



Biochimica

Struttura α -elica proteine

1953
scoperta
struttura
DNA

Genetica

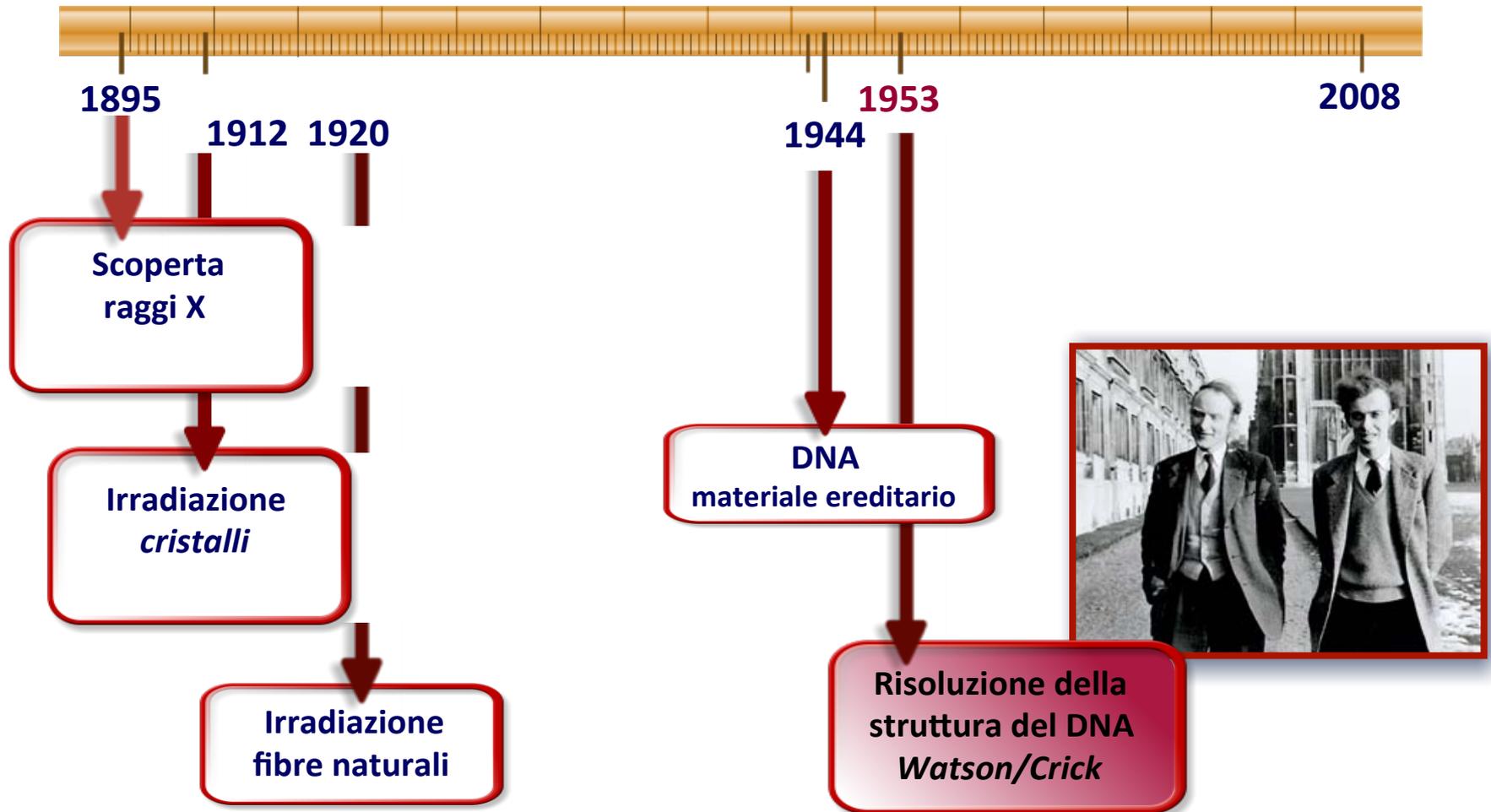
DNA materiale ereditario

Biologia Molecolare



1953

l'inizio della Biologia Molecolare



Tre rivoluzioni principali nella storia della Biologia Molecolare

1950 Definizione struttura del DNA

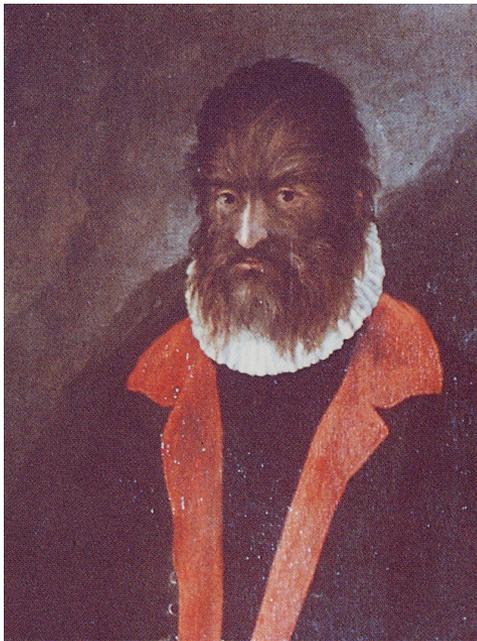
Implicazioni riguardo i meccanismi di replicazione e di espressione del gene

1970 Clonaggio del DNA

Identificazione e analisi della struttura fine del gene
- analisi molecolare di molte patologie

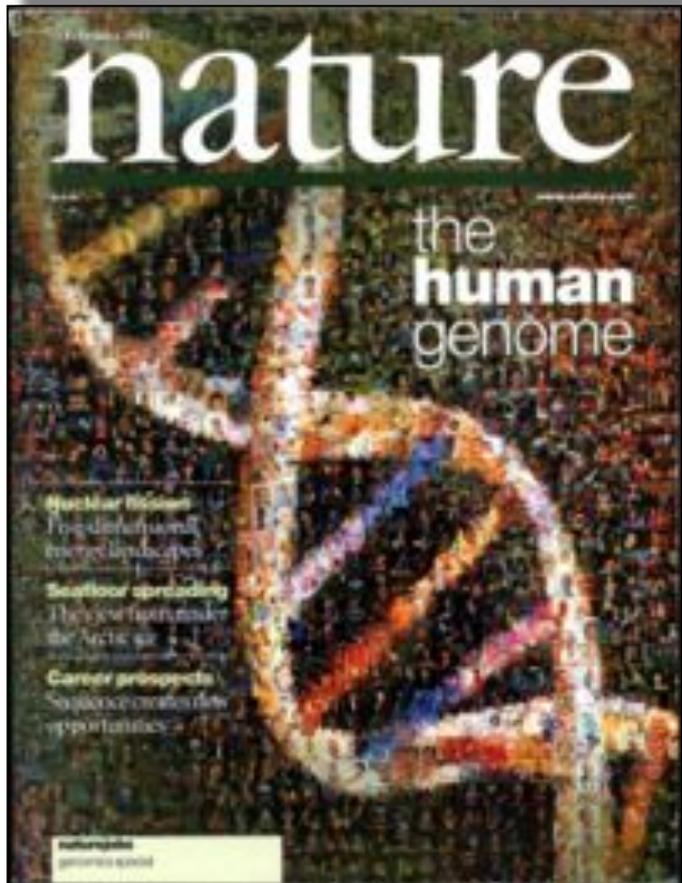
1990 Sequenziamento genomi

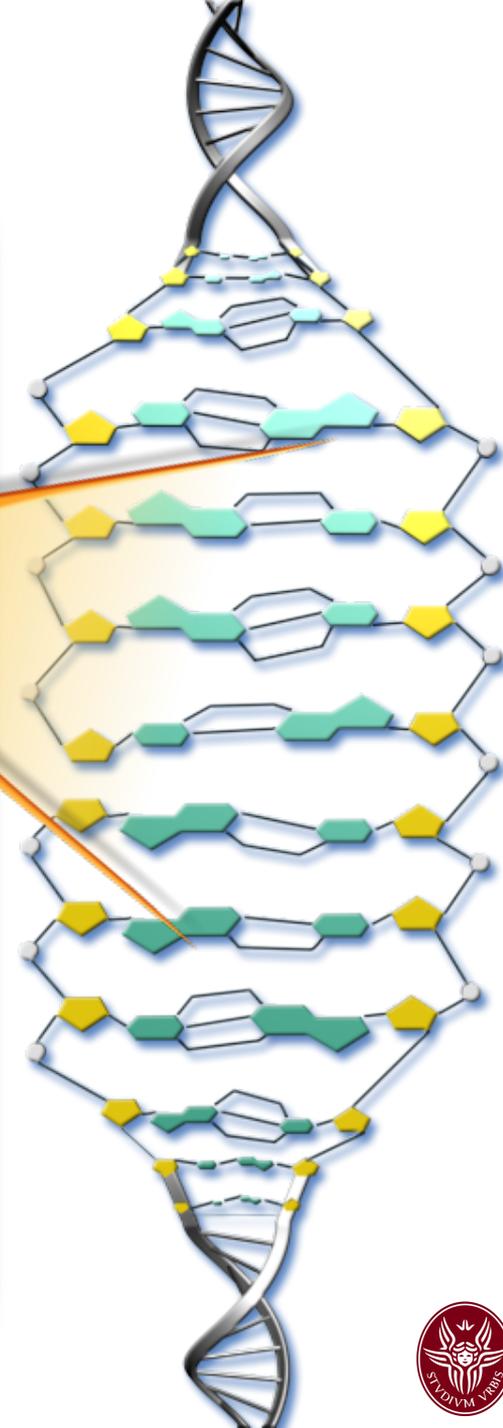
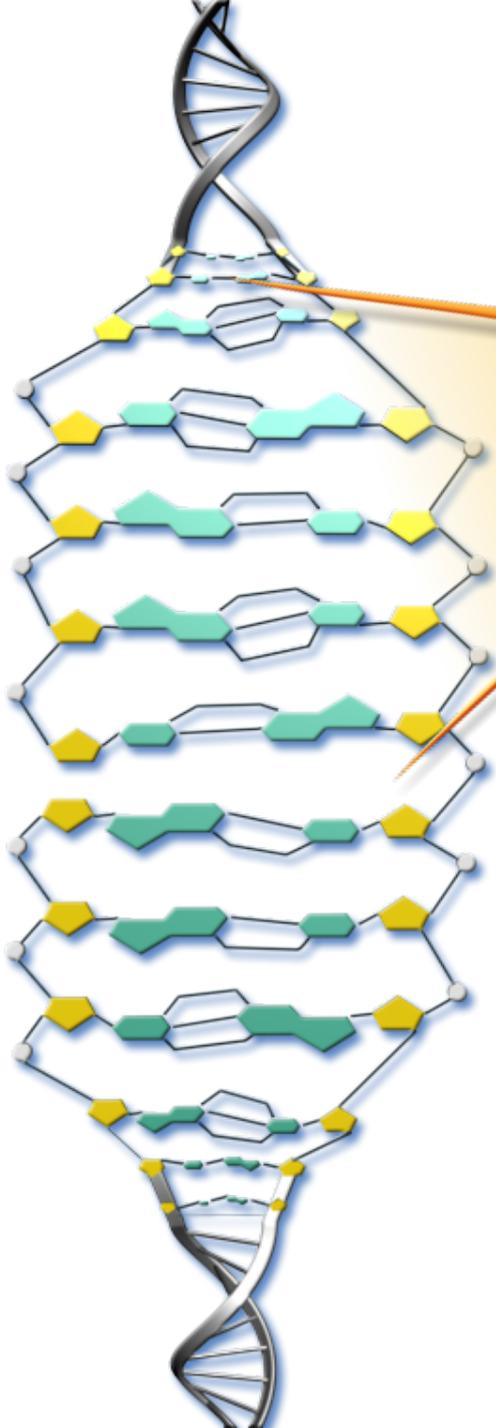
Identificazione di funzioni complesse e caratterizzazione di malattie multifattoriali



Tutte le funzioni di un organismo vivente dipendono dal suo materiale ereditario

genoma

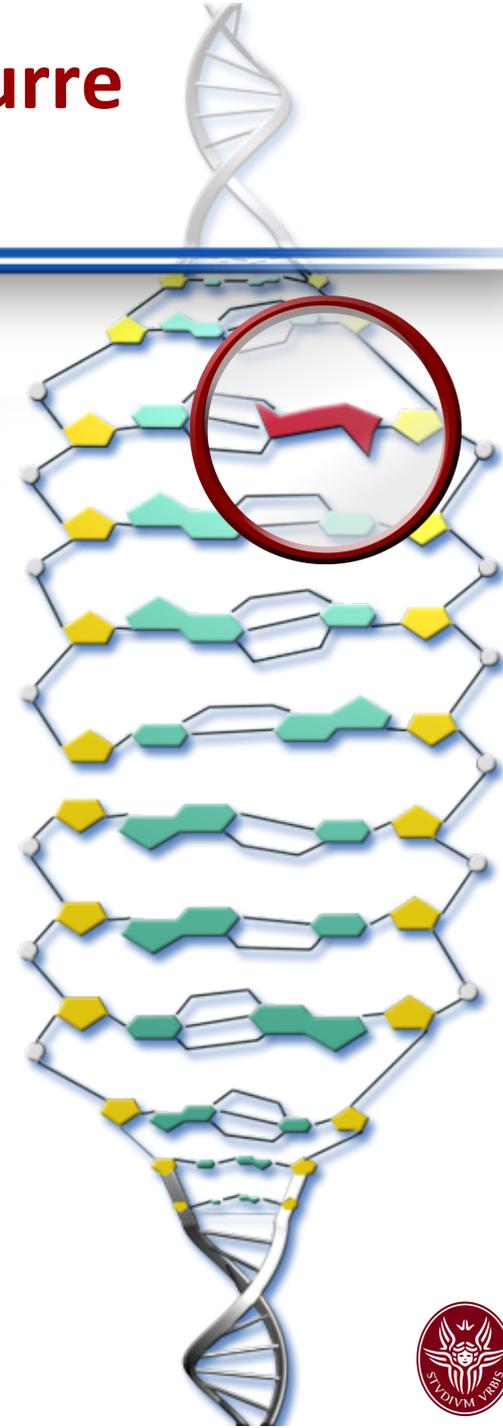
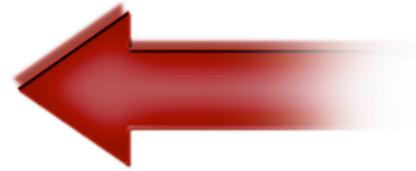




Le mutazioni possono produrre cambiamenti fenotipici



albinismo



Molte patologie sono acquisite dall'esterno (infezioni, allergie...), ma molte derivano dal nostro patrimonio ereditario e possono essere trasmesse dai genitori ai figli

MALATTIE CONGENITE o EREDITARIE

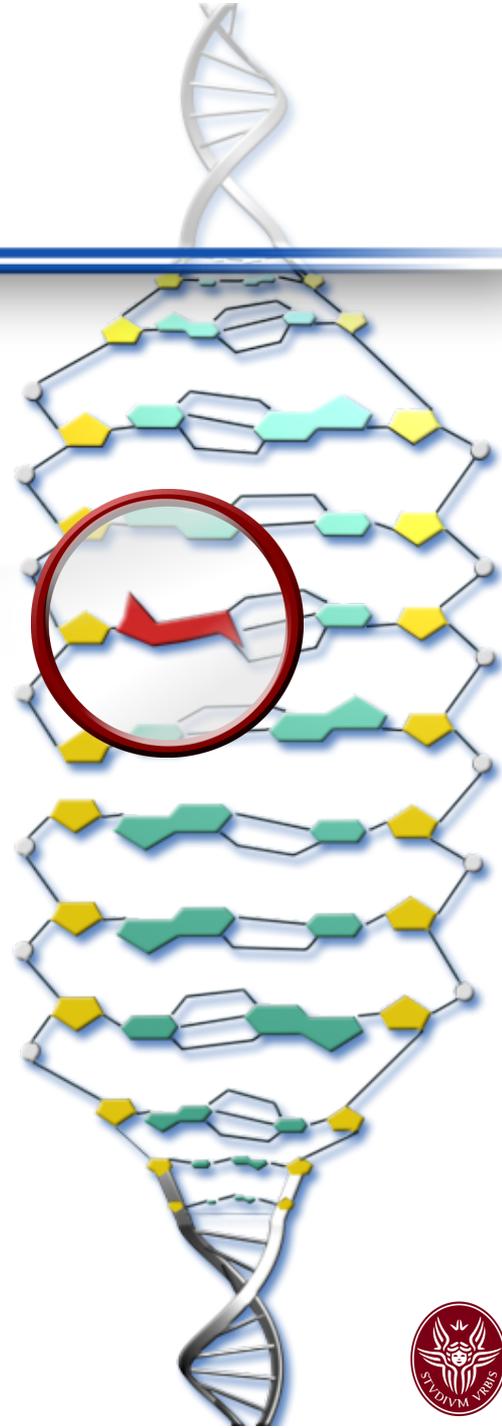
Le scienze che studiano i meccanismi molecolari di queste patologie sono la **GENETICA** e la **BIOLOGIA MOLECOLARE**



Le mutazioni possono produrre malattie



distrofia muscolare



Anche

la **genetica** e la **biologia molecolare**

sono "scienze esatte" e possono essere studiate con le stesse leggi con cui si studiano la fisica, la chimica e la matematica.

1943 Schrodinger - *What is life?*

..



Biochimica

Genetica

Biologia Molecolare 1953

Chimica Fisica

**Matematica
Informatica
Statistica**

**Medicina
Microbiologia**

**Filosofia
Diritto**

**Bioteχνologie mediche, chimiche e agrarie
Medicina Molecolare e Terapia Genica
Bioinformatica
Medicina forense e antropologia molecolare
Bioetica**



**Negli ultimi 10 anni sono stati assegnati 7 Nobel per la
medicina a ricerche
che utilizzavano approcci di biologia molecolare**

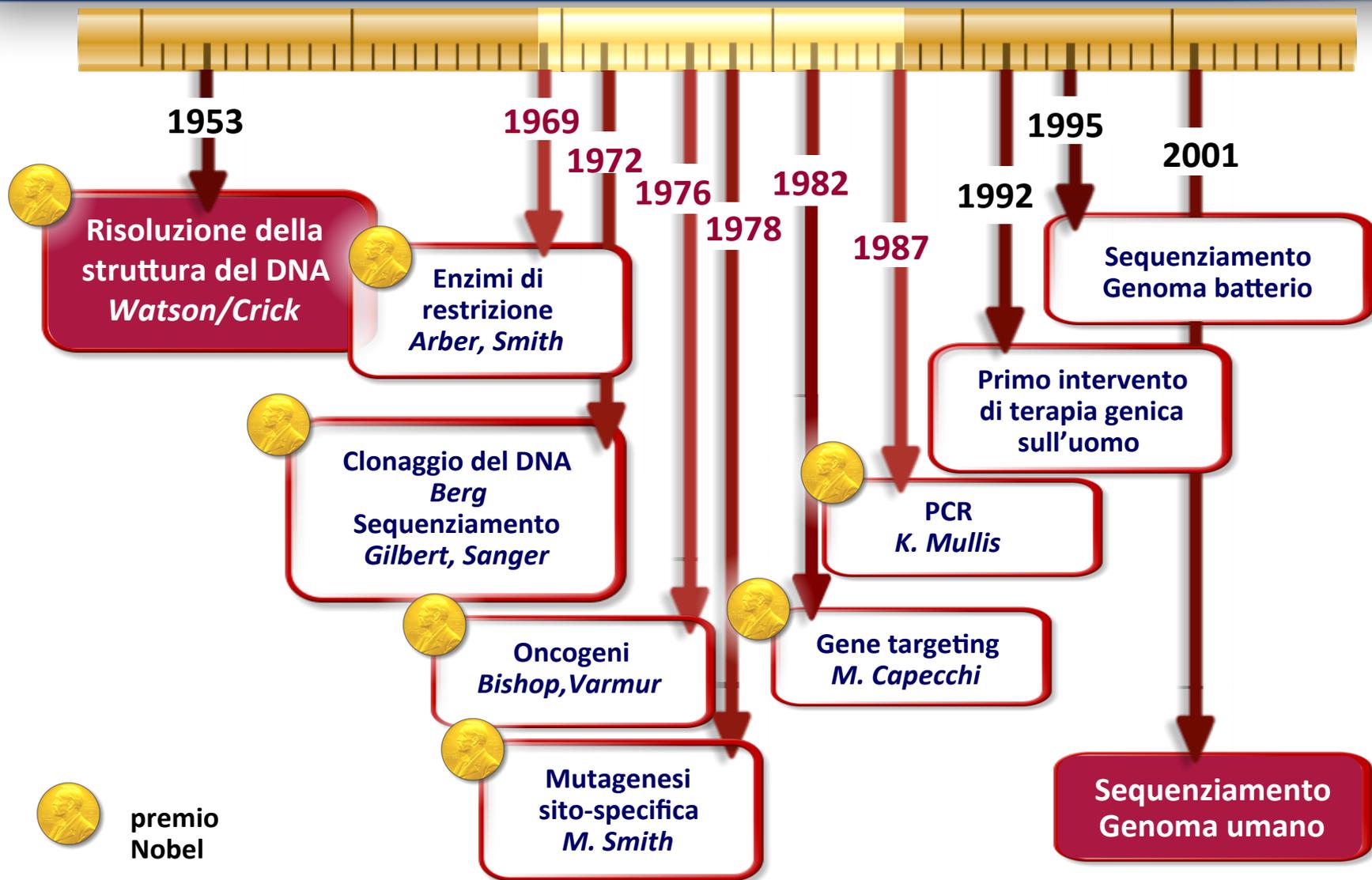
Identificazione di geni che causano il cancro

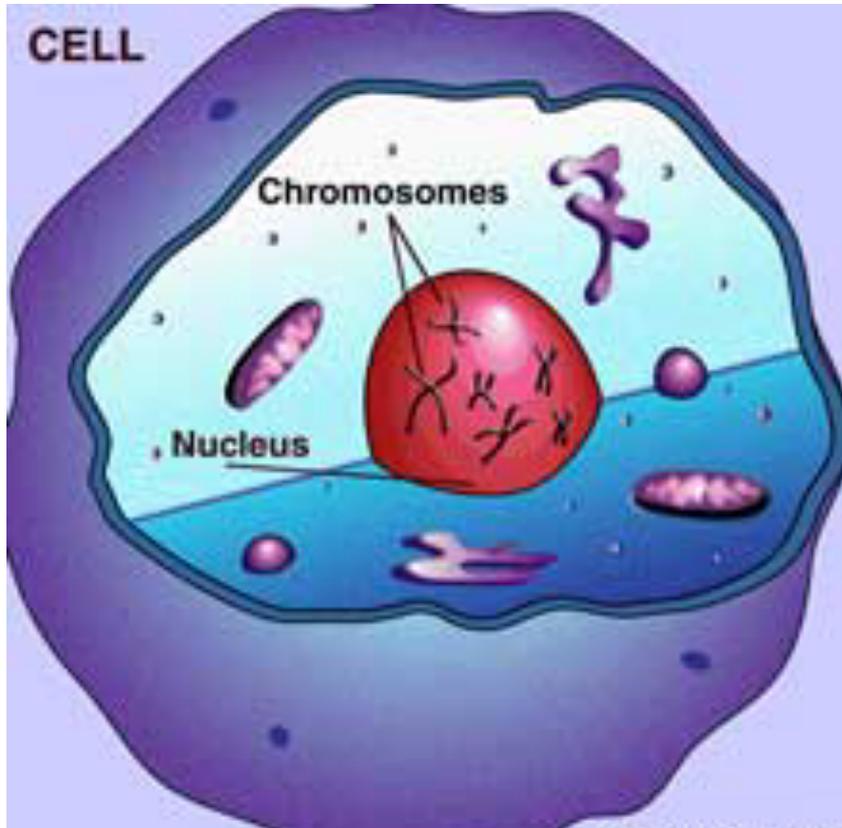
**Identificazione delle basi molecolari di più
di 1000 malattie genetiche**

**Diagnostica in grado di identificare mutazioni molto
precocemente e su un gran numero di patologie**



Funzione catalizzatrice della scoperta del DNA: scoperte rivoluzionarie in pochissimi anni





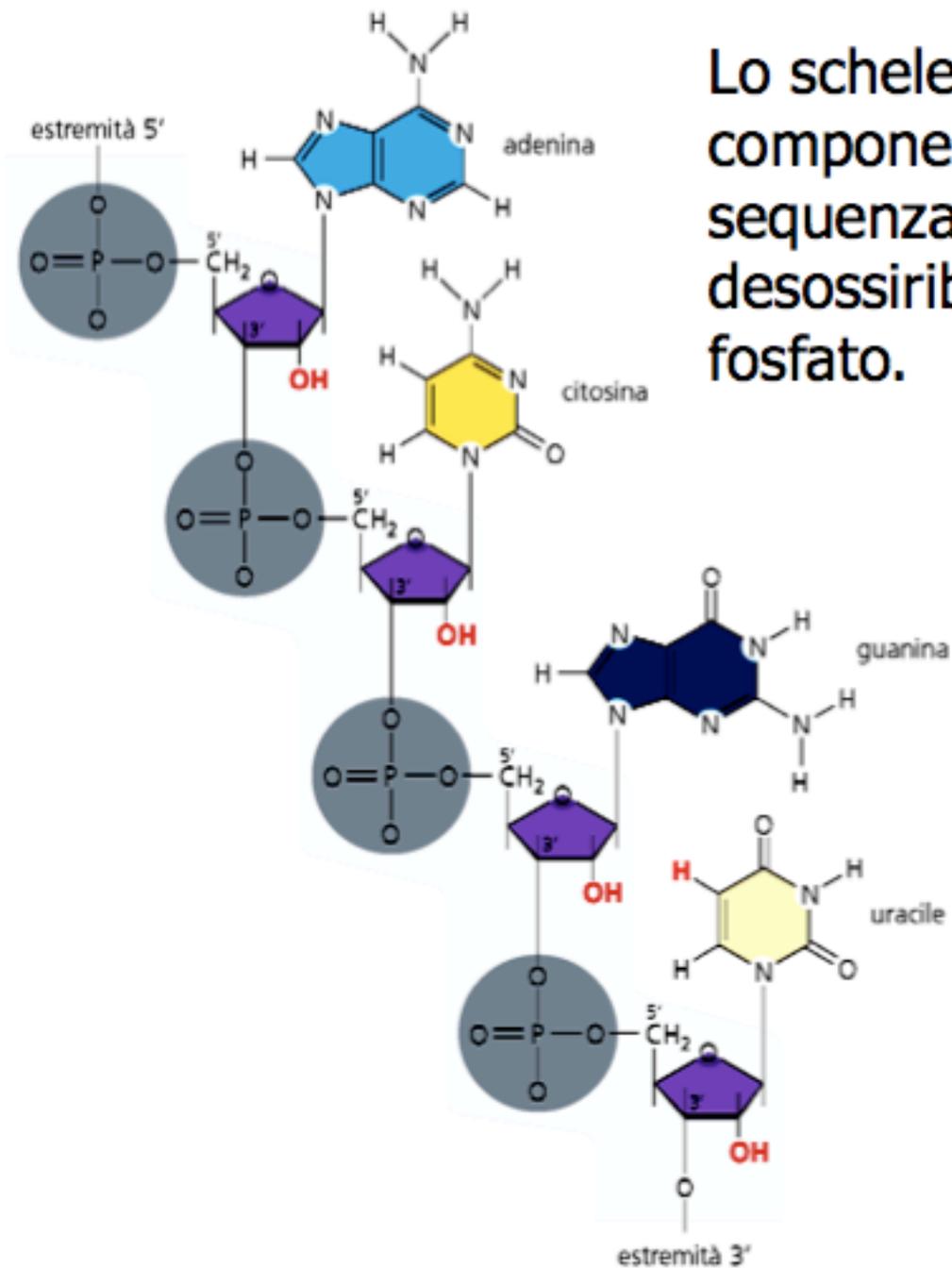
Cos'è un **genoma?**

Cos'è un **cromosoma?**

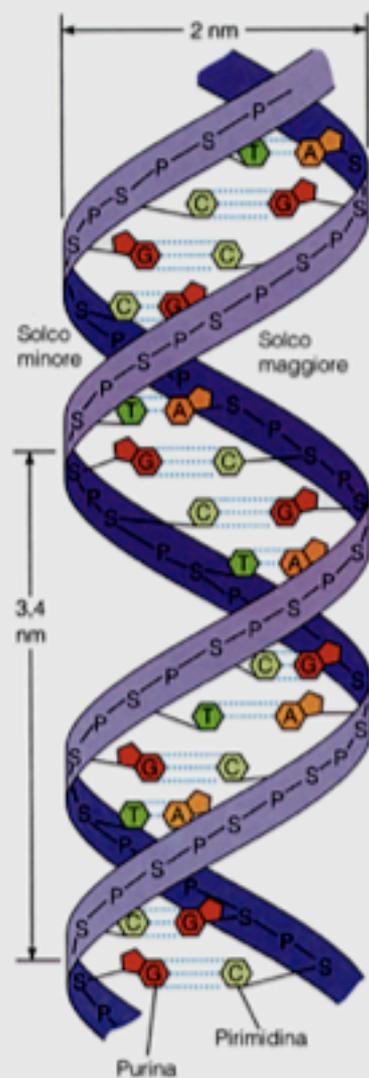
Cos'è un **gene?**

Cos'è il **DNA?**

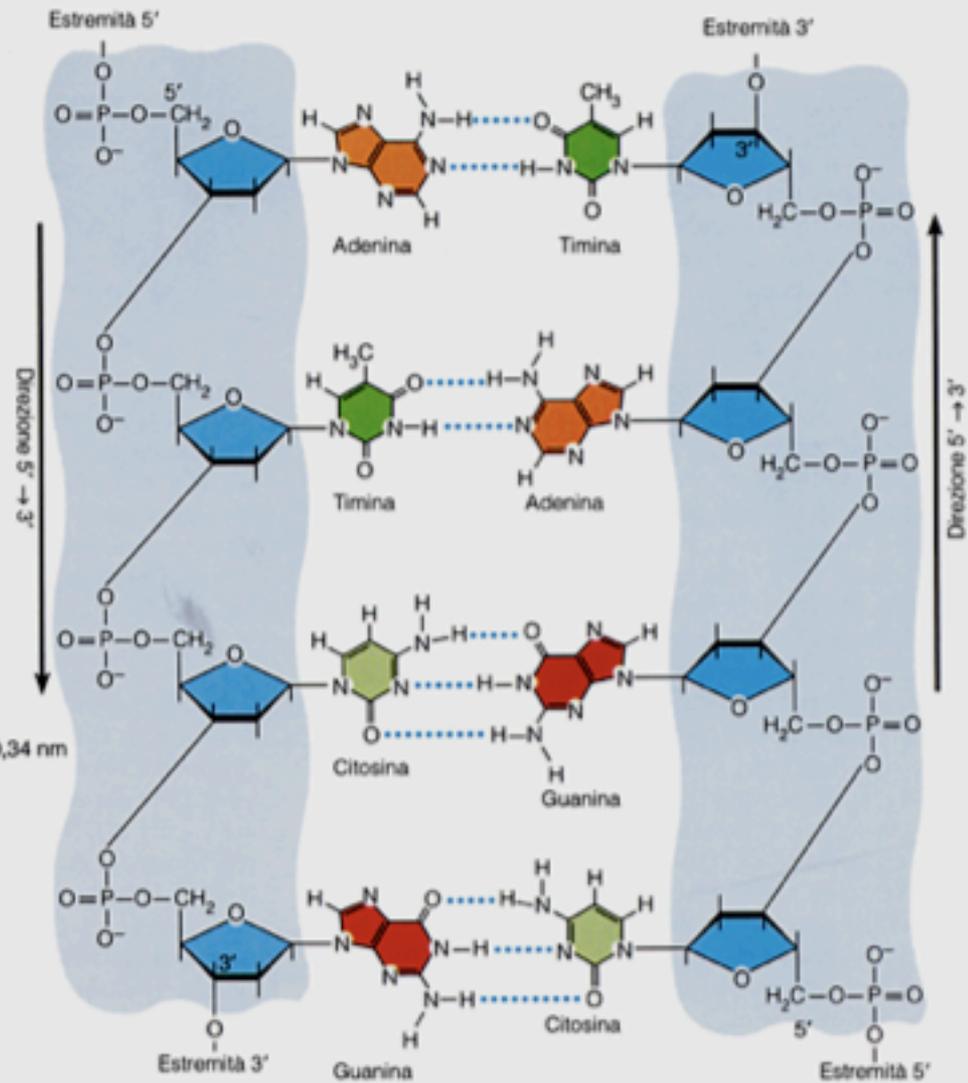




Lo scheletro si compone di una sequenza alternata di desossiribosio e gruppi fosfato.



(a) Doppia elica

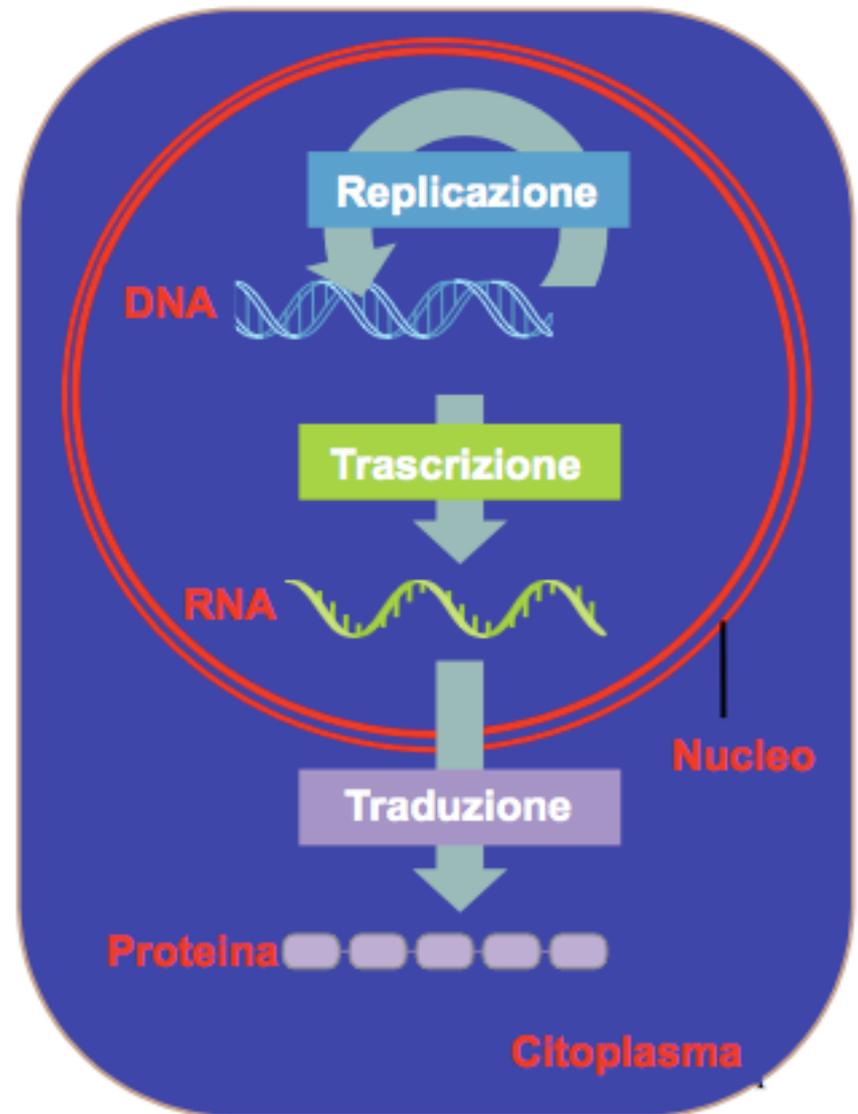


(b) Orientamento antiparallelo dei filamenti

Figura 15-4

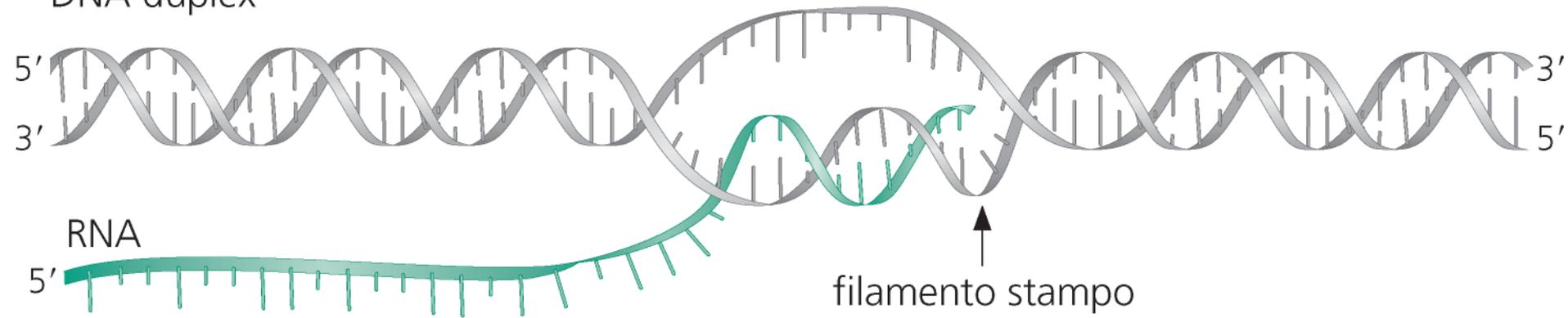
DOGMA CENTRALE

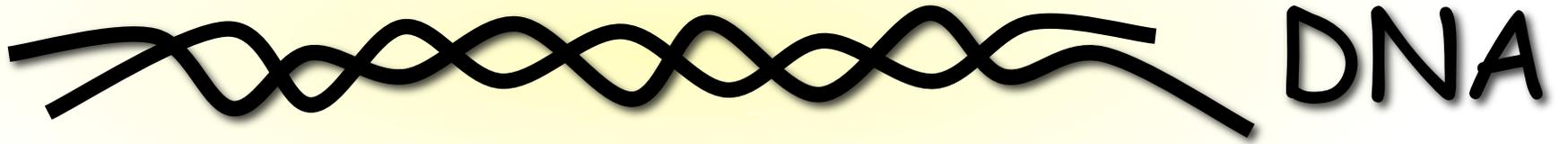
- ❖ Il DNA è il portatore dell'informazione genetica
- ❖ Il processo di replicazione crea nuove copie di DNA.
- ❖ Il processo della trascrizione crea RNA usando le informazioni del DNA.
- ❖ Il processo di traduzione crea proteine usando le informazioni dell'RNA



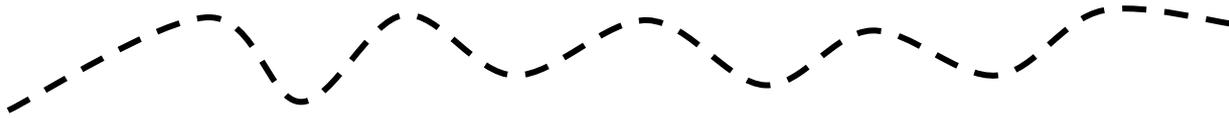
La trascrizione

DNA duplex

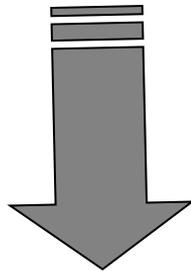




DNA

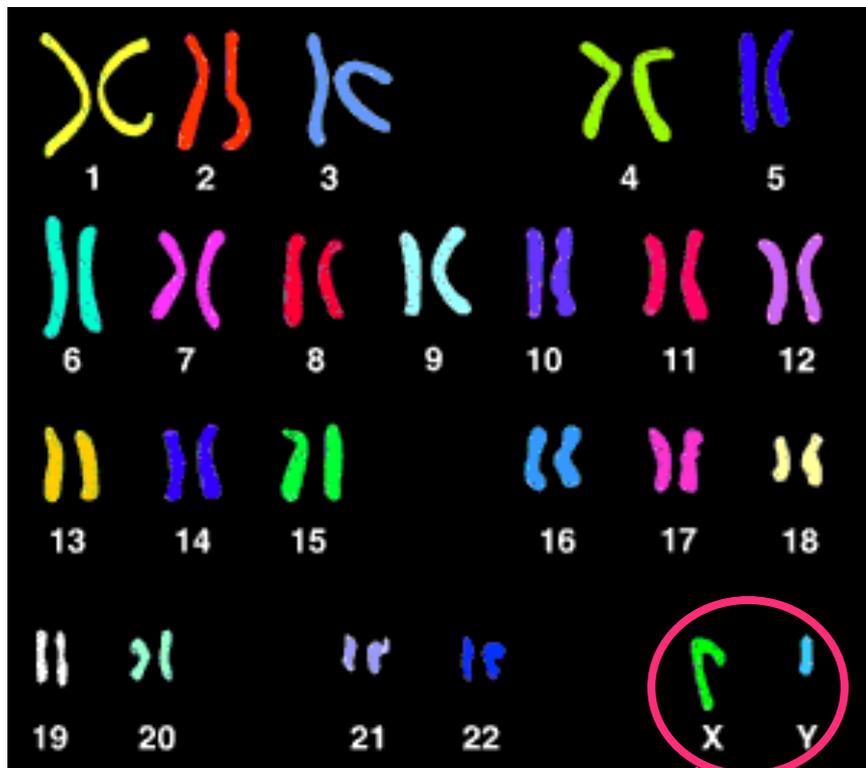


mRNA



proteine

I cromosomi sono presenti in coppie
I membri di una coppia sono uguali tra loro e provengono uno
dalla madre e uno dal padre



I cromosomi sessuali
sono diversi tra loro



Nell'uomo 44
cromosomi più XY



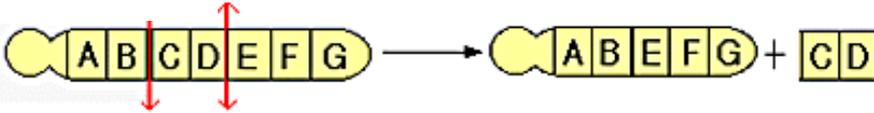
Nella donna 44
cromosomi più XX

In alcune malattie genetiche ci sono alterazioni del numero o
struttura di specifici cromosomi - **Sindrome di Down**

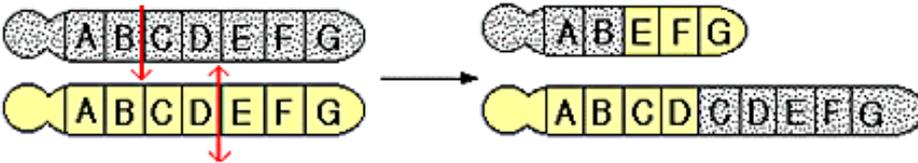
mutazioni puntiformi



delezioni



traslocazioni



Mutazioni cromosomiche

In alcuni casi le traslocazioni portano alla fusione di geni prima lontani. Possono essere prodotte proteine ibride con nuove funzioni, spesso dannose

crom. 22

gene bcr



crom. 9

gene abl



crom. Philadelphia
22-9

gene bcr-abl



proteina di fusione

Leucemia mieloide

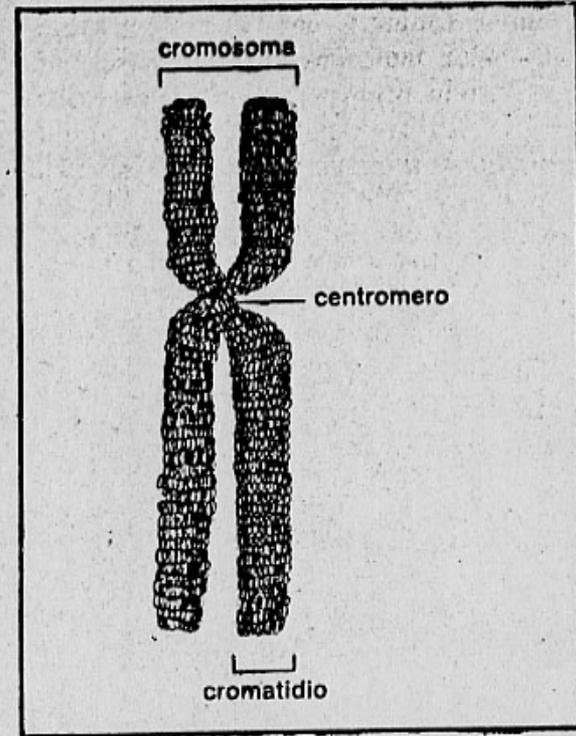
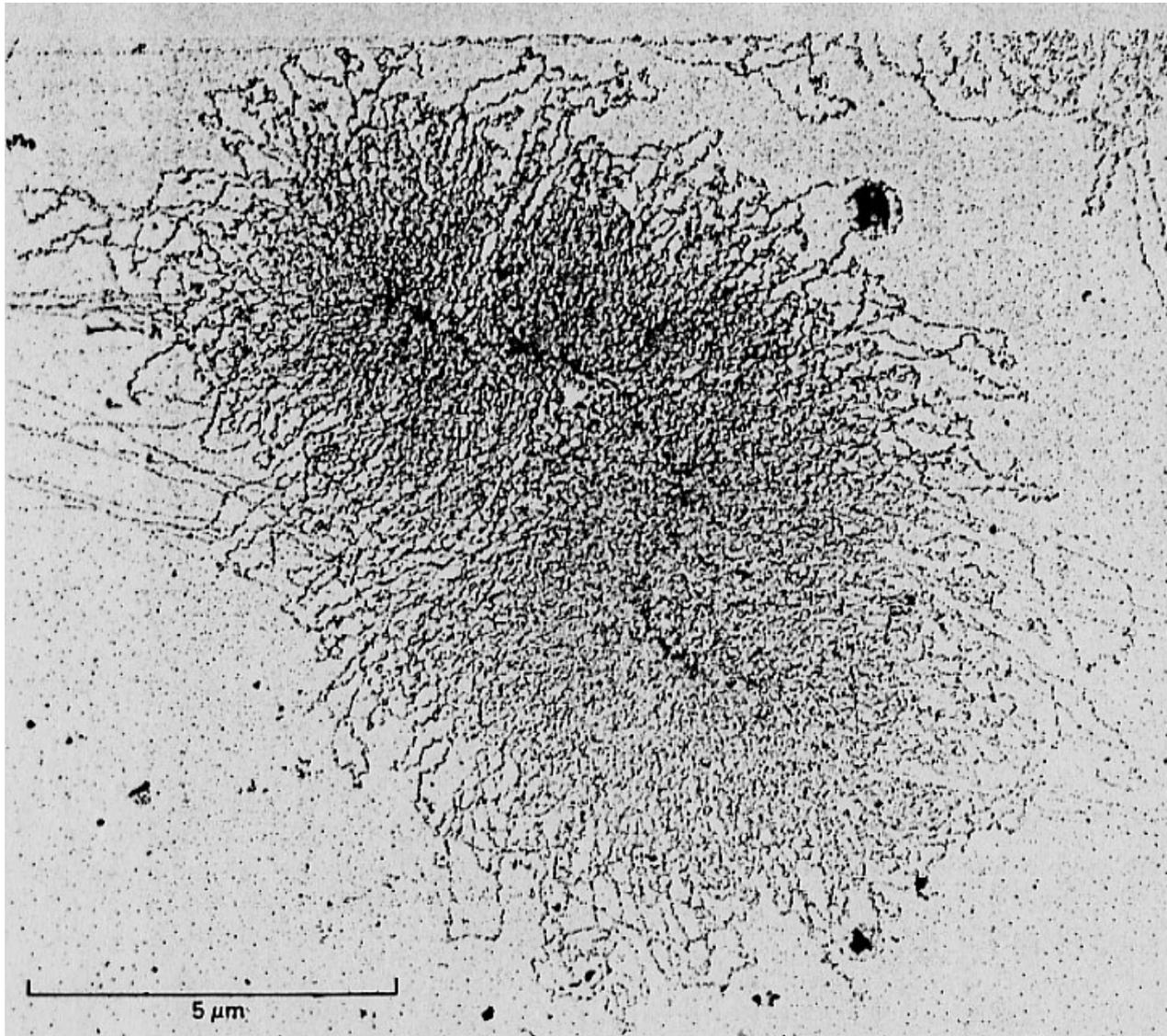
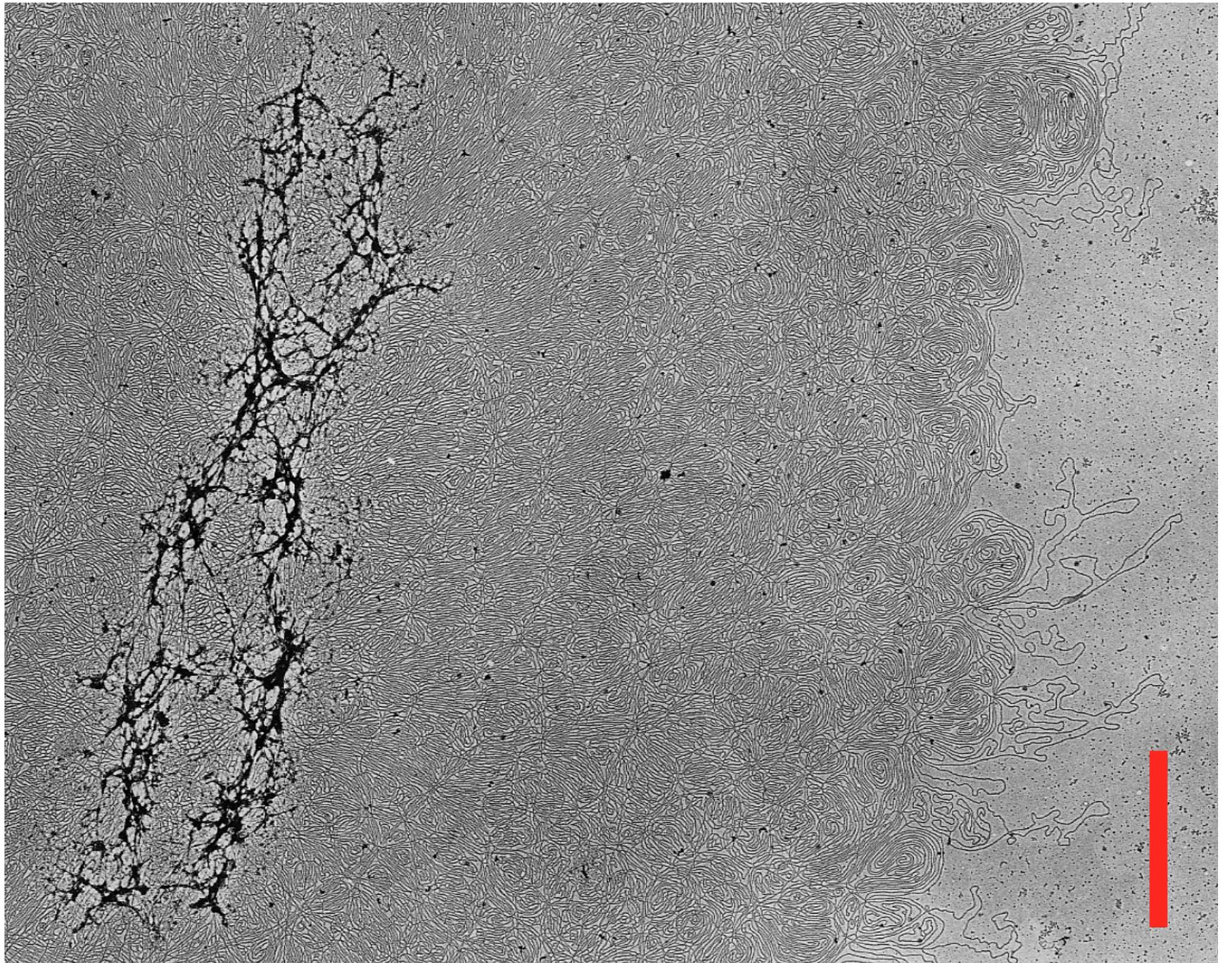
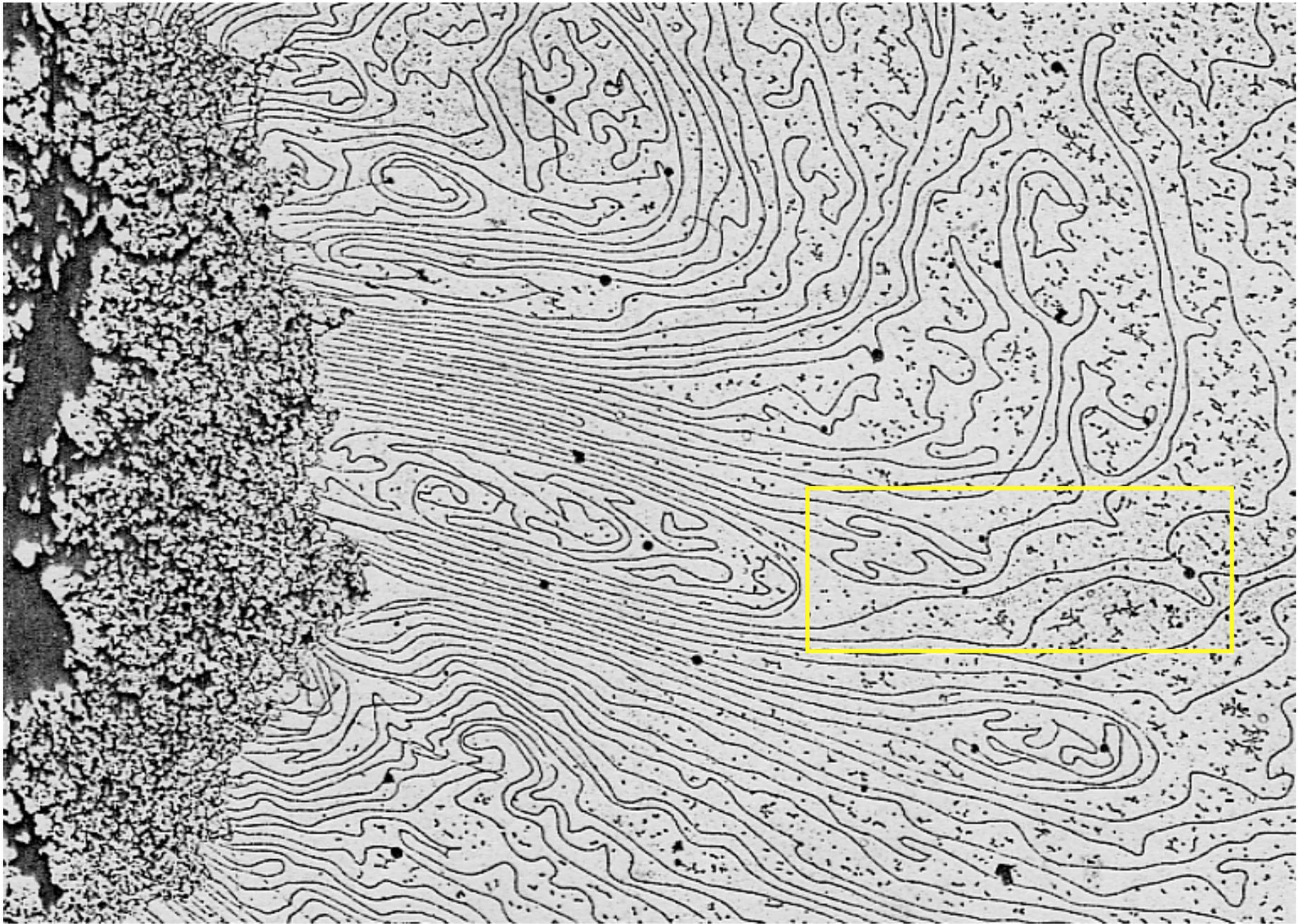


Figura 8.22. Schema di un tipico cromosoma metafaseico. Ogni cromatidio è formato da una delle due molecole figlie identiche di DNA (una di esse nello schema è colorata) che si sono formate durante una fase precedente del ciclo cellulare per duplicazione del DNA.





Tre rivoluzioni principali nella storia della Biologia Molecolare

1970 **Clonaggio del DNA**

Identificazione e analisi della struttura fine del gene
- analisi molecolare di molte patologie

CLONAGGIO MOLECOLARE

enzimi di restrizione

1 tagliano il DNA lasciando estremità "appiccicose"

plasmidi batterici

2 permettono la propagazione del DNA in batteri

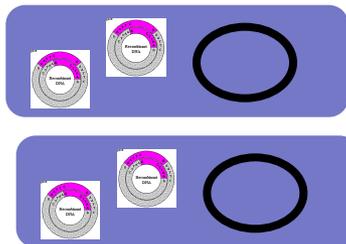
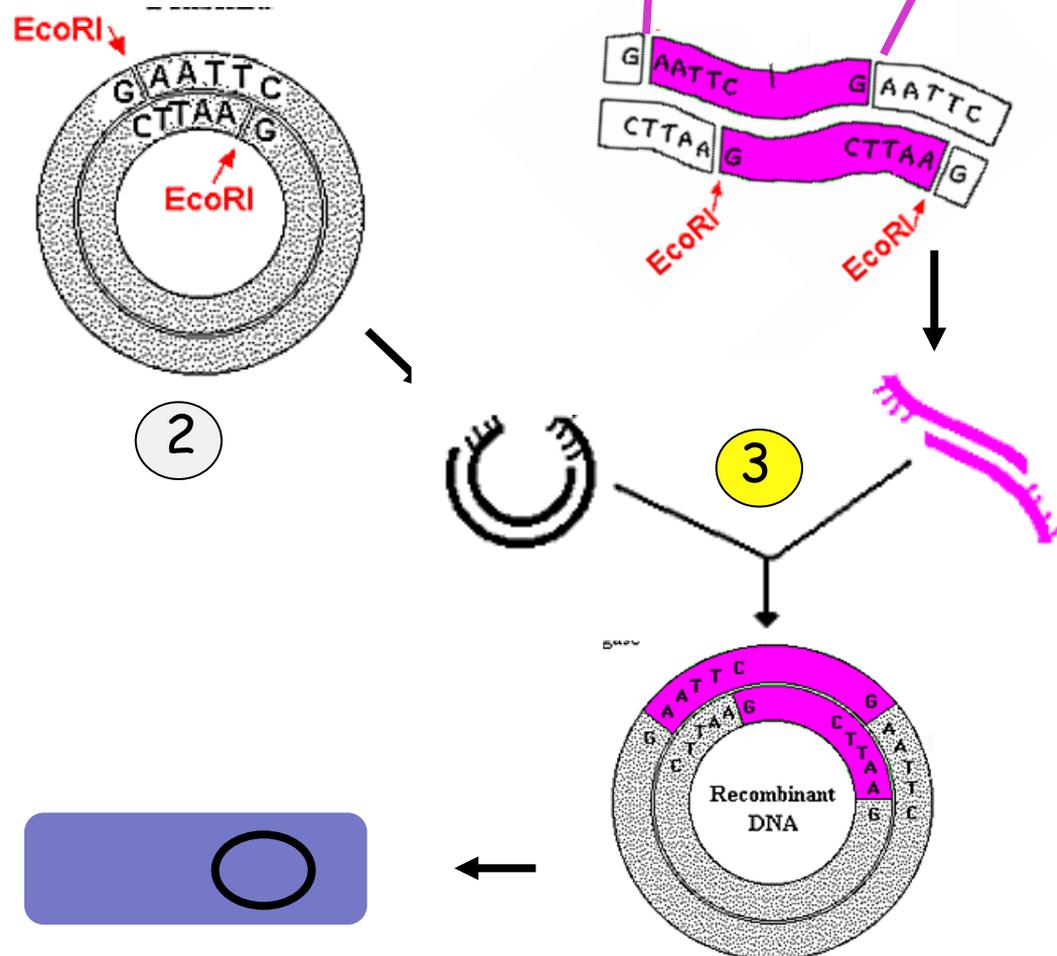
Ricombinazione in vitro

DNA ligasi

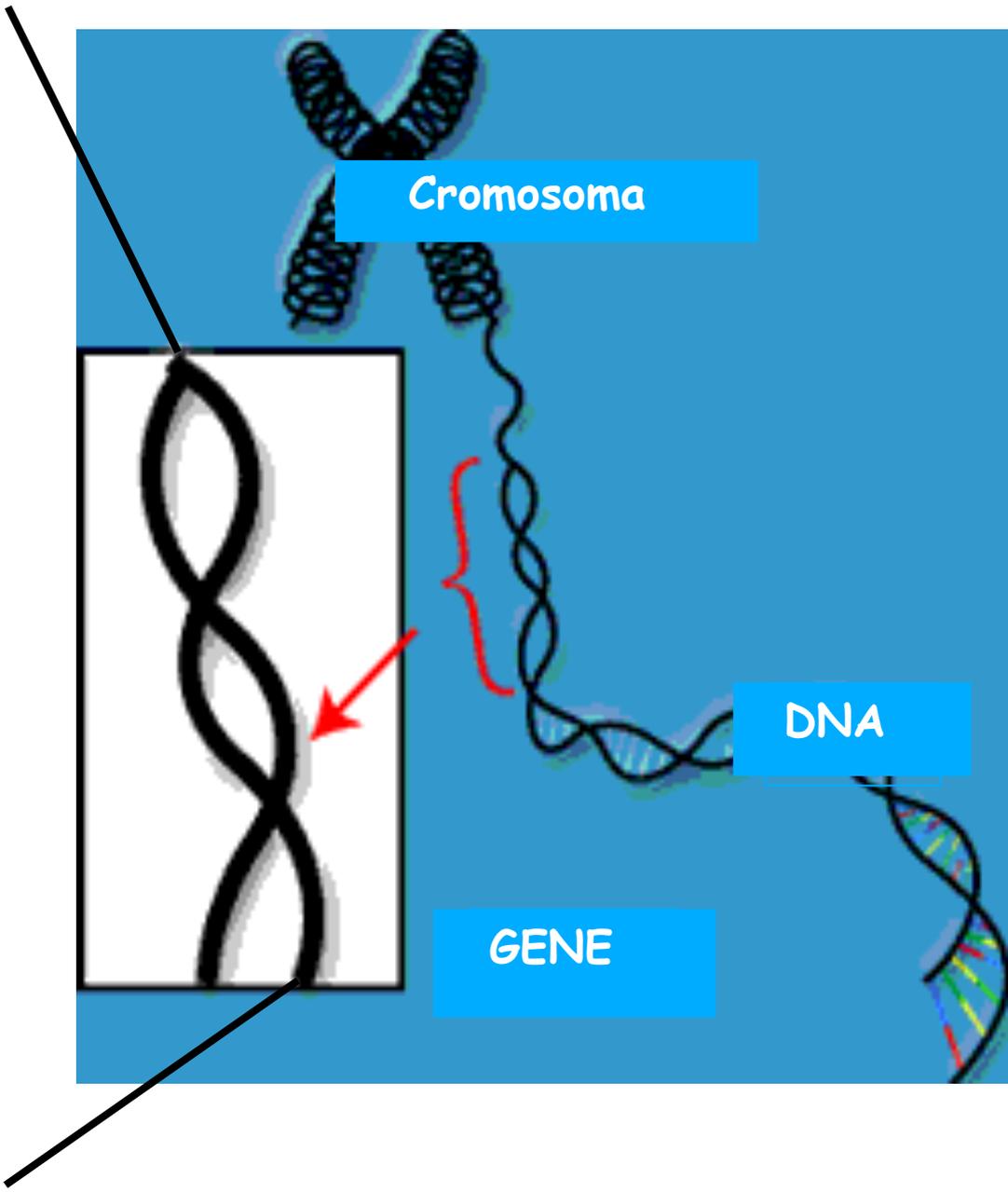
3

crescita in E.coli

4

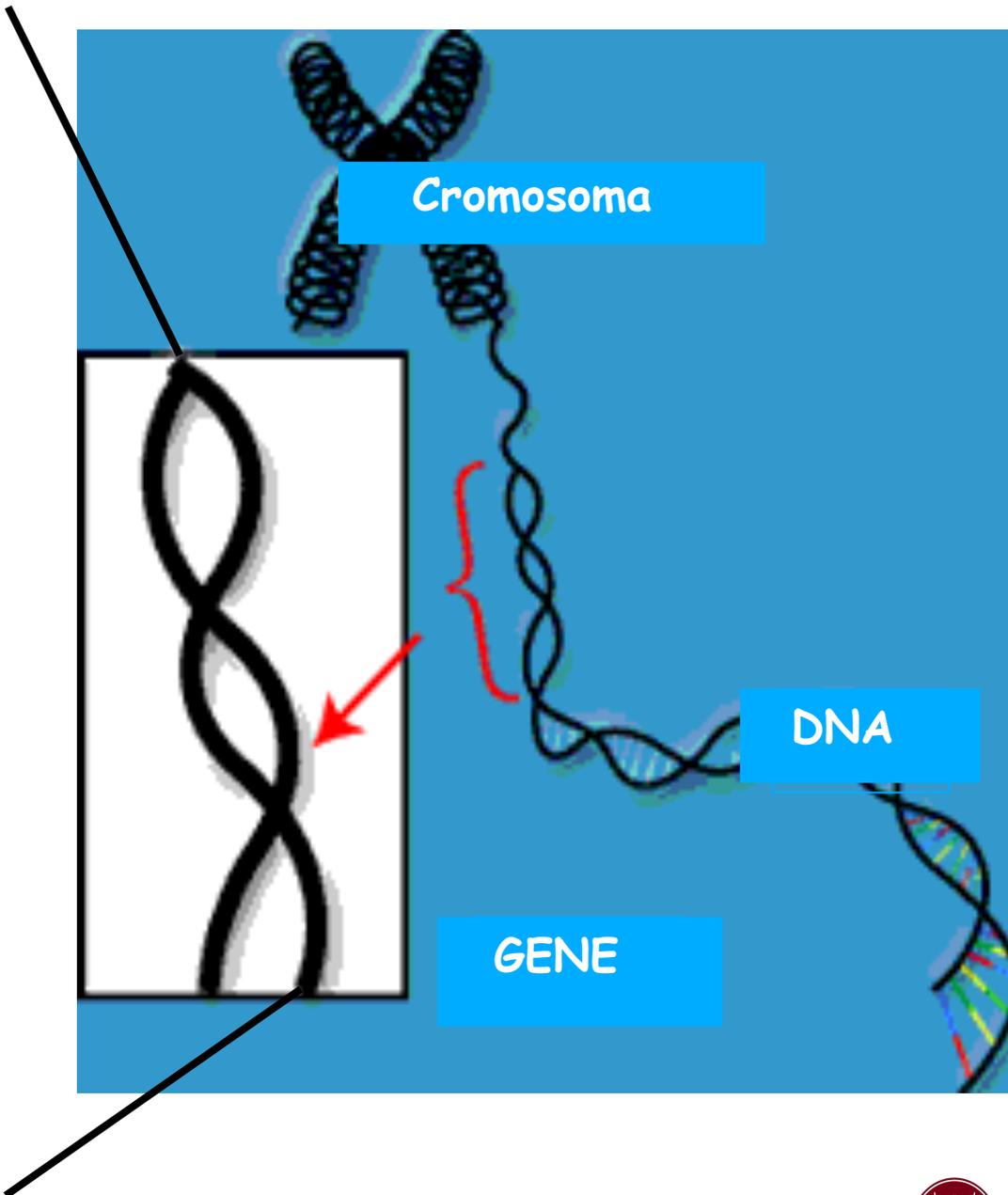


AATATGTACGTAGCTAGCTGAAAGCTGGCTAGCCTGACCCCTGTA
CGCGGCTTACCATCGGTAGCCTTTACTAAGCTGATCGCAGCGCTGC
CATTATCATTTAAAGGCTCCGATCGATCGTTTCCGATCGCTAAACC
TTTACAAAGTCCGCGCGTAGCGATTATATACGTCAGTCTAAGGTGT
CAGATCGGCATCGATGCTACCGTCGACTTTTAGTTTTAAATACTTTA
AAGGGGTCGCGCGTATCTCGATTTGAAAAGTGCAGTCCCAGGTTG
CACACGTTGGGGTACAAATTCGATGCTCTGAATTTCCGGTACGCGC
CACATGCTCGATTCCGTTTCGCTTTAAACGCTCGTGGGTTAAACACT
AGCTGATGCAGCTGGGACCAATTCGCGTAGCTTACAAGCAGGCTG
ACCAGCTGATCGATTTCCCGGGACATCGACGATAGCTAAATGGTGC
ACCAGAAAATCGCTCGCGCTAGAGATCGTTTTCCGGAACCCCTCACTG
CCATAATTTCCCGGACAGCAAGCTGACGTAAGGGGTGTGTAAGTC
CCCATTAGACGCAGCATGCTAGTCGATCCAGCGCATAAAACCCCTT
TTGCCGGCGCTTTAAGCGGAGAGTCGCGCGCCGTAGCTGTGTGTG
GCAGCATTATTTAGCGCGCTATATAGCGGCGTGGGGGGGCCCGCA
CACACACATTCGCTGAGAGGACCAGCAGCGACATTATACTCTGTGC
AGAGGGGAAACTCTCTAGAGCAGTCTCTCGAGAGTCTTTTCAATTA
CACATAAATTTGCGCGCTTGTGTGCACCACCCACCCCTTAGGGTC
CCATATGCGCTCTGGTAGGCTCGGGATATATGCTCCTGAGCAAATG
CCATATATAGGGCTCGATGCTTCGTAGGATGG TTGGGAAACCCAG
AATATGTACGTAGCTAGCTGAAAGCTGGCTAGCCTGACCCCTGTA
CGCGGCTTACCATCGGTAGCCTTTACTAAGCTGATCGCAGCGCTGC
CATTATCATTTAAAGGCTCCGATCGATCGTTTCCGATCGCTAAACC
TTTACAAAGTCCGCGCGTAGCGATTATATACGTCAGTCTAAGGTGT
CAGATCGGCATCGATGCTACCGTCGACTTTTAGTTTTAAATACTTTA
AAGGGGTCGCGCGTATCTCGATTTGAAAAGTGCAGTCCCAGGTTG
CACACGTTGGGGTACAAATTCGATGCTCTGAATTTCCGGTACGCGC
CACATGCTCGATTCCGTTTCGCTTTAAACGCTCGTGGGTTAAACACT
AGCTGATGCAGCTGGGACCAATTCGCGTAGCTTACAAGCAGGCTG
ACCAGCTGATCGATTTCCCGGGACATCGACGATAGCTAAATGGTGC
ACCAGAAAATCGCTCGCGCTAGAGATCGTTTTCCGGAACCCCTCACTG
CCATAATTTCCCGGACAGCAAGCTGACGTAAGGGGTGTGTAAGTC
CCCATTAGACGCAGCATGCTAGTCGATCCAGCGCATAAAACCCCTT
TTGCCGGCGCTTTAAGCGGAGAGTCGCGCGCCGTAGCTGTGTGTG
GCAGCATTATTTAGCGCGCTATATAGCGGCGTGGGGGGGCCCGCA
CACACACATTCGCTGAGAGGACCAGCAGCGACATTATACTCTGTGC
AGAGGGGAAACTCTCTAGAGCAGTCTCTCGAGAGTCTTTTCAATTA
CACATAAATTTGCGCGCTTGTGTGCACCACCCACCCCTTAGGGTC
CCATATGCGCTCTGGTAGGCTCGGGATATATGCTCCTGAGCAAATG
CCATATATAGGGCTCGATGCTTCGTAGGATGG TTGGGAAACCCAG



AATATGTACGTAGCTAGCTGAAAGCTGGCTAGCCTGACCCCTGTA
 CGCGGCTTACCATCGGTAGCCTTTACTAAGCTGATCGCAGCGCTGC
 CATTATCATTTAAAGGCTCCGATCGATCGTTTCCGATCGCTAAACC
 TTTACAAAGTCCGCGCGTAGCGATTATATACGTCAGTCTAAGGTGT
 CAGATCGGCATCGATGCTACCGTCGACTTTTAGTTTTAAATACTTTA
 AAGGGGTCGCGCGTATCTCGATTTGAAAAGTGCAGTCCCGAGGTTG
 CACACGTTGGGGTACAAATTCGATGCTCTGAATTTCCGGTACGCGC
 CACATGCTCGATTCCGTTTCGCTTTAAACGCTCGTGGGTTAAACCACT
 AGCTGATGCAGCTGGGCACCAATTCGCGTAGCTTACAAGCAGGCTG
 ACCAGCTGATCGATTTCCCGGGACATCGACGATAGCTAAATGGTGC
 ACCAGAAAATCGCTCGCGCTAGAGATCGTTTTCCGGAACCCCTCACTG
 CCATAATTTCCCGGACAGCAAGCTGACGTAAGGGGTGTGTAAGTC
 CCCATTTAGACGCAGCATGCTAGTCGATCCAGCGCATAAAACCCCTT
 TTGCCGGCGCTTTAAGCGGAGAGTCGCGCGCCGCTAGCTGTGTGTG
 GCAGCATTATTTAGCGCGCTATATAGCGGCGTGGGGGGGCCCGCA
 CACACACATTCGCTGAGAGGACCAGCAGCGACATTATACTCTGTGC

 AGAGGGGAAACTCTCTAGAGCAGTCTC**T**CGAGAGTCTTTTCAATTA
 CACATAAATTTGCGCGCTTGTGTGCACCACCCACCCCTTAGGGTC
 CCATATGCGCTCTGGTAGGCTCGGGATATATGCTCCTGAGCAAATG
 CCATATATAGGGCTCGATGCTTCGTAGGATGG TTGGGAAACCCAG
 AATATGTACGTAGCTAGCTGAAAGCTGGCTAGCCTGACCCCTGTA
 CGCGGCTTACCATCGGTAGCCTTTACTAAGCTGATCGCAGCGCTGC
 CATTATCATTTAAAGGCTCCGATCGATCGTTTCCGATCGCTAAACC
 TTTACAAAGTCCGCGCGTAGCGATTATATACGTCAGTCTAAGGTGT
 CAGATCGGCATCGATGCTACCGTCGACTTTTAGTTTTAAATACTTTA
 AAGGGGTCGCGCGTATCTCGATTTGAAAAGTGCAGTCCCGAGGTTG
 CACACGTTGGGGTACAAATTCGATGCTCTGAATTTCCGGTACGCGC
 CACATGCTCGATTCCGTTTCGCTTTAAACGCTCGTGGGTTAAACCACT
 AGCTGATGCAGCTGGGCACCAATTCGCGTAGCTTACAAGCAGGCTG
 ACCAGCTGATCGATTTCCCGGGACATCGACGATAGCTAAATGGTGC
 ACCAGAAAATCGCTCGCGCTAGAGATCGTTTTCCGGAACCCCTCACTG
 CCATAATTTCCCGGACAGCAAGCTGACGTAAGGGGTGTGTAAGTC
 CCCATTTAGACGCAGCATGCTAGTCGATCCAGCGCATAAAACCCCTT
 TTGCCGGCGCTTTAAGCGGAGAGTCGCGCGCCGCTAGCTGTGTGTG
 GCAGCATTATTTAGCGCGCTATATAGCGGCGTGGGGGGGCCCGCA
 CACACACATTCGCTGAGAGGACCAGCAGCGACATTATACTCTGTGC
 AGAGGGGAAACTCTCTAGAGCAGTCTCTCGAGAGTCTTTTCAATTA
 CACATAAATTTGCGCGCTTGTGTGCACCACCCACCCCTTAGGGTC
 CCATATGCGCTCTGGTAGGCTCGGGATATATGCTCCTGAGCAAATG
 CCATATATAGGGCTCGATGCTTCGTAGGATGG TTGGGAAACCCAG

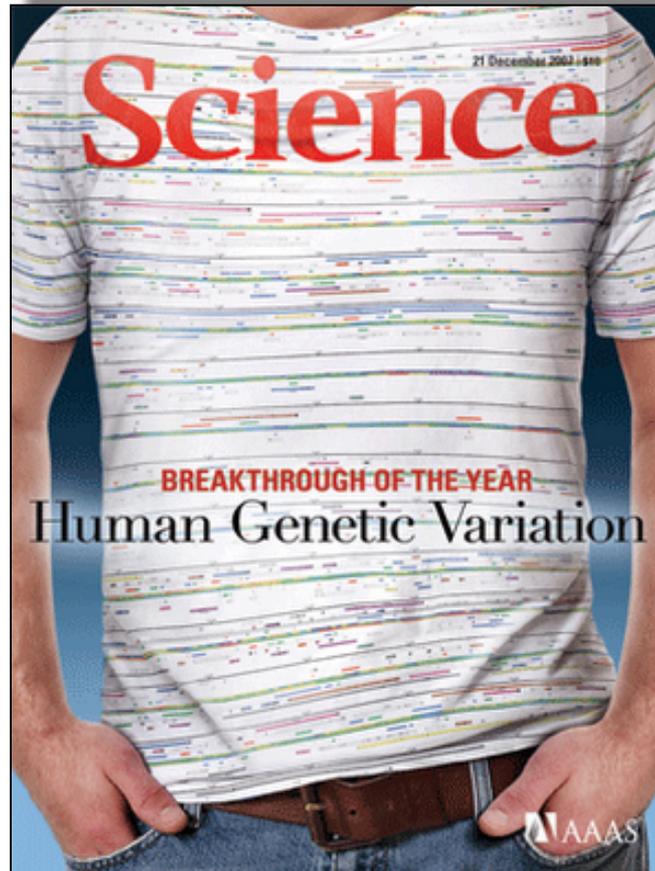


La sequenza del genoma deve essere decodificata

redkifhtpmvnglornepwajajamgensertoalingedore
rsquestorgacvgenefteiopcodificacerperdiamunafino
proteinamanrschederzatgdeterminahulanutsegdroe
sieteksifnhcapacidatedifarearrotolarekidgtreladjfilo
linguajduenthkoppurendjucfnbvnohfteosnabaoei
derberloporvretinolesuccodiewislesrtofrecigolprm



Variazioni della struttura dei geni sono le maggiori determinanti delle varianti tra individui

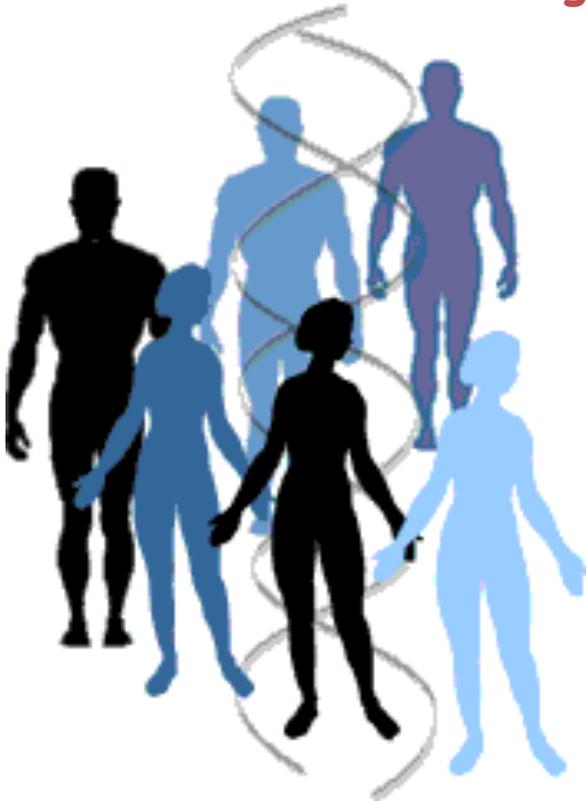


**Tra le varianti contiamo la suscettibilità alle malattie
L'impatto di queste varianti sullo stato di salute va da un effetto nullo alla letalità**

I diversi individui mostrano differenze nelle loro sequenze di DNA

Tra due persone scelte a caso si calcola che esista
1 differenza ogni 1.200/1.500 basi

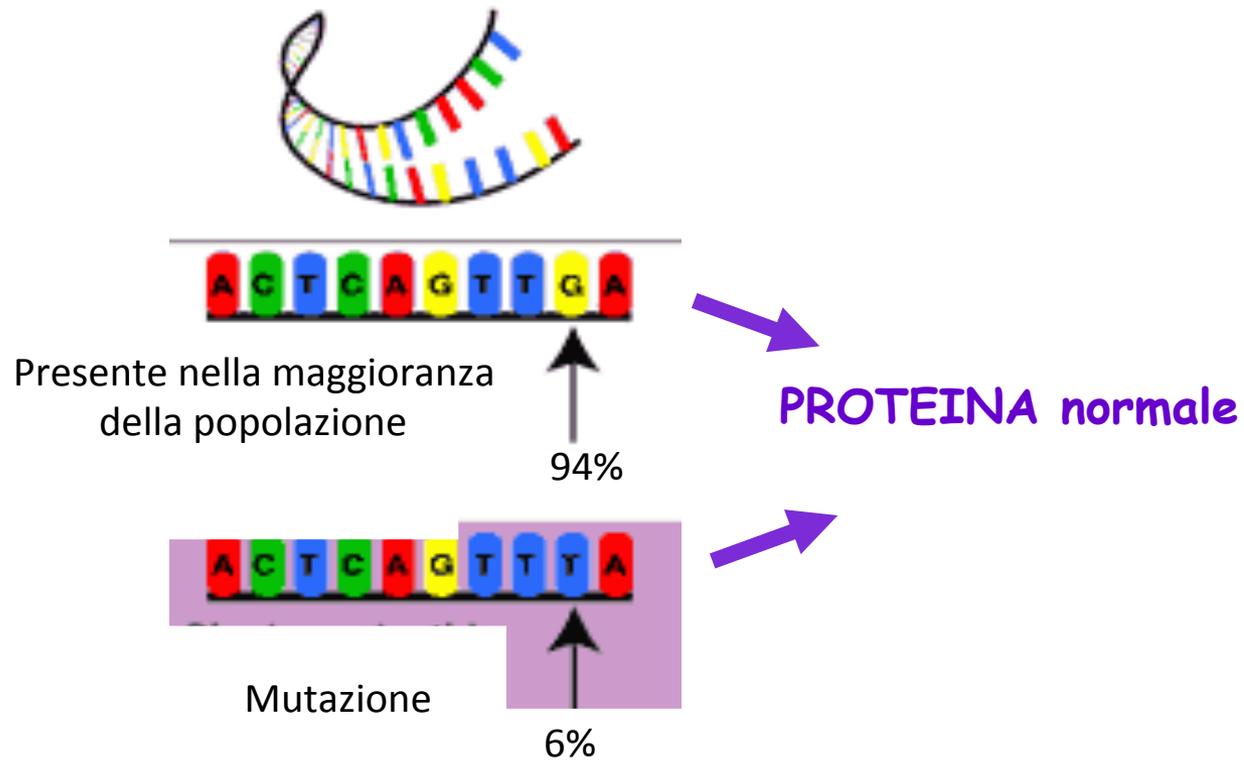
Poiché un genoma conta 3×10^9 basi,
significa che due persone sono uguali al 99.9%



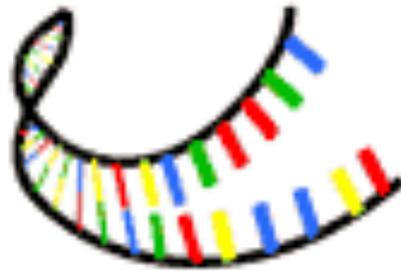
Polimorfismo

(molte forme)

Nella maggior parte dei casi le mutazioni non determinano effetti dannosi



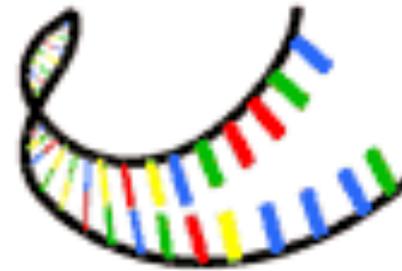
In alcuni casi il cambiamento provoca sostituzioni dannose e la possibile insorgenza di malattie



Presente nella
maggioranza della
popolazione (99.9%)



PROTEINA normale

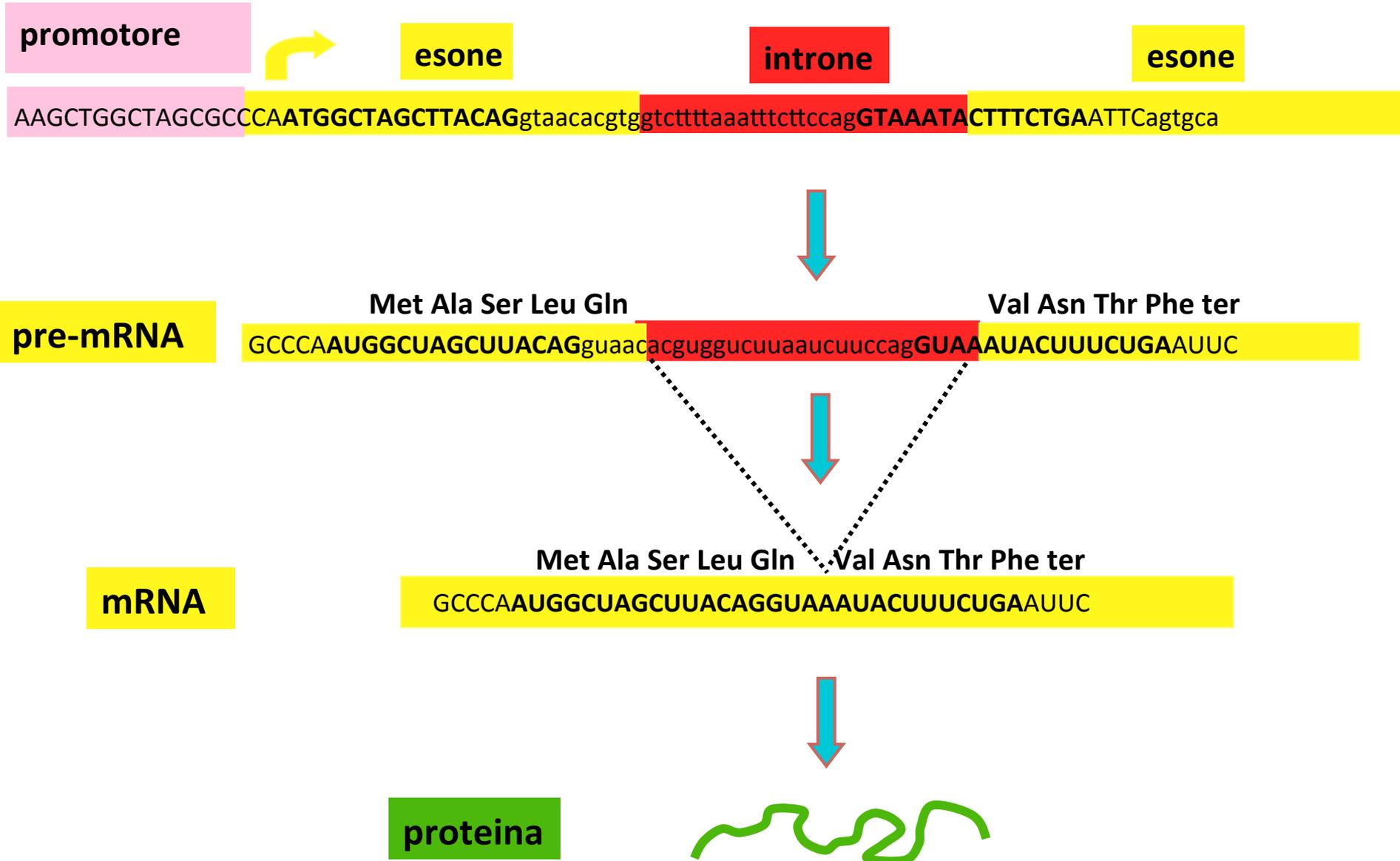


Mutazione
dannosa (0.1%)



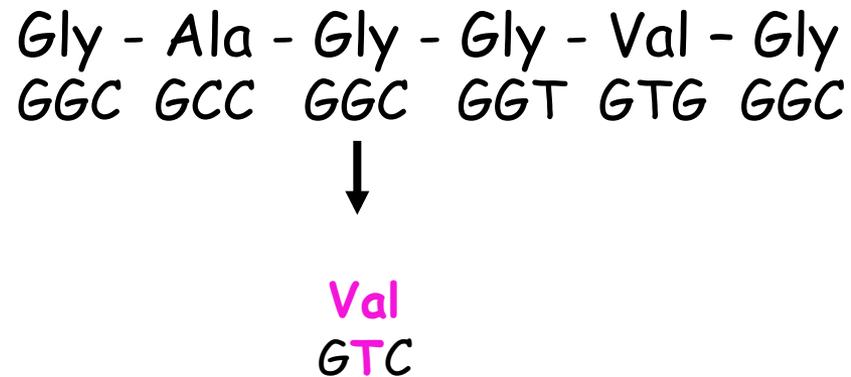
**PROTEINA assente o
malfunzionante**

Struttura discontinua del gene eucariotico



Con il clonaggio del DNA si sono potuti studiare i geni normali e quelli mutati e capire la base molecolari di molte patologie.
L'effetto del malfunzionamento puo' portare anche a effetto deleteri più generali quali il mancato controllo della crescita cellulare

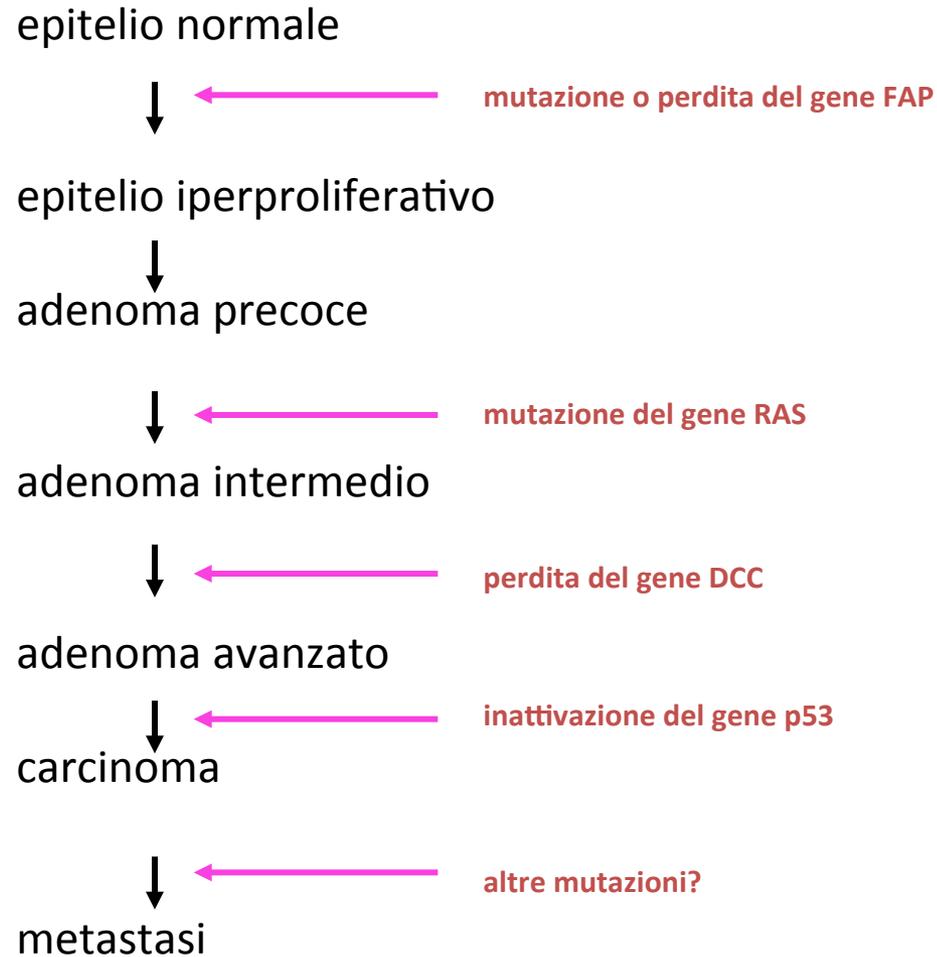
La proteina Ras nel carcinoma della vescica presenta una singola sostituzione nucleotidica (Gly-Val)



Questo fa si che la proteina rimanga sempre attiva → stimolo proliferativo

Questa mutazione da sola non è in grado di determinare l'insorgenza della neoplasia
I tumori sono eventi multifattoriali

Cancro colo-rettale



L'ordine di questi eventi genetici non è obbligatorio. E' l'effetto cumulativo che dettrmina lo sviluppo del tumore

APPLICAZIONI

1) Diagnostica

- a) screening di portatori
- b) identificazione della malattia prima che si manifesti (prenatale)
- c) controllo nell'evoluzione di un trattamento chemioterapico

Talassemie

Morbo di Huntington (dominante) - Colpisce a 30/40 anni - degenerazione sistema nervoso

Sindrome di Down

CONSULENZA GENETICA

RIVOLTA A CHI

- individui affetti
- genitori o coppie a rischio
- gruppi di popolazione

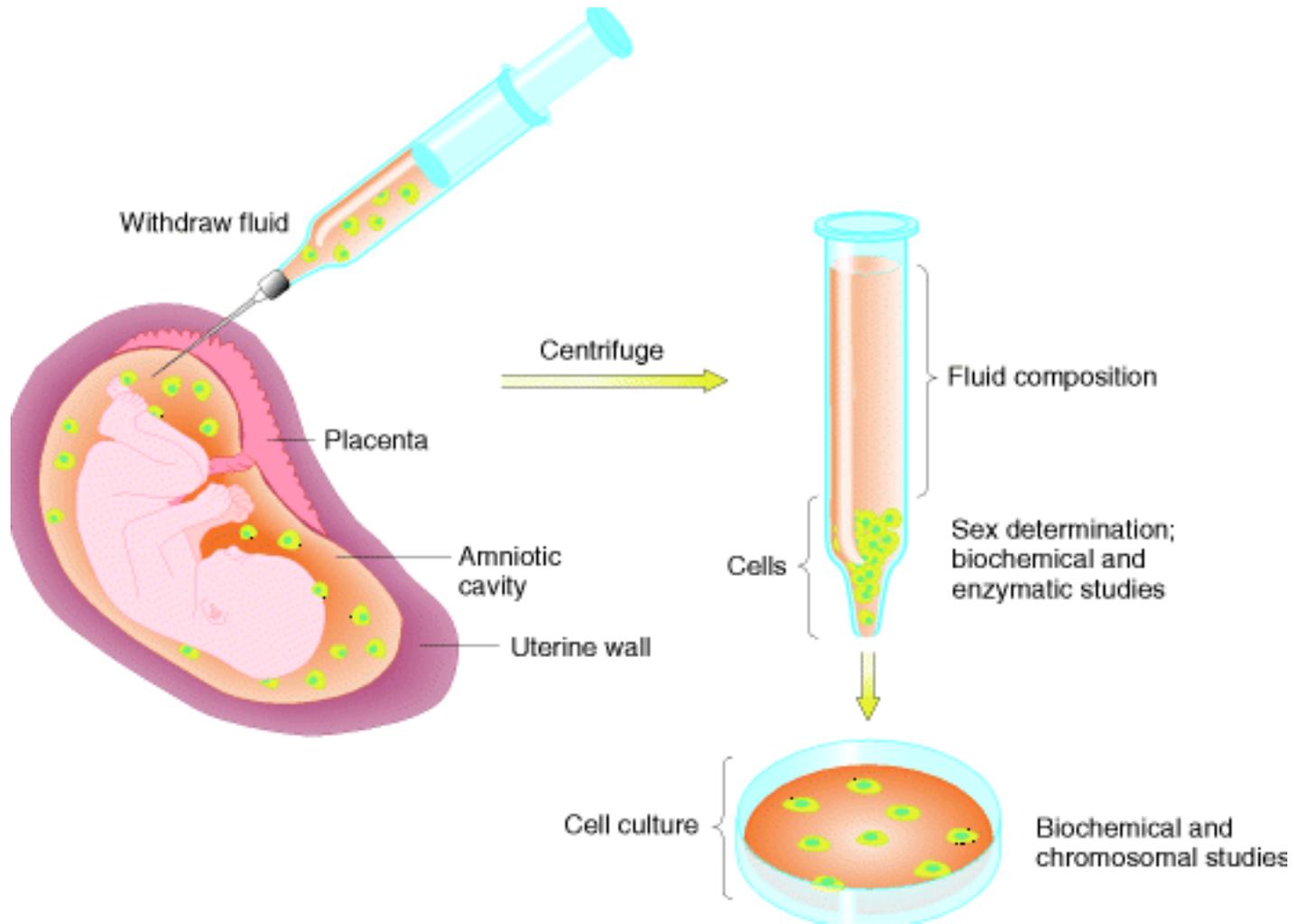
QUANDO

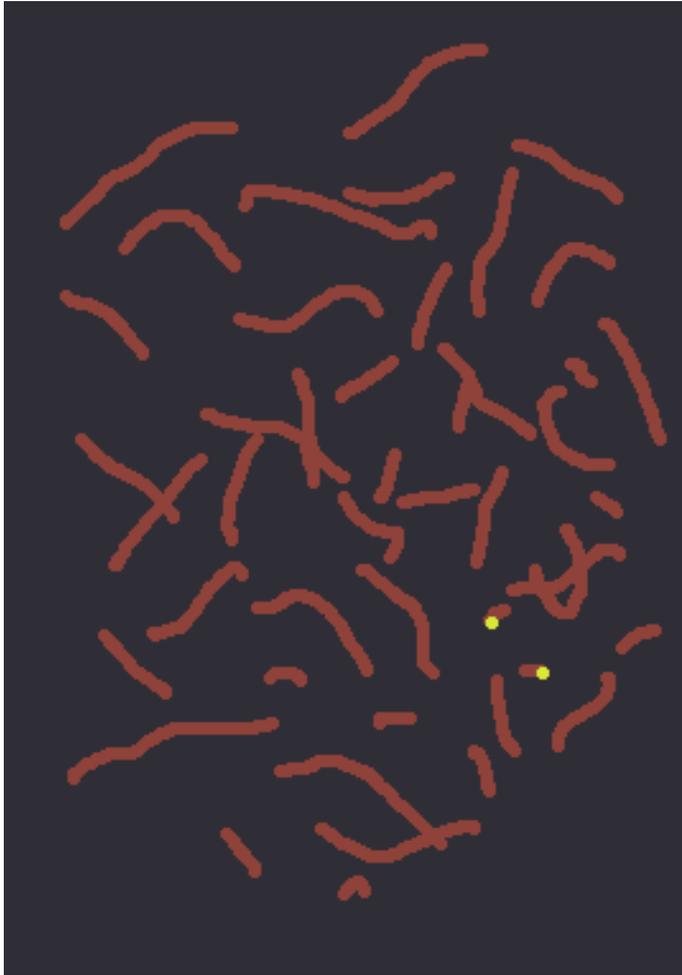
- dopo la nascita di un soggetto affetto
- in epoca preconcezionale o prenatale
 - collegata a screening genetici

PERCHE'

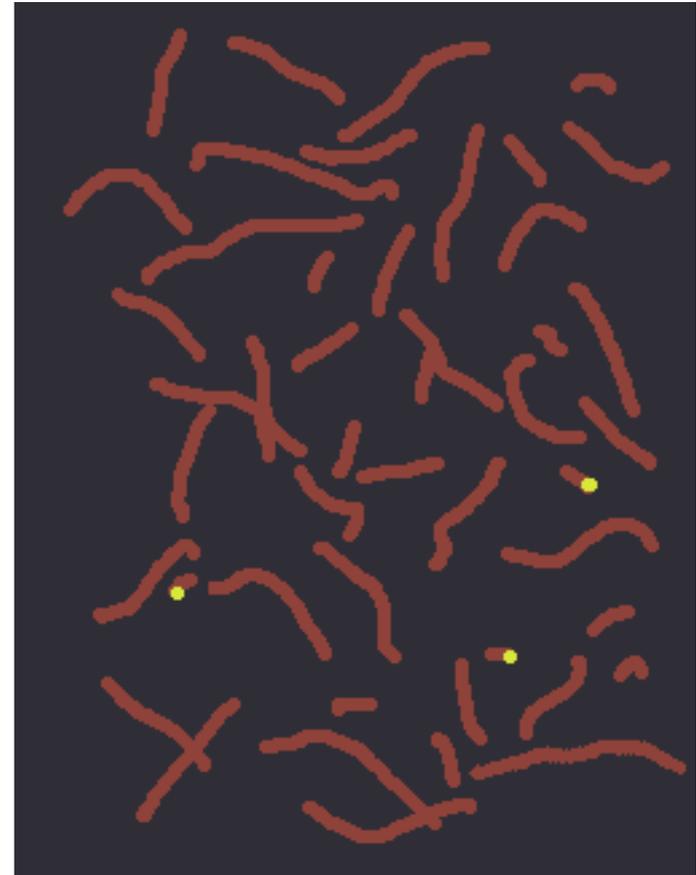
- informare i genitori sulla malattia
- valutare e comunicare i rischi procreativi
- aiutare ad accettare la condizione genetica
 - prevenire le malattie genetiche

Diagnosi prenatale





normale



trisomia 21

Analisi FISH - ibridazione in situ con una sonda per il cr. 21

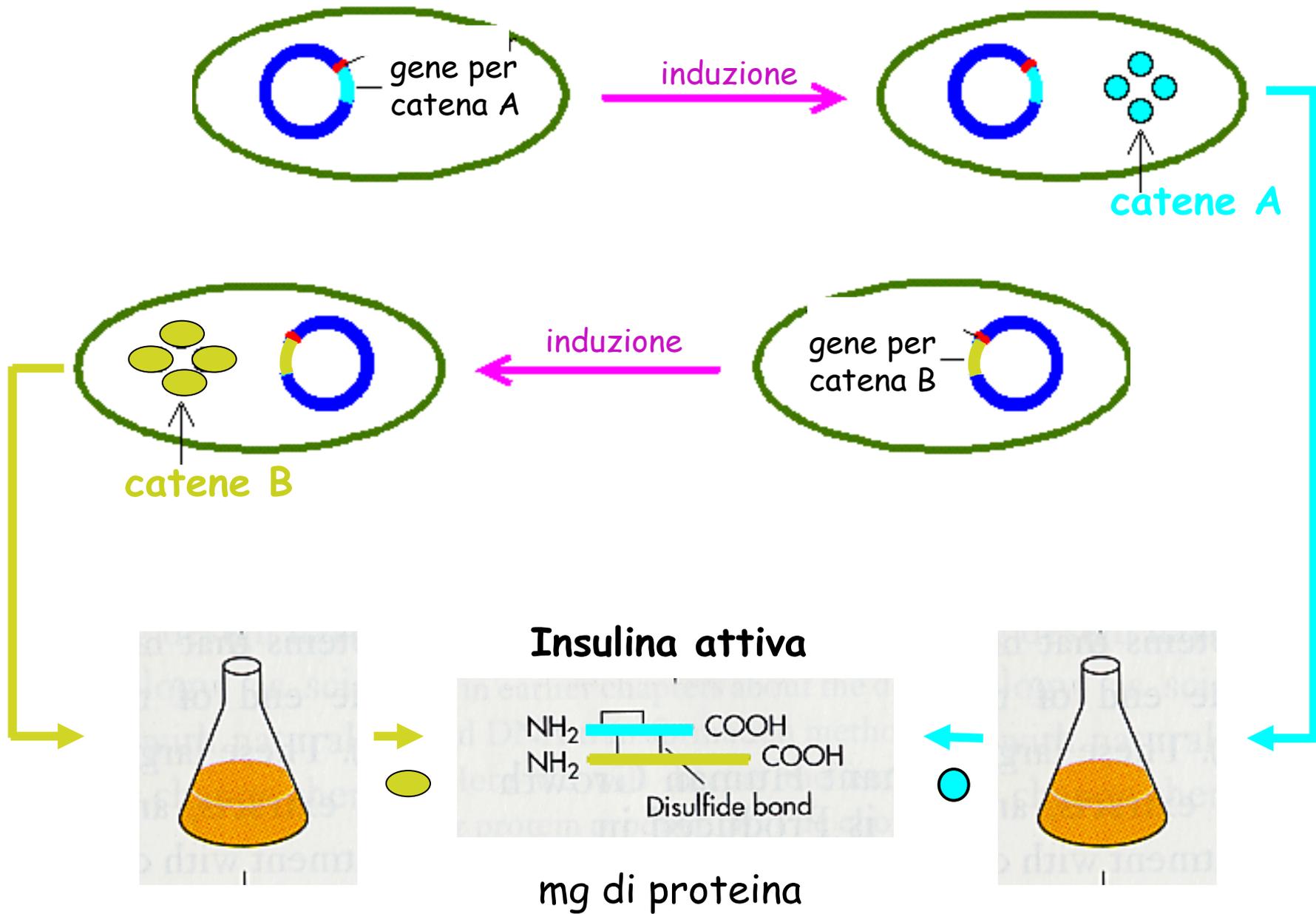
APPLICAZIONI

2) Produzione sostanze utili (fabbrica di proteine)

- emofilia - fattore VIII e IX (da plasma - pericolo AIDS)
- ormone della crescita (ipofisi di cadaveri)
- insulina (da pancreas bovino)

Svantaggi: eterologhe o difficili da ottenere (omologhe controllare meglio la sicurezza del farmaco)

Produzione di insulina ricombinante



APPLICAZIONI

3) Terapia genica

Il passo successivo a quello di produrre farmaci è quello di poter curare permanentemente una determinata malattia.

Per molte patologie non sono disponibili farmaci adeguati (TALASSEMIA).

Esempio: infezioni da HIV - immunizzazione intracellulare (far sì che la cellula si difenda dalla replicazione del virus)

TERAPIA GENICA

Trattamento di patologie umane in cui il farmaco è
materiale genetico

Nuovo metodo di cura basato sull'introduzione di "geni terapeutici"
nell'organismo malato.

A differenza di un farmaco c'è correzione permanente del difetto
genetico alla base della patologia

Il "gene terapeutico" sostituisce la copia deteriorata o ne "cura" la
funzione.

Terapia genica possibile nell'uomo solo su cellule somatiche; non su
cellule germinali per problemi bioetici.

Sapendo qual'è il gene mutato,
possiamo intervenire per
ripristinarne la funzione?

L'approccio più diretto è quello di fornire una copia "sana"

o

di intervenire per "curarne" la funzione

Storia clinica della terapia genica

- E' cominciata nel 1990 con trattamento *ex vivo* di pazienti affetti da immunodeficienza combinata (SCID-ADA).
- Ad oggi, più di 300 protocolli clinici sono stati approvati, tutti su cellule somatiche.
- Più di 3000 pazienti sono stati trattati.
- Ancora pochi studi sono in fase clinica II o III.

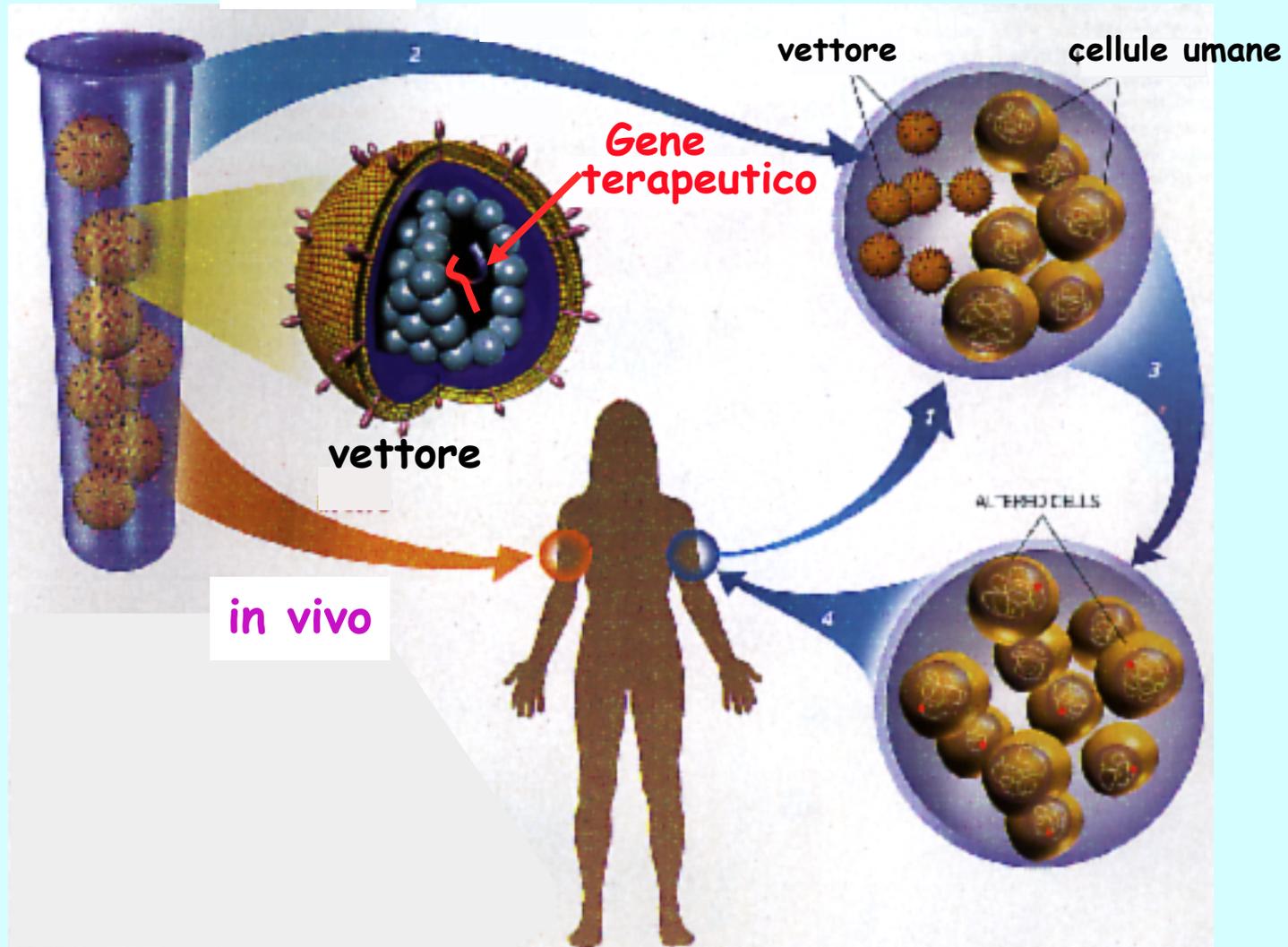
Molti sono ancora i problemi da superare

Patologie potenzialmente curabili dalla terapia genica

<i>Patologia</i>	<i>Difetto</i>	<i>Incidenza</i>	<i>Cellule bersaglio</i>
Immunodeficienza combinata (SCID/ADA)	Adenosina deaminasi	Rara	Cellule del midollo osseo oppure linfociti T
Emofilia			
A	Mancanza di Fattore VIII	1:10,000 maschi	Fegato, muscolo, fibroblasti
B	Mancanza di Fattore IX	1:30,000 maschi	
Ipercolestolemia	Mancanza del recettore per la low-density Lipoprotein (LDL)	1:1 milione	Fegato
Fibrosi cistica CFTR		1:3,000 caucasici	Vie aeree
Emoglobinopatie: Talassemie/SCA	Difetti nei geni della α - o β -globina	1:600 in alcuni gruppi etnici	Cellule del midollo osseo precursori dei globuli rossi
Distrofia muscolare di Duchenne	Distrofina	1:3,500 maschi	Fibre muscolari striate
Enfisema ereditario	Mancanza di α_1 -antitripsina	1:3,500	Polmoni o fegato

La terapia genica può essere *in vivo* oppure *ex vivo*

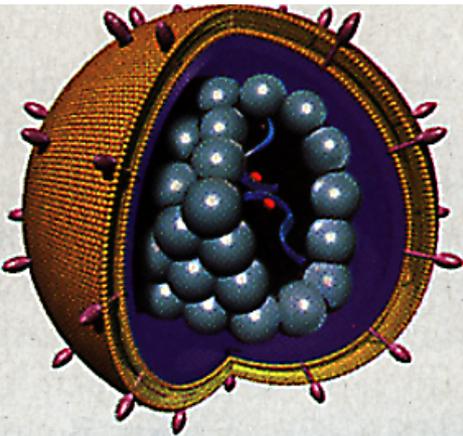
ex vivo



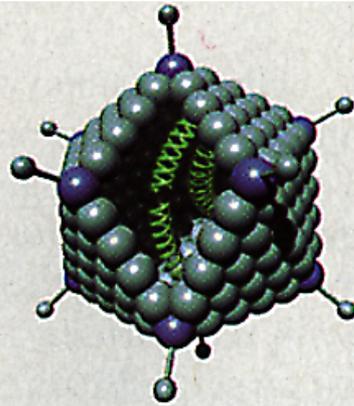
Vettori di terapia genica comunemente utilizzati

Virali

Non virali



Retroviruses
Lentiviruses



Adenoviruses
HD Adenoviruses



Adeno-Associated
Viruses



Liposomes



"Naked" DNA

IMMUNODEFICIENZA CONGENITA GRAVE (SCID)

dovuta alla carenza dell'enzima ADENOSIN DEAMINASI (ADA)
(catalizza la deaminazione dell'adenosina e della
deossiadenosina rispettivamente ad inosina deossinosina)

La deficienza di ADA, causata da una serie di mutazioni autosomiche recessive, porta all'accumulo intracellulare di deossiadenosina particolarmente tossica per i LINFOCITI T ed in misura minore per i LINFOCITI B.

**Tutto ciò porta ad un indebolimento del
SISTEMA IMMUNITARIO.**

TRATTAMENTI PER PAZIENTI ADA-SCID

1) TRAPIANTO DI MIDOLLO OSSEO

2) PEG-ADA (farmaco)

3) TERAPIA GENICA SU CELLULE SOMATICHE



primi esperimenti su CELLULE di MIDOLLO OSSEO

attuali esperimenti su LINFOCITI T del SANGUE PERIFERICO (PBLs)

DNA codificante ADA clonato in vettori retrovirali



SCELTA DEI PAZIENTI PER LA TERAPIA GENICA

- 1) I pazienti affetti da ADA-SCID mancano di un donatore compatibile per il trapianto di midollo osseo
- 2) Tutti i pazienti SCID saranno trattati per almeno 6 mesi con PEG-ADA fino a quando non compariranno fenomeni allergici
- 3) I pazienti non devono essere affetti da HTLV-1, HIV-1.
- 4) I pazienti non devono avere tumori.

APPLICAZIONI

4) Sequenziamento del genoma umano

- 1) identificazione di tutte le proteine codificate dal genoma
- 2) quali geni si esprimono in quali cellule
- 3) geni regolatori
- 4) identificare le basi molecolari di patologie complesse (diabete, arteriosclerosi....)
- 5) complessi di geni attivati in determinati tumori
- 6) identificare la suscettibilità individuale a specifici farmaci

5) Animali transgenici

- a) modelli di laboratorio (importanti per capire la dinamica di certe malattie - cancro, AIDS)
- b) animali rinforzati (maiali corretti con ormone della crescita)
- c) produzione proteine (fattore IX espresso dalla ghiandola mammaria della pecora)

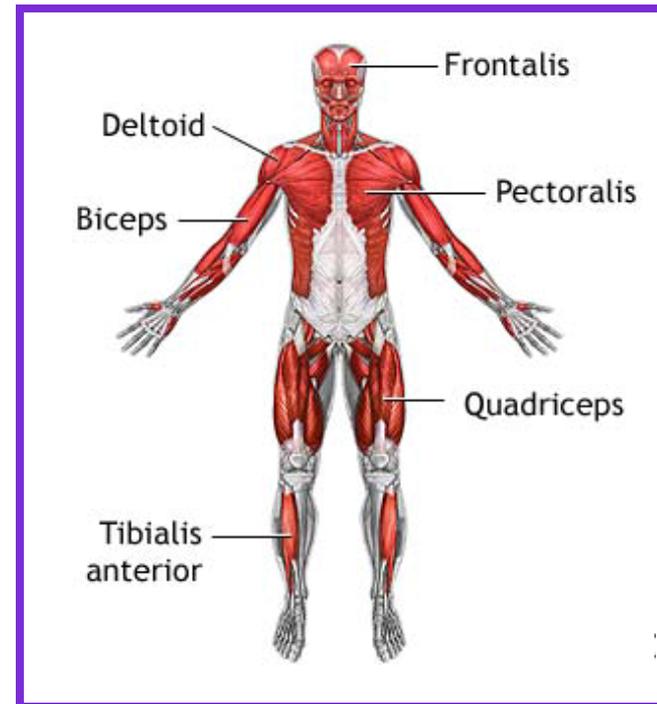
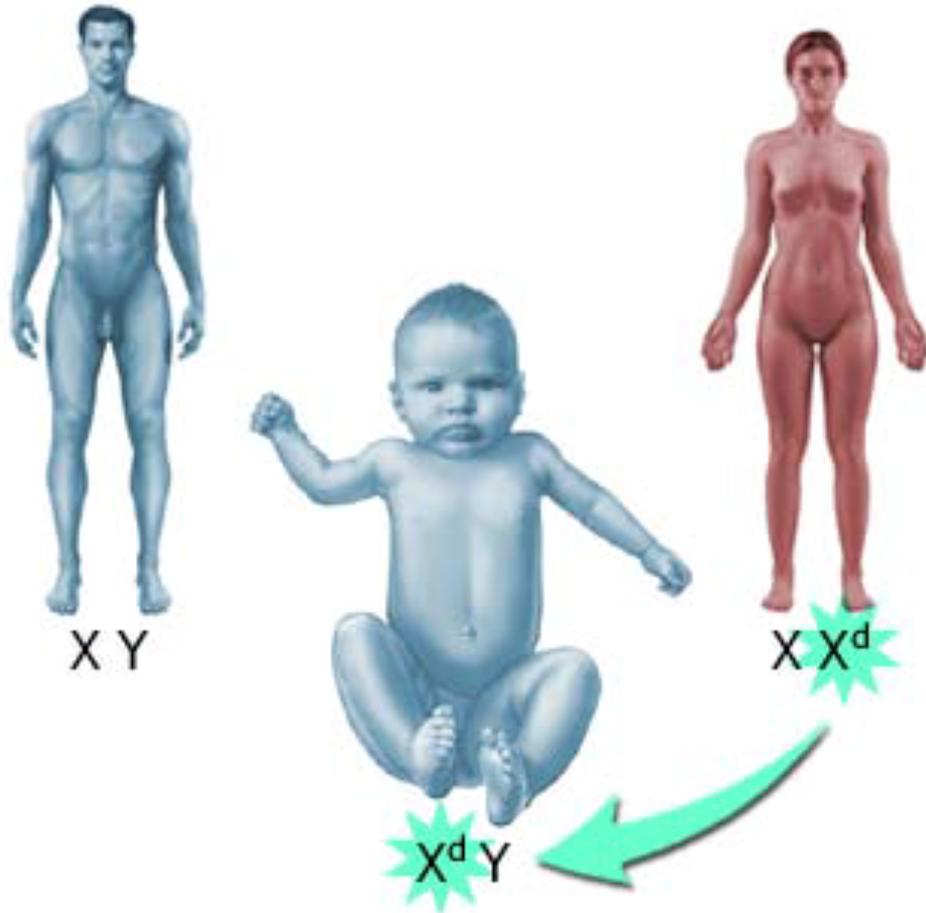
Links utili:

<http://gnn.tigr.org/>

<http://health.yahoo.com>

<http://www.telethon.it>

Difetto genetico legato al cromosoma X - trasmesso dalla madre ai figli maschi

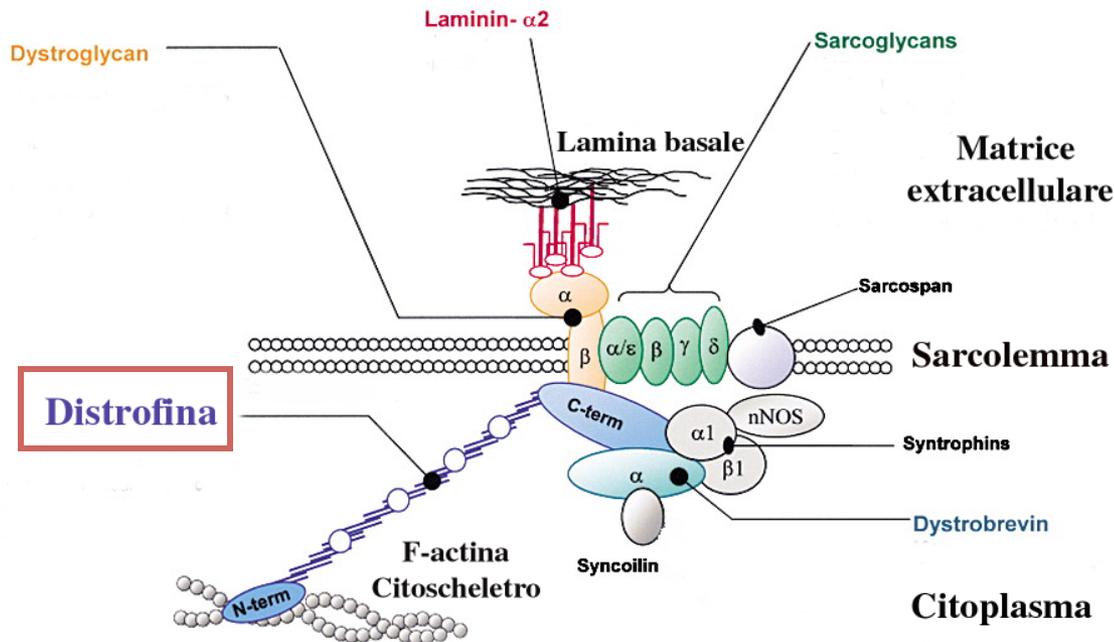
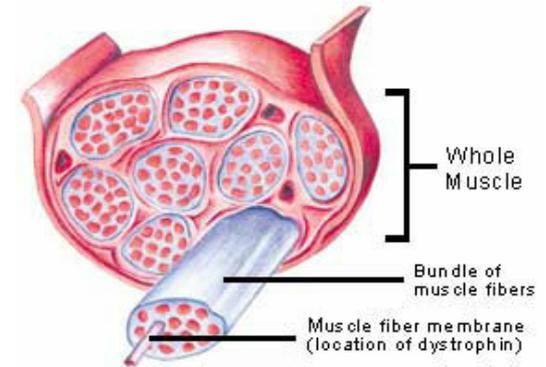


Distrofia Muscolare di Duchenne



Distrofia muscolare di Duchenne (DMD)

- incidenza: 1 su 3500 maschi nati vivi;
- causa: la totale assenza della proteina citoscheletrica *distrofina* nei tessuti muscolari.



Distrofina

- proteina= 427 KDa
- DNA= 2,5 Mb
- cDNA= 14 Kb