Sono state valutate, a tale scopo, le nano particelle lipidiche con cui siRNA per le loro piccole dimensioni possono essere trasportate attraverso il flusso sanguigno e portate alla cellule malate protette dall'azione degradante degli enzimi.

La Calando Pharmaceuticals (Pasadena, CA 91101 United States) altra azienda di nanobiotecnologie all'avanguardia nelle terapie con RNAi, ha recentemente iniziato ad utilizzare come sistema di somministrazione di farmaci per siRNA l'impiego di tecnologie polimeriche a base di zucchero (ciclo destrina) e della transferrina.

In particolare la transferrina utilizzata per rivestire le nanoparticelle trasportatrici di siRNA si lega al suo recettore che si trova sulla superficie delle cellule e quindi interiorizzata in modo efficiente nel citoplasma cellulare. Il recettore della transferrina (TfR), presente in quantità elevata sulla superficie delle cellule tumorali favorisce l'assorbimento delle nano particelle. Questo recettore è una molecola interessante per la terapia mirata del cancro poiché è sovraregolato sulla superficie di molti tipi di cancro ed è interiorizzato in modo efficiente.

Questo approccio è in sperimentazione anche per alcune malattie virali come l'epatite da HBV (epatite virale B).

L'ipercolesterolemia familiare è una malattia genetica caratterizzata da alti livelli di colesterolo e

causa di elevato rischio di coronaropatia. Una delle mutazioni responsabili di questa condizione si trova nell'enzima codificato dal gene PCSK9 (Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9) sul cromosoma 1 la cui inibizione promuove la rimozione del colesterolo LDL (Low Density Lipoprotein) dal circolo.

I primi studi clinici sulla efficacia della inibizione della produzione del gene PCSK9 utilizzando siRNA hanno dimostrato una riduzione significativa del colesterolo LDL.

Il loro impiego nelle applicazioni cliniche dei farmaci a siRNA presenta alcune importanti problematiche non ancora completamente risolte anche se ci sono già state alcune applicazioni di successo nel trattamento della degenerazione maculare legata all'età e dell'infezione da virus respiratorio sinciziale. Gli siRNA non possono essere rilasciati direttamente nel flusso sanguigno in quanto gli enzimi presenti degradano gli siRNA che per la loro carica negativa non possono passare attraverso la membrana cellulare idrofobica ed entrare nella cellula. Inoltre gli siRNA possono avere effetti indesiderati fuori bersaglio, stimolare la risposta immunitaria e silenziare molecole di RNA diverse. Ostacoli come la somministrazione di farmaci oligonucleotidici in aree inaccessibili al corpo umano e la prevalenza di gravi effetti collaterali devono ancora essere completamente superati. Numerose strategie sono in corso per la somministrazione di farmaci a base di acidi nucleici e oligonucleotidi antisense.

Con la crescente conoscenza dei meccanismi molecolari dell'interferenza endogena dell'RNA, i piccoli RNA interferenti (siRNA) stanno emergendo come farmaci innovativi per l'acido nucleico per il trattamento di malattie incurabili come i tumori.

Sebbene diversi siRNA candidati per il trattamento delle malattie oculari e respiratorie siano in fase di sperimentazione clinica, ci sono sfide inerenti all'ulteriore sviluppo di siRNA per terapie antitumorali, perché la somministrazione sistemica sarà necessaria nella maggior parte dei casi.

Sono attualmente in corso studi clinici sull'uso di nanoparticelle lipidiche di dimensioni 70-80 nm, in cui è confezionato il siRNA che hanno evidenziato incoraggianti risultati. I siRNA possono quindi essere trasportati attraverso il flusso sanguigno, protetti dall'azione degradante degli enzimi e possono

passare attraverso la membrana cellulare idrofobica nel citoplasma cellulare in modo che il siRNA venga assorbito specificamente dalla cellula malata.

L'applicazione di successo di siRNA per la terapia del cancro richiede lo sviluppo di sistemi di somministrazione di farmaci clinicamente adatti, sicuri ed efficaci ottenibile per combinazione di siRNA con sistemi di somministrazione di farmaci chemioterapici per il trattamento del cancro.

## RNA LUNGI NON CODIFICANTI

Una seconda classe di RNA recentemente identificati sono gli RNA lunghi più di 200 nucleotidi (>200 bp) che non vengono tradotti in proteine chiamati "long non coding RNA" (lncRNA) trascritti da regioni del genoma che si trovano tra le unità di trascrizione e dall'interno degli esoni o degli introni dei geni codificanti le proteine.

Negli Stati Uniti nel settembre 2003 è stato lanciato dall'Istituto di ricerca Nazionale del genoma umano il progetto ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) con l'obiettivo di trovare nel genoma tutti gli elementi funzionali presenti e di caratterizzare gli elementi non-codificanti ma funzionali. I risultati attuali ottenuti dimostrano che la regolazione genica sembra essere molto più complessa di quanto previsto. Sono stati identificati circa 10.000 lncRNA ed è stato dimostrato che solamente il 20% del DNA non codificante è funzionale mentre il 60%, pur essendo trascritto, non è stato ancora caratterizzato e non presenta alcuna funzione conosciuta.

Tuttavia, tra quelli studiati, è evidente che gli lncRNA svolgono un ruolo nella regolazione dell'espressione genica.

## RNA CATALITICI

Una terza classe di RNA sono i ribozimi, scoperti per la prima volta nel 1982 nei batteri e successivamente negli eucarioti.

Il ribozima è una enzima di natura non proteica costituito da RNA con attività catalitica. Il termine ribozima è una contrazione di ribonucleico ed enzima.

La caratteristica peculiare dei ribozimi è quella di catalizzare tagli del legame fosfodiesterico dell'RNA. Per questa ragione, numerosi ribozimi sono capaci di operare l'attività enzimatica anche sul ribozima stesso, mediante autocatalisi e su altre molecole di RNA.

I ribozimi catalizzano specifiche reazioni biochimiche in modo simile agli enzimi proteici per cui sono anche conosciuti come RNA catalitici. Alcuni ribozimi come gli snRNA, catalizzano lo splicing tagliando gli introni e saldando gli esoni adiacenti. Anche l'rRNA, componente RNA dei ribosomi, catalizza la formazione di legami peptidici durante la sintesi proteica.

I ribozimi possono essere progettati e costruiti artificialmente in laboratorio per scopi terapeutici per legarsi e scindere un mRNA bersaglio, silenziando così l'espressione di un determinato gene allo stesso modo di siRNA.

I ribozimi mirati a RNA specifici sono oggetto di valutazione e sono testati in numerosi studi clinici per trattamento di tumori ai reni e al seno oltre ad alcune infezioni virali tra cui il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) e il virus dell'epatite C (HCV).

La terapia a base di ribozima, come per siRNA, è limitata da un rilascio inefficiente alle cellule bersaglio e da possibili effetti collaterali non desiderati.

Numerosi studi sono in corso per migliorare l'utilità di queste molecole come agenti terapeutici.

Le nuove terapie con RNA come regolatori, long non coding RNA" (lncRNA), rappresentano una grande promessa per il futuro rivoluzionando la medicina di oggi essendo uniche nel consentire di portare le prime scoperte scientifiche alla traduzione clinica e alla produzione commerciale (Divan A, Royds J).

## ▼ DNA E CANCRO

Il cancro è la malattia di un genoma disordinato dovuta al malfunzionamento delle funzioni biologiche necessarie per la corretta crescita cellulare e per le formazioni ed il corretto mantenimento degli organismi multicellulari.

Le mutazioni avvengono quando attraverso un errore di copiatura o per danneggiamento di una catena parentale vengono incorporate nelle catene di nuova sintesi una o più basi sbagliate.

Mutazioni sporadiche dei geni sono dovute a errori casuali nella replicazione del DNA e all'esposizione a fattori di rischio che possono evidenziare un aumento del rischio relativo ed una predisposizione genetica allo sviluppo della malattia.

Il DNA codifica per tutte le funzioni necessarie per la vita della cellula oltre che per il suo stesso mantenimento. Le funzioni esplicate dal DNA sono direttamente legate alla sua struttura che è costante e la variabilità della informazione risiede nella sequenza dei nucleotidi.

Ad ogni divisione cellulare, l'informazione genetica contenuta nel DNA deve essere fedelmente duplicata e copiata per trasmettere alle cellule figlie l'intero patrimonio genetico della cellula madre limitando l'insorgenza di mutazioni potenzialmente dannose.

La fedeltà della replicazione del DNA nell'uomo è assicurata in quanto le cellule dispongono di un preciso complesso meccanismo di duplicazione del DNA che interviene nella correzione degli errori compiuti dalla DNA polimerasi, nella correzione degli appaiamenti sbagliati e nella eliminazione di basi anomale con sostituzione di basi corrette. Il tasso di errore di duplicazione è valutato a circa una base ogni  $10^9$  basi duplicate.

L'importanza del sequenziamento del genoma nella Genetica viene confermata nelle osservazioni scientifiche riportate nella letteratura medica specialistica sulla capacità di scoprire mutazioni specifiche possibili tra figli e genitori. E' da citare uno studio di analisi dell'eredità genetica di una famiglia composta da genitori e da due fratelli affetti da due malattie genetiche: la sindrome di Miller, per la quale il gene è stato identificato, e la discinesia ciliare primaria, per la quale sono stati identificati geni causativi.

Il sequenziamento del loro intero genoma ha permesso di delineare con precisione il tasso di mutazione intergenerazionale risultato in tal caso inferiore al previsto, i siti di ricombinazione e l'insorgenza di rari polimorfismi (Roach et al 2010). Theodor Boveri, biologo tedesco, anatomista comparato e co-fondatore della citologia moderna ha fornito contributi fondamentali alla teoria dell'eredità facendo osservazioni pionieristiche sui cromosomi anormalmente segregati nelle cellule tumorali.

Con le sue osservazioni notò che i cromosomi dovevano portare informazioni vitali per lo sviluppo e la crescita corretta delle cellule e che le cellule tumorali mostravano sorprendenti aberrazioni nei cromosomi che potevano essere la causa della crescita patologica caratteristica del cancro.

Inoltre rilevò nel 1902 che un cancro inizia con una singola cellula mutata causando una divisione incontrollabile delle altre cellule pertanto ritenne che la cancerogenesi fosse il risultato di mitosi aberranti e crescita incontrollata causata da agenti mutageni. La conoscenza della base genetica da cui le cellule subiscono la trasformazione neoplastica è aumentata enormemente (Cleveland e Don).

A causa della complessità dei sistemi cellulari molti differenti tipi di errori possono portare al cancro ed alla formazione di lesioni maligne. L'integrità del DNA cellulare è continuamente minacciata da errori commessi durante la replicazione del DNA e da mutageni sia endogeni che esogeni (Helleday et al 2014).

Le conseguenze dell'alchilazione del DNA, la deaminazione e le rotture del doppio filamento causate da specie reattive dell'ossigeno sono tutte rilevabili dal sequenziamento del DNA. Similmente agenti che danneggiano il DNA come le radiazioni UV e sostanze simili all'aflatossina o benzo  $\alpha$ -pirene lasciano tutti un distinto danno genomico. Il paradosso dell'epidemiologo inglese Richard Peto, docente di statistica medica ed epidemiologia alla Università di Oxford e al Green Templeton College, è una osservazione relativa alla probabilità di carcinogenesi che, a livello di specie non sembra essere correlata al numero totale di cellule in un organismo.

L'incidenza del cancro negli esseri umani è molto più alta dell'incidenza del cancro nelle balene nonostante le balene abbiano più cellule degli esseri umani.

I modelli matematici dell'incidenza del cancro sono altamente sensibili ai tassi di divisione cellulare poiché un minor numero di divisioni cellulari significa minore opportunità di mutazioni del DNA e di mutazioni cancerogene. Inoltre, gli animali più grandi hanno generalmente tassi metabolici basali inferiori avendo un minore dispendio energetico necessario a mantenere le funzioni vitali e lo stato di veglia, di conseguenza le loro cellule subiscono meno danni nel tempo per unità di massa corporea. Questi fattori possono spiegare parte dell'apparente paradosso. Dallo studio dei tassi di cancro negli esseri umani e nelle balene, Richard Peto ha rilevato che l'incidenza del cancro negli esseri umani non sembra essere correlata al numero di cellule nell'organismo.

Se la probabilità di carcinogenesi fosse costante tra le cellule, le balene avrebbero una incidenza maggiore rispetto agli esseri umani.

Una crescente evidenza mostra che molte forme di instabilità genomica possono influenzare la prognosi sia in senso favorevole che sfavorevole.

Gli eucarioti hanno sviluppato molteplici meccanismi altamente efficaci per impedire e riparare tali mutazioni. Tutte le cellule condividono un insieme di caratteristiche comuni, quali le loro informazioni genetiche, la replicazione durante il ciclo cellulare oltre a poter produrre energia attraverso un apparato metabolico. Il fallimento di questi meccanismi cellulari che possono portare all'instabilità genetica ed allo sviluppo del tumore, si verifica in una frazione sostanziale dei tumori umani.

Le mutazioni somatiche sono il risultato di molteplici processi mutageni verificatisi nel corso della vita. Ogni processo lascia un'impronta caratteristica – una firma mutazionale – sul genoma definito dal tipo di danno al DNA e dai processi di riparazione del DNA che provocano sostituzioni, inserimenti e delezioni di basi. Con l'introduzione dei metodi di sequenziamento del DNA genomico sono stati identificati finora una serie crescente di queste mutazioni favorendo la possibilità di adozione di mirate terapie antitumorali.

L'analisi delle rotture del DNA è stata anche oggetto di approfonditi studi attraverso lo sviluppo di simulazioni effettuate secondo il metodo dei codici Monte Carlo, di cui il fisico Enrico Fermi è stato uno dei promotori insieme con John von Neumann e Stanislaw Marcin Ulam scienziati nei campi della matematica e della fisica nucleare.

Il nome Monte Carlo fu inventato da Nicholas Constantine Metropolis riferendosi al noto casinò. Lo sviluppo di simulazioni risale alla metà degli anni 40' nell'ambito del Progetto Manhattan.

Una caratteristica del danno è la produzione di brevi frammenti di DNA associati con rotture multiple localizzate del filamento di DNA. Considerando complessivamente il danno alle basi e le rotture del filamento della doppia e della singola elica del DNA il danno complessivo in forma di "cluster" può costituire tra il 60% ed il 90% del danno totale al DNA dopo irradiazione.

Questi dati mettono in evidenza una importante differenza tra la lesioni al DNA indotte da agenti mutageni come le radiazioni e quelle che insorgono spontaneamente attraverso l'attacco ossidativo da parte dei radicali chimici reattivi.

Una elevata quota di danno indotto al DNA da mutageni è rappresentata da un insieme complesso di alterazioni chimiche localizzate che possono insorgere attraverso una combinazione di danni indotti dalle tracce principali, da elettroni secondari e da specie radicaliche secondarie reattive.

Le rotture del doppio o del singolo filamento nella struttura portante fosfato-zucchero del DNA, insieme ad una varietà di basi danneggiate del DNA, possono combinarsi insieme con una elevata frazione del danno totale spazialmente concentrata.

Laddove le prime sono principalmente lesioni complesse e raggruppate, queste ultime sono distribuite a caso e sono semplici nella loro struttura chimica (ICRP Publication 103).

Le radiazioni causano prevalentemente attraverso la formazione di radicali liberi conseguenze importanti quali la modificazione delle basi che producono alterate informazioni genetiche oltre a danni strutturali che producono rottura di legami fosfodiesteri e inducono la rottura del singolo e doppio filamento del DNA oltre a morte cellulare e mutazioni (W.R.Hasting).

Le radiazioni interagiscono con qualsiasi tipo di molecola chimica ma l'acqua è la molecola che più comunemente interagisce producendo sostanze aventi una forte azione ossidante nei confronti di molecole organiche.

Il termine DNA fingerprinting fu usato per la prima volta nel 1984 da Sir Alec Jeffreys, docente genetista britannico, in analogia con le classiche impronte digitali basate sul disegno di creste sui polpastrelli delle dita, usate tradizionalmente per l'identificazione umana.

La tipizzazione del DNA analizza direttamente l'informazione genotipica.

La tecnica si basa sulla presenza nel DNA umano di sequenze altamente variabili che fanno sì che non esistano due individui con la stessa identica sequenza. Con l'ausilio della tecnica di amplificazione del DNA, la Polymerase Chain Reaction (PCR), è

possibile fare il DNA fingerprinting anche a partire da una minima quantità di DNA.

Alec Jeffreys è stato uno dei primi a scoprire variazioni ereditarie nel DNA umano ed ha inventato le tecniche di fingerprinting genetico del DNA rivoluzionando le tecniche di identificazione nella scienza forense.

Lo studio del DNA trova applicazioni in diversi campi della medicina quali la medicina forense per l'analisi di paternità e l'individuazione di responsabili di crimini, l'analisi di resti biologici e nei trapianti d'organo per stabilire la compatibilità tra i soggetti coinvolti.

Nel 1992, i metodi di Jeffreys furono usati per confermare l'identità del nazista Josef Mengele, morto nel 1979, mettendo a confronto il DNA ottenuto da un osso del femore del suo scheletro riesumato con il DNA della sua vedova e di suo figlio.

## BIBLIOGRAFIA

- W.K.Hastings, *Monte Carlo sampling methods using Markov chains and their applications*, *Biometrika*, 1970, pp. 97-109.
- Cleveland A.J.H. & Don W. (2009) *Boveri revisited: chromosomal instability aneuploidy and tumorigenesis*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 478-87.
- Helleday et al 2014 *Mechanisms underlying mutational signatures in human cancer*. *Nat Rev Genet* 15, 585-98.
- Roach et al 2010 *Analysis of genetic inheritance in a family quarted by whole genome sequencing*, *Science* 328, 636-9. Pubblicato online 2010 Mar 10. DOI:10.1126/science.1186802.
- Yan-Qun Xiang and Chao-Nan Qian "Radiation as a Carcinogen" Chapter 10 Corresponding author: Chao-Nan Qian, email: qianchn@sysucc.org.cn University Cancer Center, Guangzhou, China April 2019.
- ICRP Publication 103 *The 2007 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection Annals of the ICRP Volume 37/2-4*, 2008.
- Richard Peto *The Origins of Human Cancer*, vol. 4, Cold Spring Harbor Laboratory, 1977, pp. 1403-1428.
- R. G. Roeder (1996) *The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II*. *Trends in Biochemical Sciences* 21, 327-335.
- David Rawn: *Biochimica*, Mc Graw-Hill, 1990.
- Divan A, Royds J. *Molecular Biology: a very short introduction*. 2016 Oxford University Press, Chapter 3 RNA <https://doi.org/10.1093/actrade/9780198723882.003.0003>