

Le biotecnologie



Le biotecnologie possono essere definite come
"ogni tecnologia che utilizza organismi viventi
(batteri, lieviti, cellule vegetali, cellule animali di
organismi semplici o complessi)
o loro **componenti sub-cellulari purificati**
(organuli, componenti molecolari...)
al fine di
ottenere notevoli quantità di prodotti utili,
oppure per
migliorare le caratteristiche di piante e animali o,
per sviluppare microrganismi utili per specifici usi".

BIOTECNOLOGIE

- 1. L'evoluzione della rivoluzione**
- 2. Bioteecnologie classiche**
- 3. Nuove bioteecnologie**
 - tecnologia delle colture cellulari
 - la tecnologia del DNA ricombinante
- 4. L'insulina**
- 5. Il clonaggio del DNA**
- 6. I colori delle bioteecnologie**



L'evoluzione della rivoluzione ...



2000 a.C.

Gli Egiziani e i Sumeri imparano a produrre birra e formaggi

4000 a.C.

Gli Egiziani sono maestri nell'arte della produzione di vino.



500 a.C.

In Cina, grumi ammuffiti di semi di soia rappresentano il primo antibiotico, usati per il trattamento di infezioni e malattie



8000 a.C.

I Greci sviluppano tecniche di innesto per la coltivazione selettiva delle piante.

.

.

.

.

.

.

.

.

.

.



1590

Un fabbricante di occhiali olandese, Zacharias Janssen, inventa il microscopio.



1675

Lo studente olandese di storia naturale e fabbricante di microscopi Antonij van Leeuwenhoek scopre i batteri.



1833

Scoperta ed isolamento del primo enzima.

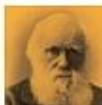


1838

Il chimico svedese Jöns Jakob Berzelius scopre le proteine.



Scoperta del batterio Escherichia coli. Più tardi diventerà un potentissimo strumento di ricerca, sviluppo e produzione in campo biotecnologico.



1855

Viene pubblicato "L'Origine delle specie", pietra miliare di Charles Darwin.



1859



1885

Scoperto il vaccino contro la rabbia. Pasteur vaccina un ragazzo che era stato morso da un cane rabbioso. Il vaccino era stato ottenuto dall'estratto della colonna vertebrale di un coniglio affetto da rabbia. Tutt'oggi viene utilizzata una versione modificata di quel vaccino, che ha salvato centinaia di vite.



1861

Il chimico francese Louis Pasteur sviluppa la pasteurizzazione, un processo che protegge il cibo uccidendo col calore i microbi dannosi.



1865

Dopo aver coltivato e testato piante di pisello per sette anni, Gregor Mendel pubblica una descrizione delle regole che determinano come i tratti ereditari siano trasmessi alla prole: è la fondazione della genetica moderna.



1870-1910

Il padre del miglioramento genetico vegetale Luther Burbank sviluppa più di 800 nuovi ceppi di frutta, verdura e fiori. La patata resistente alle malattie fungine da lui sviluppata viene ampiamente piantata in tutta l'Irlanda, determinando la fine della Grande Carestia irlandese. Il botanico William James Beal produce in laboratorio il primo ibrido sperimentale di mais.



1839-1855

Gli scienziati tedeschi Matthias Schleiden e Theodor Schwann affermano che tutti gli organismi sono costituiti da cellule.

Il fisico prussiano Rudolf Virchow dichiara:

„Ogni cellula deriva da un'altra cellula“



1663

Il fisico-matematico ed inventore inglese Robert Hooke scopre l'esistenza delle cellule.

1796

Viene scoperto il primo vaccino contro il vaiolo. Edward Jenner scopre il processo della vaccinazione inoculando in un bambino il vaiolo delle mucche e poi reinfettandolo col vaiolo umano. Il bambino era guarito dalla forma più leggera del vaiolo di mucca, diventando così immune al vaiolo umano. Il virus del vaiolo è stato chiamato "Vaccinia", dal termine latino per la mucca, "Vacca". Da qui nasce il termine "vaccino".

1919

In una stampa viene utilizzato, per la prima volta il termine **biotecnologia**

**1919****1942**

Fermentando su larga scala la muffa del melone di Cantalupo, il microbiologo americano Andrew Moyer sviluppa una tecnica per produrre enormi quantità di penicillina, rilanciandola come "farmaco miracoloso".

**1922****1941**

A Toronto, il Dott. Frederick Banting e il suo assistente Charles Best scoprono l'insulina come trattamento per il diabete.

"Ingegneria genetica" una tecnica che consiste nel trasferimento di una determinata porzione di materiale genetico da un organismo all'altro.

**1953**

James Watson e Francis Crick sono i primi a descrivere la struttura a doppia elica del DNA.

**1928**

Il batteriologo scozzese Sir Alexander Fleming scopre le caratteristiche antibiotiche della penicillina.

**1961**

Scoperta del "filamento stampo" RNA messaggero. L'RNA messaggero gioca un ruolo fondamentale della sintesi proteica. Gli RNA messaggeri, noti anche come mRNA, sono molecole di RNA che trasportano l'informazione genetica dal DNA nel nucleo della cellula al complesso di creazione delle proteine nel citoplasma cellulare. Per diverso tempo dopo la scoperta della funzione genetica del DNA e la decifrazione della sua struttura a doppio filamento (grazie a Watson e Crick), i ricercatori non hanno saputo esattamente come l'informazione genetica venisse portata dai geni al citoplasma per produrre le proteine richieste dalle funzioni cellulari.

Nel 1965, i biologi francesi François Jacob, Jacques Monod hanno ricevuto il Premio Nobel per la Fisiologia e la Medicina per il loro contributo in questa ricerca.

**1968**

Marshall W. Nirenberg e Har Gobind Khorana vincono il Premio Nobel per aver decifrato il codice genetico dei 20 amminoacidi, permettendo così ai ricercatori di affermare che il codice genetico è universale in tutti gli organismi viventi.

1970

Lo scienziato svizzero Werner Arber scopre che i batteri si difendono dai virus tagliando il DNA virale mediante specifici enzimi di restrizione. Questi enzimi sono oggi ampiamente usati nelle moderne tecnologie che usano il DNA.

1973

Stanley Cohen e Herbert Boyer sviluppano la tecnologia del DNA ricombinante. Considerata come la nascita della moderna biotecnologia, hanno completato il primo esperimento di ingegneria genetica di successo inserendo in DNA batterico un gene proveniente da una rana acquatica.

**1976****1970**

Normal Borlaug diventa il primo coltivatore di piante a vincere un Premio Nobel per le nuove varietà di grano che aumentano i raccolti del 70%. Ciò segna l'inizio della Rivoluzione Verde nel mondo dell'agricoltura. Il microbiologo americano Daniel Nathans scopre il primo enzima di restrizione che può tagliare in pezzi il DNA per studi e applicazioni varie. La tecnica degli enzimi di restrizione diventa uno strumento fondamentale nella ricerca genetica moderna, aiutando a creare l'industria biotecnologica e ponendo le basi per il Progetto Genoma Umano.

Il termine "biotecnologia" fu coniato nel 1919 dall'agronomo ungherese Karoly Ereky che gli attribuì la seguente definizione: **tutte le linee operative che rendono prodotti a partire dalle materie prime con l'ausilio di organismi viventi**.

**1943**

Lo scienziato canadese Oswald Theodore Avery isola del DNA puro.



Per la prima volta è determinata, per uno specifico gene, la sequenza delle copie di basi che si combinano per formare il DNA.

**1971**

Prima sintesi completa di un gene. Primo DNA ottenuto da geni provenienti da diversi organismi.



1984

Viene scoperta l'impronta genetica, usata oggi per stabilire le relazioni familiari e identificare i sospetti criminali.



1982

Viene sviluppato il primo vaccino da DNA ricombinante per uso animale.



1986

Per la prima volta negli USA, le prime piante geneticamente modificate vengono fatte crescere all'aperto nei campi. Si tratta di piante di tabacco geneticamente modificate.



1977

Herbert Boyer, fondatore della pioniera azienda biotecnologica Genentech, usa il batterio *E. coli* per produrre l'insulina umana. La tecnica rappresenta un miglioramento significativo nell'efficienza e nella realizzabilità a lungo termine della produzione di questa terapia medica vitale, precedentemente estratta da scorte limitate dei tessuti animali che potevano determinare reazioni allergiche. La stragrande maggioranza dell'insulina è oggi prodotta grazie a questo metodo.



1990

La chimosina, un enzima impiegato nella produzione del formaggio, diventa, in Canada, uno dei primi prodotti utilizzati nella catena alimentare a derivare da tecniche ricombinanti. Normalmente estratto dal caglio, enzima complesso che si trova nello strato interno dello stomaco delle mucche, la chimosina è oggi prodotta direttamente in organismi come i batteri *E. coli*. Viene lanciato il Progetto Genoma Umano. Questo sforzo internazionale, della durata di 13 anni, per determinare la sequenza delle 3 miliardi di paia di basi che compongono il DNA di una persona, ha infine identificato 20.000-25.000 geni.



1998

Il verme *C. elegans* diventa il primo organismo pluricellulare di cui viene completamente sequenziato il genoma.



2003

2003 Viene completato il Progetto Genoma Umano. I ricercatori al Canada's Michael Smith Genome Sciences Centre alla British Columbia sono stati i primi a sequenziare il genoma del virus SARS.



2005

Il miliardesimo acro biotech è piantato da uno degli 8.5 milioni di agricoltori in uno dei 21 paesi.



2009

Il Winnipeg's National Microbiology Laboratory completa il primo sequenziamento genetico del virus dell'influenza H1N1, proprio mentre la malattia sta raggiungendo proporzioni pandemiche internazionali.



1989

Scoperta del gene difettivo causa della fibrosi cistica da parte del Dott. Lap-Chee Tsui al Toronto's Hospital for Sick Children. Successivamente, scoperte analoghe collegano geni specifici ad altre malattie, quali l'autismo, la Malattia di Huntington, e un raro problema cardiaco noto come Cardiomiopatia Ventricolare Destra. Ognuna di queste scoperte ha contribuito ad accrescere la conoscenza della complessa relazione tra la funzione di un gene e la malattia.



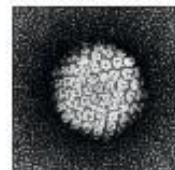
1997

Il mondo conosce la pecora Dolly, il primo animale clonato. L'UNESCO adotta la Dichiarazione Universale del Genoma Umano e dei Diritti Umani, riconoscendo il genoma umano come patrimonio dell'umanità che deve essere salvaguardato dalla manipolazione inappropriata.



2007

Il primo vaccino contro il papillomavirus umano. Il primo vaccino contro il papillomavirus umano – causa di un tipo di cancro – è approvato per essere usato su donne e ragazze in più di 80 paesi.



2009

Un team canadese di scienziati e ingegneri dell'Università di Toronto sviluppano un microchip con componenti nanometriche per individuare marcatori chimici per il cancro, una tecnica che potrebbe rendere la diagnosi molto più rapida.



Il Consorzio Internazionale di Sequenziamento del Genoma della Patata rilascia una bozza dell'intera sequenza del genoma della patata, la terza coltivazione più importante al mondo.



2011

Esperimenti sull'uomo del Vaccino contro la Malaria. Esperimenti sull'uomo del vaccino contro la malaria si stanno attualmente eseguendo e mostrano risultati positivi. Questo potrebbe essere il primo vaccino contro un'infezione da parassita. Accesso al trattamento per HIV/AIDS. Le Nazioni Unite adottano una dichiarazione politica atta ad aumentare a 15 milioni di persone, entro il 2015, l'accesso al trattamento dell'AIDS. In Europa, le disposizioni sono in condizione di avvio per raggiungere questo scopo. Gli scienziati biotecnologici europei hanno lanciato un test clinico di un farmaco biotech anti-HIV prodotto usando del tabacco geneticamente modificato – il primo degli studi di questo tipo, in Europa. Se lo studio in Fase I verrà eseguito con successo, seguiranno studi più ampi e i ricercatori già immaginano un nuovo anticorpo che potrà essere combinato con un altro farmaco per offrire una migliore protezione contro HIV/AIDS ad un prezzo molto inferiore, permettendo così un accesso più ampio al trattamento nei paesi più poveri.

2012

Bozza del Genoma del Grano. Un team internazionale pubblica una bozza del genoma del grano. Ibrido di tre erbe, il grano di razza possiede 3 genomi e più di 96.000 geni in una sola pianta, rendendolo così particolarmente difficile da decifrare.



2014

Un gruppo americano riesce ad espandere, in vitro, l'alfabeto genetico per includere due nucleotidi idrofobici artificiali, dSICS and dNaM. Floyd Romesberg e i suoi colleghi hanno dimostrato che le forme trifosfato di entrambi i nucleotidi vengono importate in E. coli ed efficientemente incorporate nel genoma senza che i meccanismi di riparazione del DNA li riconoscano come lesioni. Né la presenza di un trifosfato anomale, né la replicazione di paia di basi innaturali modifica la crescita della cellula in modo significativo. Il risultante batterio contenente DNA con una coppia di basi innaturali è così il primo organismo a riprodurre un alfabeto genetico espanso, senza che la replicazione cellulare sia particolarmente compromessa.



... ?

2010

Prima cellula sintetica. Nel maggio 2010, l'Istituto J. Craig Venter crea la prima cellula batterica completamente sintetica e auto-replicante, chiamata Synthia. Mentre il governo USA ha stanziato \$ 430 milioni nella biologia sintetica fin dal 2005, la maggior parte di essi è stata utilizzata per sviluppare carburanti alternativi. Alcune aziende stanno ora iniziando a sfruttare la tecnologia per scopi medici.

2013

Il mondo celebra il 60° anniversario della scoperta della doppia elica di Watson e Crick.



Biotechnology is a general term for the use of living organisms or their components to produce substances, products, and processes. It involves manipulating DNA and other genetic material to create altered organisms, such as bacteria, that can be used to manufacture various products. Biotechnology has applications in medicine, agriculture, and industry. It also includes the study of living systems at the cellular level.

Key concepts in biotechnology include:

- DNA**: The genetic material of an organism, often manipulated to produce desired traits.
- Organisms**: Living entities used in biotechnology, such as bacteria, plants, and animals.
- Genetic engineering**: The process of modifying an organism's genome to produce specific traits.
- Biological processes**: Natural processes used in biotechnology, such as fermentation and cell division.
- Industrial applications**: The use of biotechnology in manufacturing, pharmaceuticals, and other industries.
- Medical applications**: The use of biotechnology in diagnostics, treatments, and disease prevention.
- Agricultural applications**: The use of biotechnology in crop improvement, animal husbandry, and food production.
- Environmental applications**: The use of biotechnology in waste management, pollution control, and ecosystem restoration.

Biotechnology has led to significant advances in many fields, including medicine, agriculture, and industry. However, it also raises ethical and safety concerns, such as the potential risks to human health and the environment. As the field continues to evolve, it will likely have a major impact on the way we live and work in the future.

Biotecnologie classiche



Téosinte

Maïs primitif

Maïs actuel



fermentazione



incrocio



ibridazione

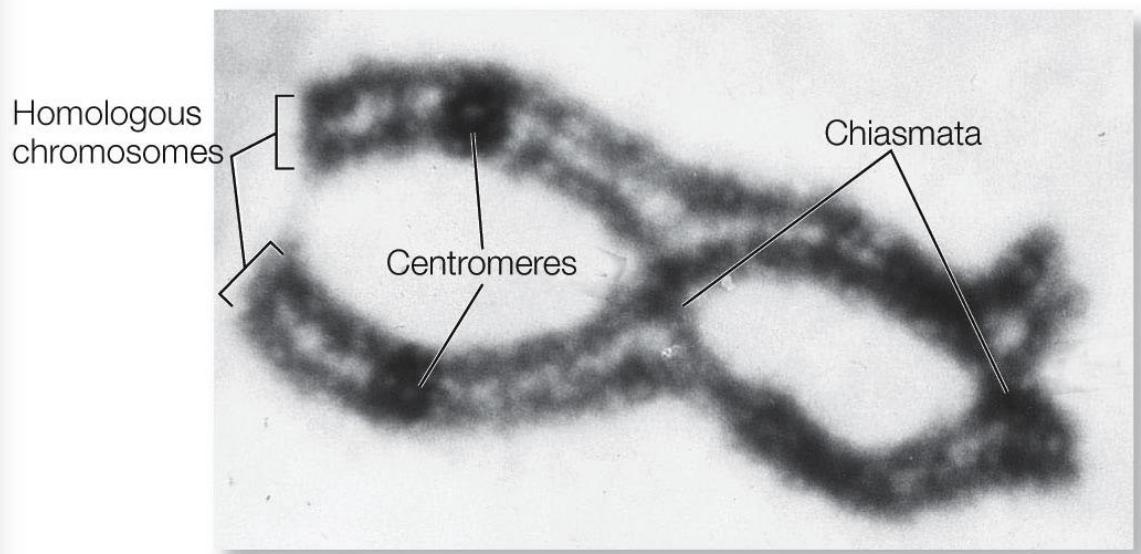
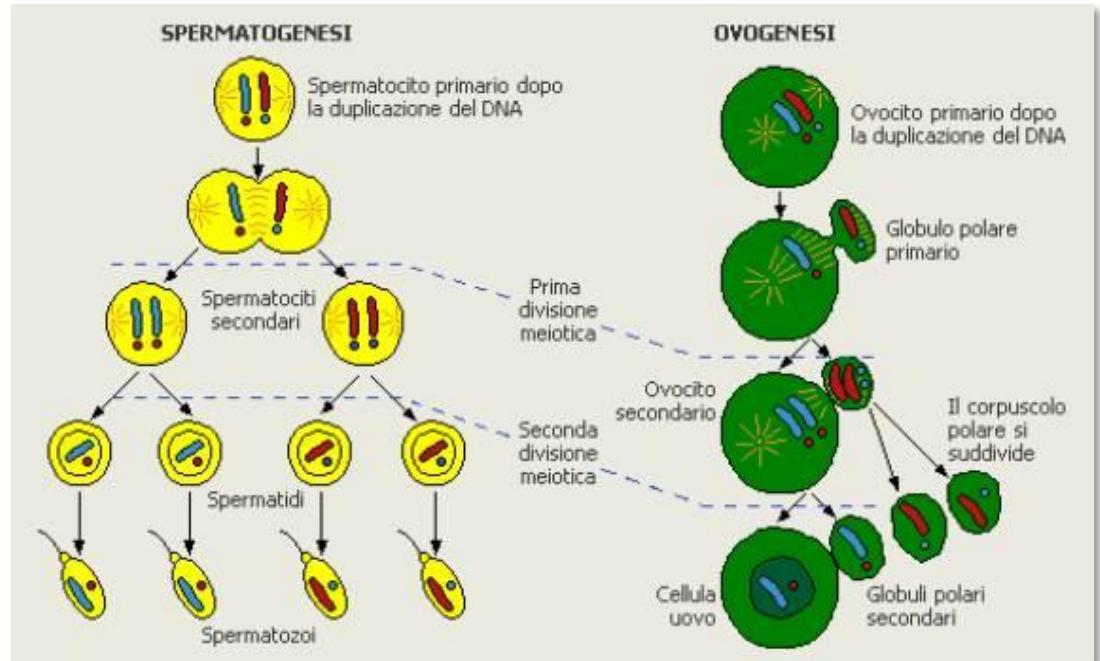
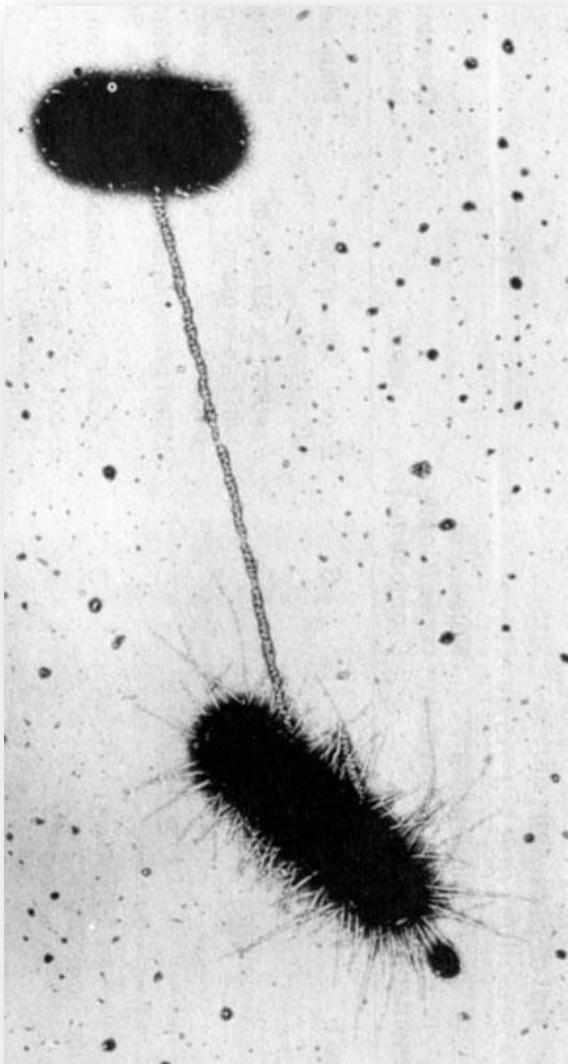


selezione artificiale

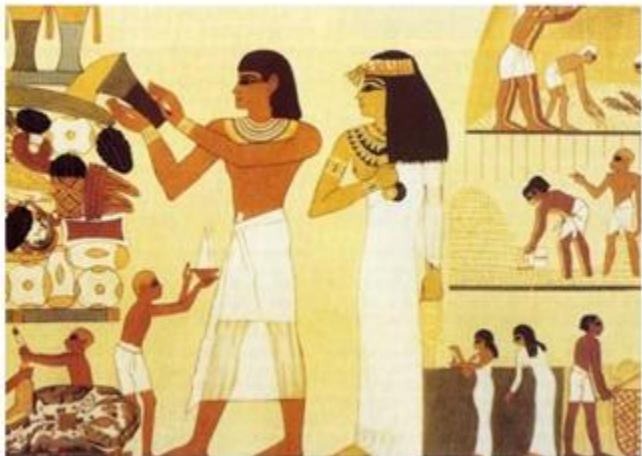


Alexander **Fleming** - 1929 (Nobel per la medicina nel 1945)

Variabilità genetica



per 4 milioni di anni l'uomo si è procurato il cibo attraverso la caccia e la raccolta → **CACCIATORE/RACCOGLITORE**



circa 10.000 anni fa ...

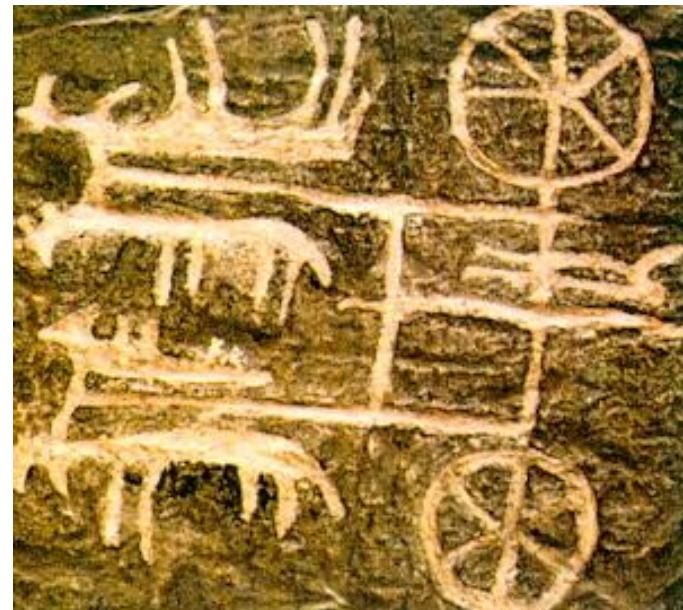


raccoglitore → agricoltore

cacciatore → allevatore

Il cacciatore /raccoglitore faceva parte della natura ed era in competizione con gli altri animali per l'approvvigionamento del cibo.

L'agricoltore cominciò a modificare l'ecosistema, adattandolo ai fabbisogni dell'uomo.



Scena di aratura della prima Età del Bronzo (Cipro)



DOMESTICAZIONE

E' il processo per cui una specie viene trasferita **da una situazione naturale ad una situazione che prevede l'intervento dell'uomo** su alcune funzioni fisiologiche (es. nutrizione, riproduzione).

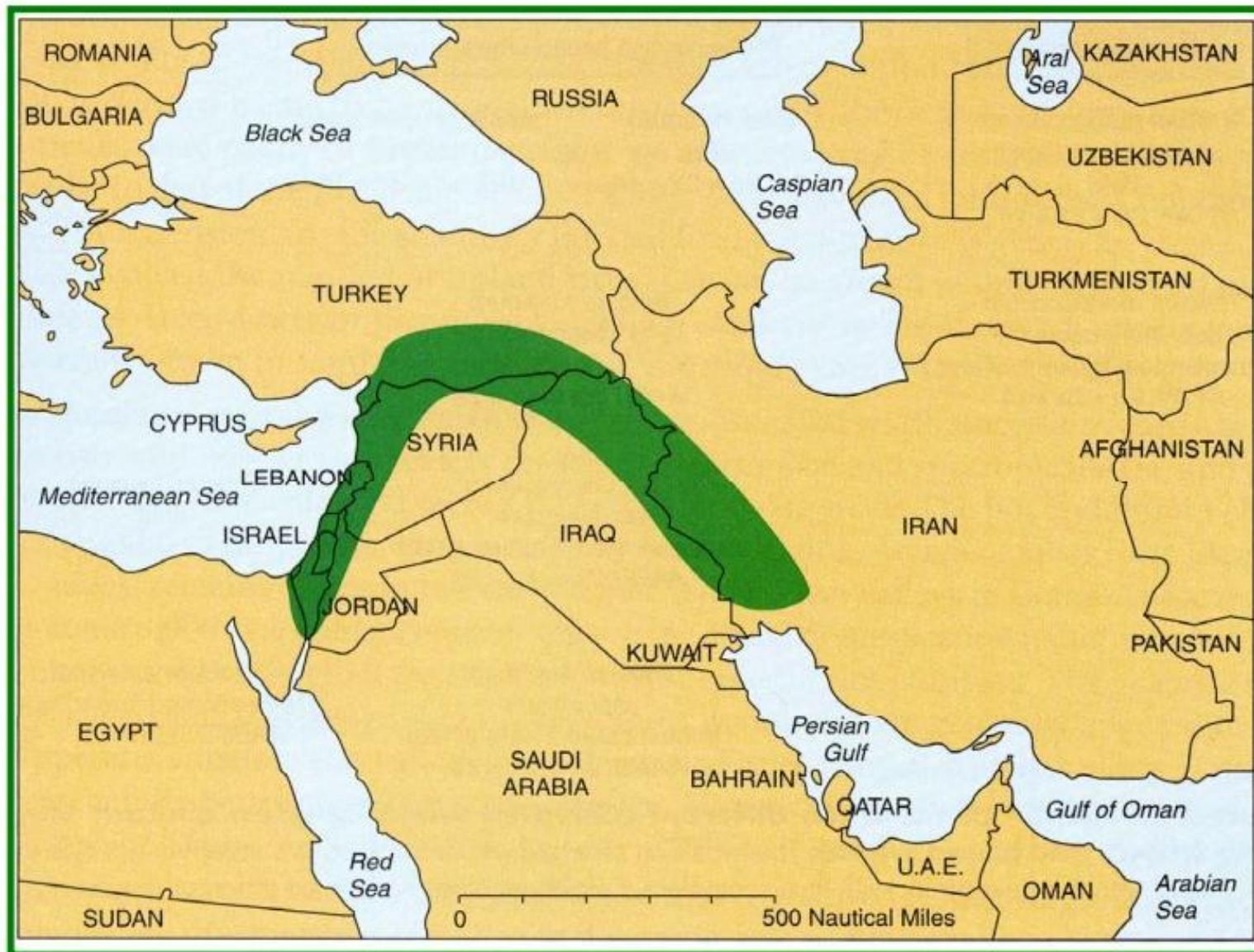
La pianta non è più in grado di crescere spontaneamente ma solo se coltivata. Scopo della domesticazione è far assumere ad una specie quelle mutazioni genetiche che la rendano sempre più adatta a soddisfare le esigenze dell'uomo.

Coincide con il passaggio dalla semplice raccolta alla coltivazione

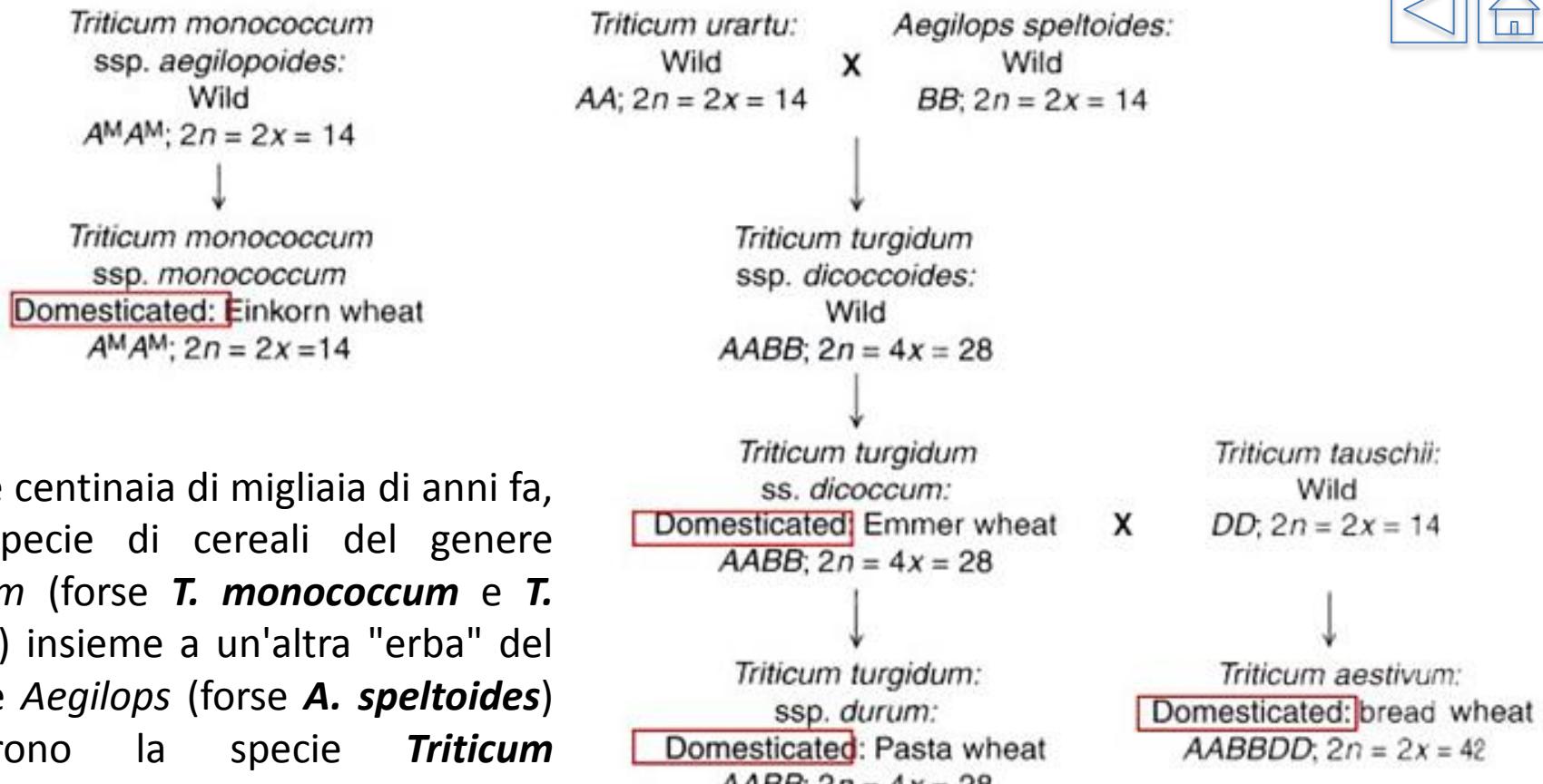
Neolitico, VI-IV millenio a.C.



Domesticazione del frumento



mezzaluna fertile



Alcune centinaia di migliaia di anni fa, due specie di cereali del genere *Triticum* (forse *T. monococcum* e *T. urartu*) insieme a un'altra "erba" del genere *Aegilops* (forse *A. speltoides*) formarono la specie *Triticum turgidum* (o *T. durum*), cioè il **grano duro**, da cui è derivata la specie tuttora coltivata per fare la pasta.

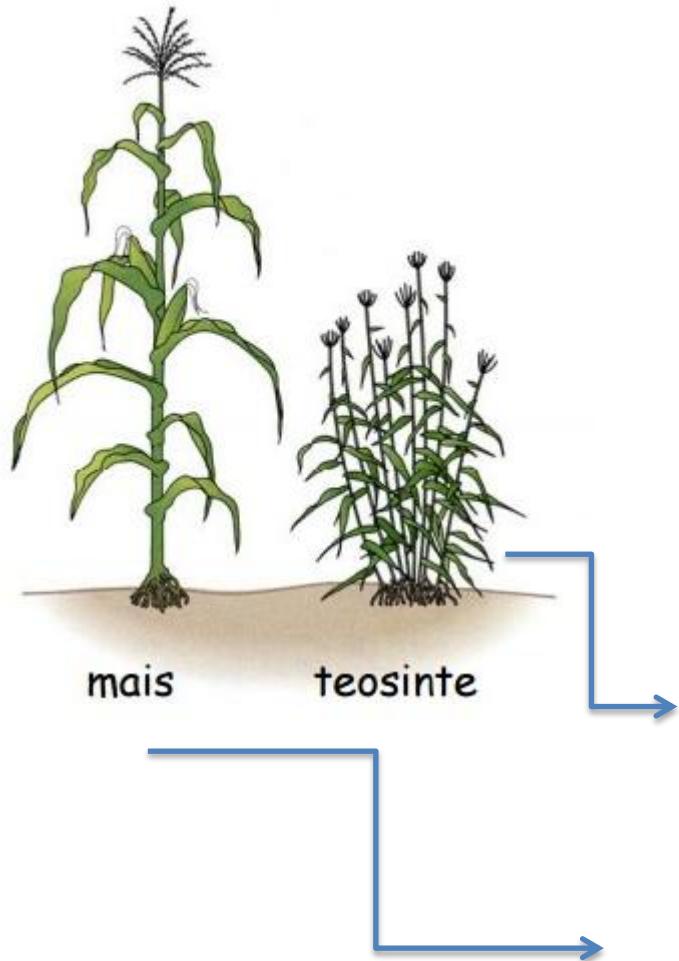
Il *Triticum turgidum* si unì a un'altra specie di *Aegilops*, la *A. tauschii*, per formare infine il *Triticum aestivum*, il **grano tenero**, da cui si ricava la farina per il pane.

Sia il *T. turgidum* sia il *T. aestivum* sono state poi a lungo ulteriormente **selezionate** dall'uomo per avere caratteristiche utili alla coltivazione, come i semi che non cadono e il fusto abbastanza basso e resistente alla "caduta".



una specie antica (*Aegilops speltoides*), a destra la specie derivata da varie ibridazioni

Mais domesticato in Mesoamerica



Il progenitore selvatico è la
TEOSINTE

sono strettamente correlati da un punto di
vista genetico





La perdita di biodiversità

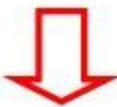
Domesticazione e coltivazione hanno portato a una perdita di biodiversità che ha avuto inizio con la coltivazione delle specie vegetali. La **selezione artificiale** di determinati caratteri ha **ridotto la diversità genetica** nelle specie coltivate.

La perdita di biodiversità è anche dovuta all'**uniformità delle richieste**. Poche varietà occupano una porzione significativa delle terre coltivate.

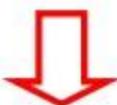
The diversity of our crops is limited because of cultivation of a few varieties over a large area

Crop	Total Number of Varieties	Major Varieties	
		Number	Acreage (%)
Beans, dry	25	2	60
Beans, snap	70	3	76
Cotton	50	3	76
Maize	197	6	71
Peanut	15	9	95
Soybean	62	6	56
Wheat	269	9	50

40000 specie commestibili



circa 200 specie domesticate



circa 15 sostengono l'alimentazione umana

cereali

legumi

frutti

radici e fusti

riso
frumento
mais
orzo
sorgo

fagioli
soia
arachidi

banana
cocco



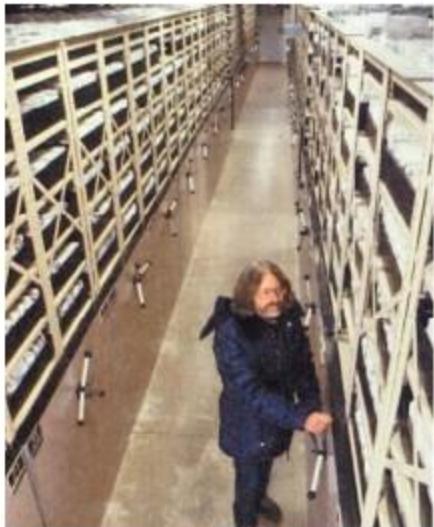
barbabietola da zucchero
canna da zucchero
patate
manioca
igname



Per contrastare l'erosione genetica, la comunità internazionale ha creato programmi di conservazione "in situ" e "ex situ" delle specie vegetali

Ex situ

National Center for Genetic Research Preservation in Colorado
sono mantenute e propagate 38000 specie vegetali



conservazione semi in N₂ liquido
(> 50 anni)

propagazione *in vitro* per
specie che non producono semi



La banca mondiale dei semi



È una gigantesca cassaforte scavata in un ghiacciaio in Norvegia, nelle isole Svalbard, a circa mille chilometri dal Polo Nord

Centinaia di migliaia di sementi conservate a 18 gradi sotto zero, per garantirne la sopravvivenza anche in caso di guerra o cataclisma.

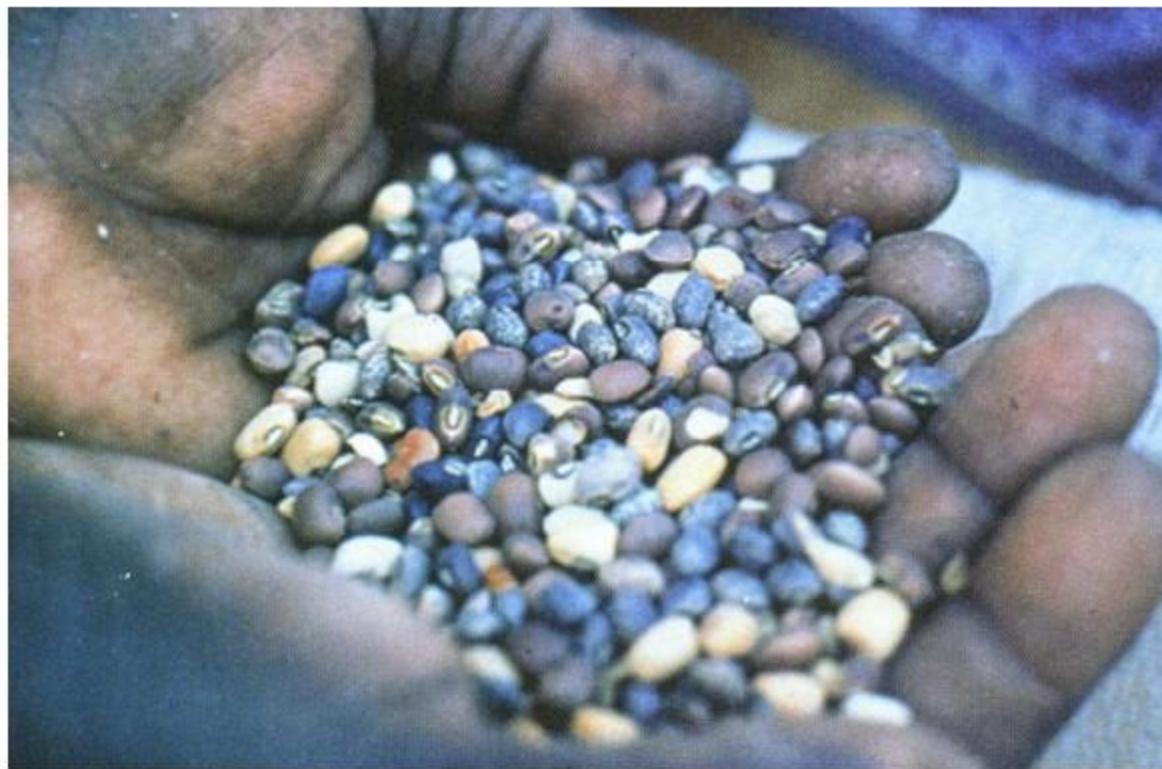
A quella temperatura i semi possono sopravvivere per migliaia di anni (anche 20 mila).



Il progetto globale della **banca dei semi** (o **banca del germoplasma**) è promosso e finanziato dal governo norvegese e sostenuto dalla Fao, l'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura.

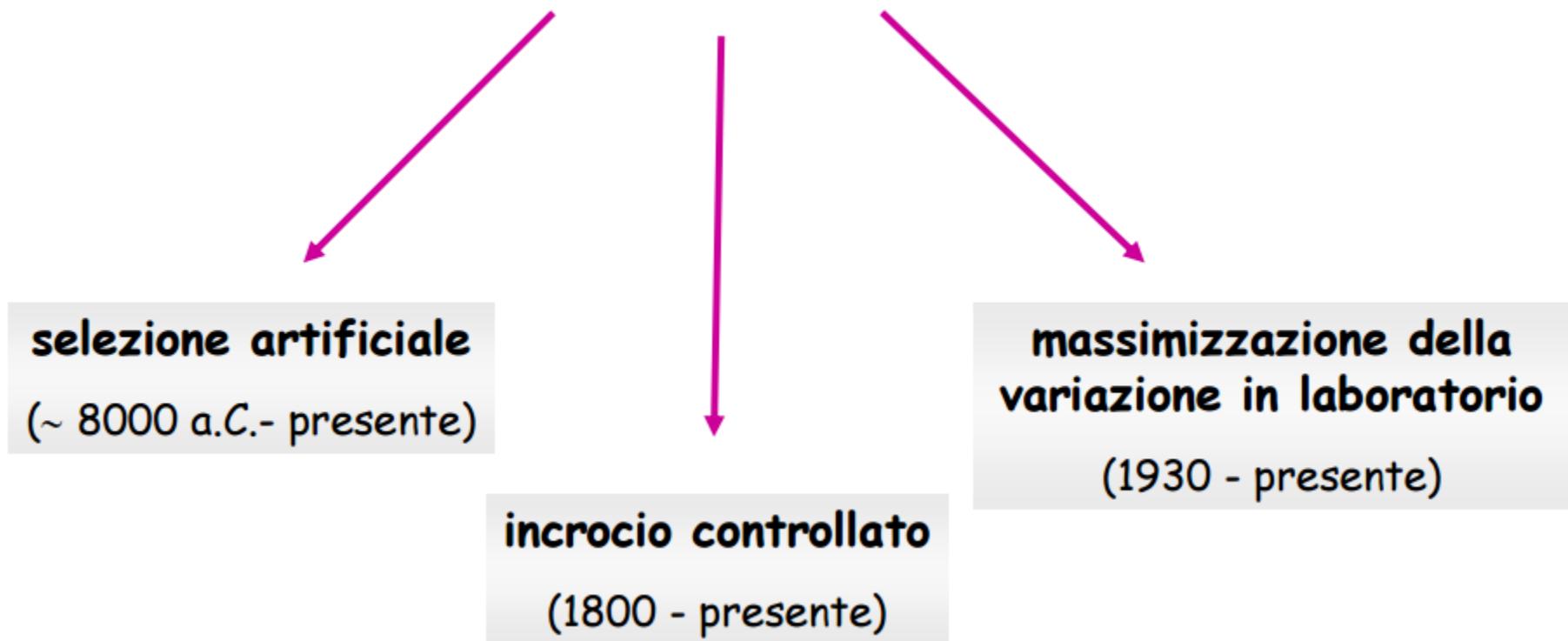
In situ

mantenimento delle **varietà locali** nei luoghi di origine (molto più complicato)



varietà nigeriane di fagioli

MIGLIORAMENTO GENETICO TRADIZIONALE



SELEZIONE ARTIFICIALE

domesticazione delle piante

specie vegetali sono intenzionalmente piantate e coltivate

processo di miglioramento delle colture

attraverso la selezione umana vengono collezionati semi di piante con caratteristiche desiderabili

INCROCIO CONTROLLATO

aggiungere geni da altre varietà attraverso la impollinazione incrociata per migliorare la specie (processo spontaneo o indotto)

MASSIMIZZARE LA VARIAZIONE IN LABORATORIO

per es. con **induzione di mutazioni**

irradiando i semi con raggi X, raggi γ ...

SELEZIONE ARTIFICIALE

Gli agrumi (genere *Citrus*) sono coltivati da almeno 4000 di anni e una serie di incroci successivi hanno generato almeno 25 specie diverse.

La **domesticazione** degli agrumi è iniziata migliaia di anni fa in Asia.

AGRUMI arancio, arancio amaro, chinotto, limone, clementina, bergamotto, mandarancio, mapo, pompelmo, limetta, combava, lice, kumquat, lipo.....

progenitori

pomelo



cedro



mandarino

Il recente sequenziamento del genoma di alcuni agrumi ha permesso di ricostruirne in parte i complessi rapporti di parentela. Quasi tutti gli agrumi coltivati al mondo sono il risultato di incroci di sole tre specie: il **cedro**, il **mandarino** e il **pomelo**.

INCROCIO spontaneo

fragaria virginiana
(Nord America orientale)



X

fragaria chiloensis
(Nord America Pacifico)



fragaria ananassa



incrocio spontaneo
nel XVIII secolo in
Francia

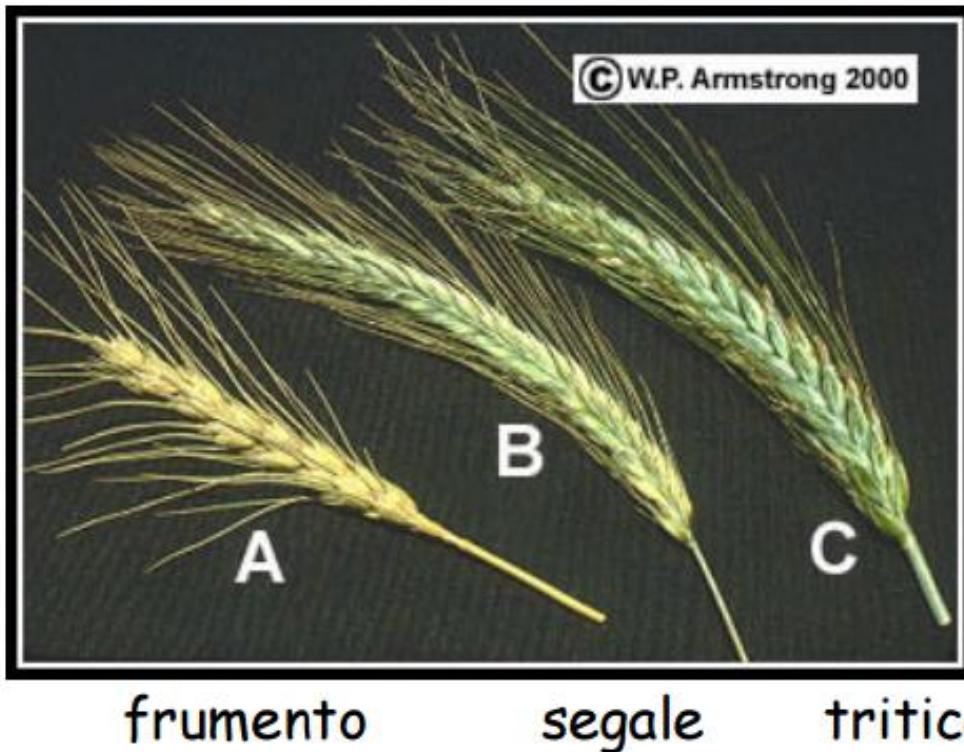
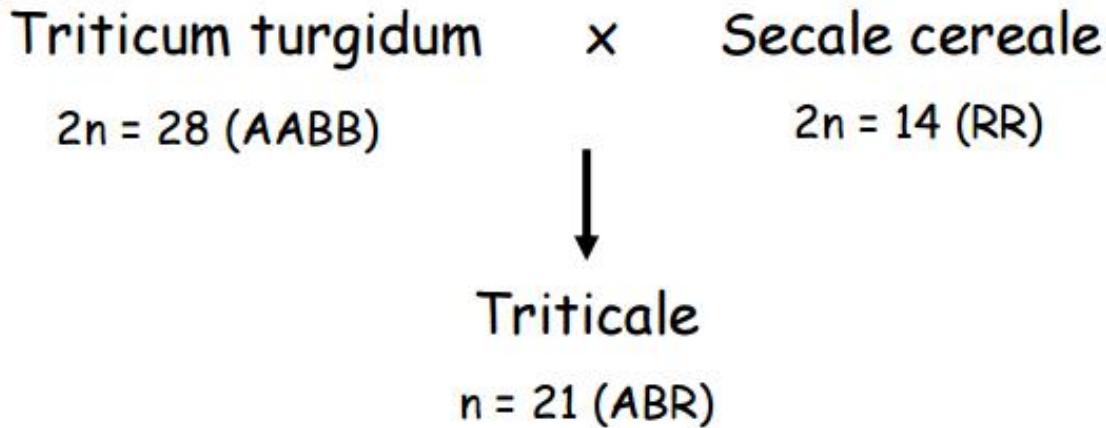
Triticale

incrocio non spontaneo

combinare la qualità del frumento con le capacità di adattamento all'ambiente della segale

Il triticale è usato per lo più come foraggio.

nella fecondazione, il frumento è usato per i cromosomi materni e il polline della segale per quelli paterni.



MASSIMIZZARE LA VARIAZIONE IN LABORATORIO



pomelo rosa
(Texas red)

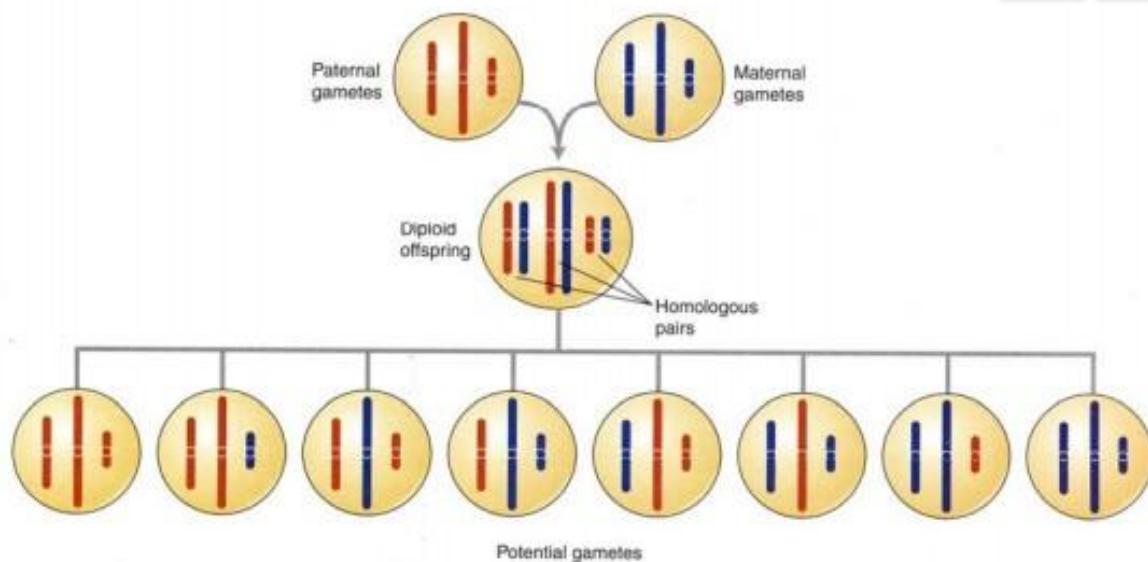
ottenuto per radiazione

il gene che codifica un enzima che degrada il
pigmento rosso in uno incolore è stato reso knock out



grano duro **CRESO** (90% della produzione
nazionale di grano duro)
ottenuto per irraggiamento con neutroni della
varietà Cappelli

L'ibridazione crea variabilità



le possibili combinazioni di n cromosomi

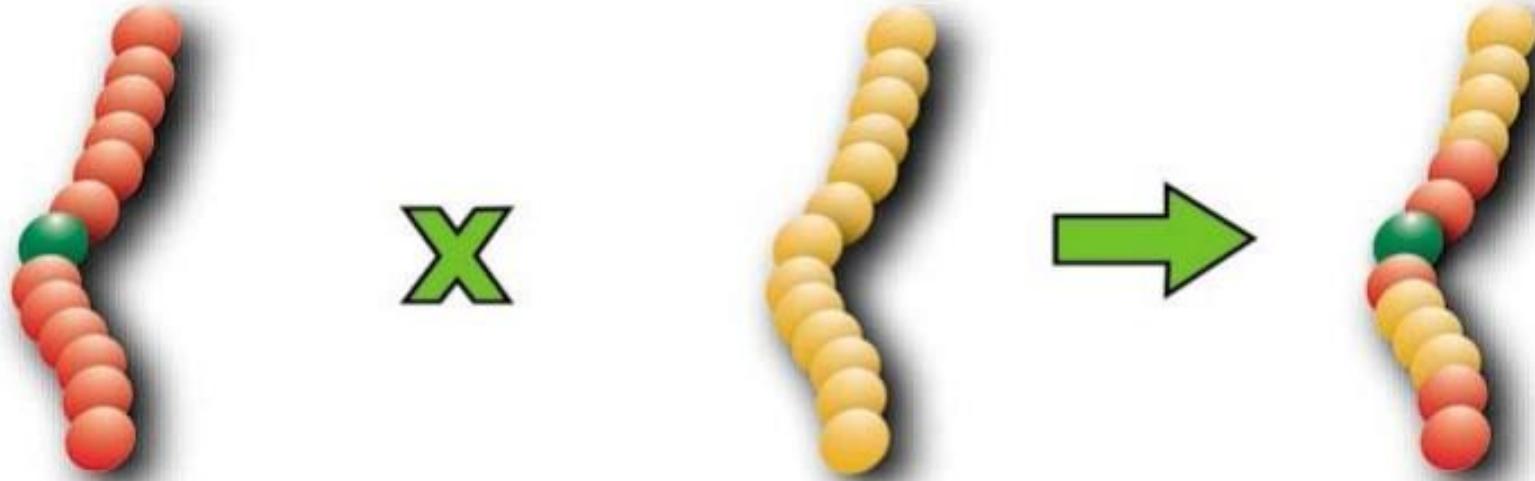
$$2^n$$

mais $n = 10 \longrightarrow 1024$

grano $n = 21 \longrightarrow 2097152$

a ciò si deve aggiungere il crossing-over

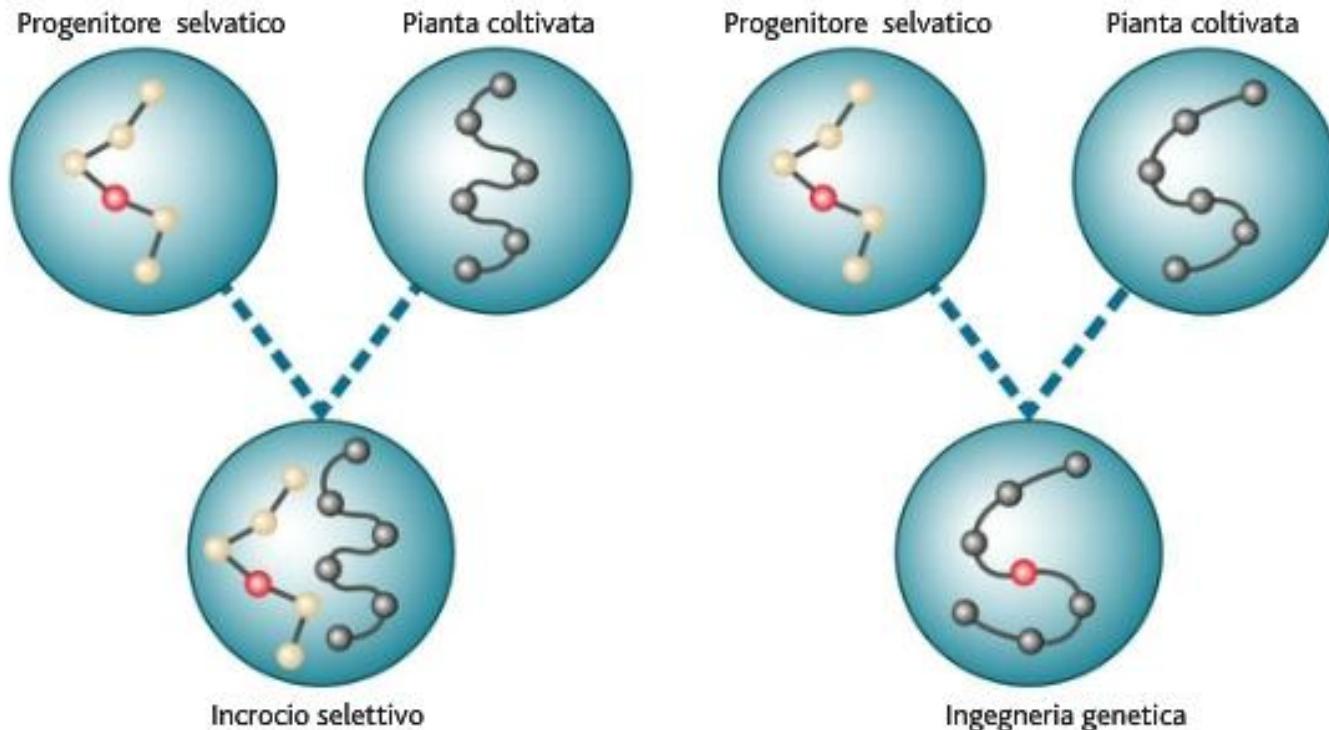
Ma ...



con l'incrocio, oltre al carattere di interesse, possono essere trasferiti anche altri caratteri non desiderabili

Differenze tra incrocio selettivo e ingegneria genetica.

Parametro	Incrocio selettivo	Ingegneria genetica
Livello	Organismo intero	Cellula o molecola
Precisione	Gruppo di geni	Gene singolo
Sicurezza	Cambiamenti genetici scarsamente caratterizzati	Gene ben caratterizzato
Limitazioni tassonomiche	Utile solo all'interno di una singola specie, talvolta tra specie diverse, raramente tra generi	Nessuna



Nuove biotecnologie





la tecnologia delle colture cellulari



La tecnologia delle colture cellulari

Una coltura cellulare è un gruppo omogeneo di cellule eucariotiche, di origine tissutale, in grado di crescere e moltiplicarsi in vitro per numerose generazioni. È possibile coltivare in laboratorio sia cellule di origine animale che vegetale.



coltura di cellule vegetali

coltura di cellule animali

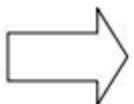
**coltura di cellule
staminali embrionali (ES)**



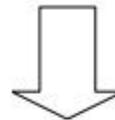
Coltura di cellule vegetali



Le basi delle tecniche di coltura *in vitro*



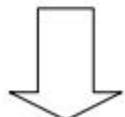
Totipotenza delle cellule vegetali



capacità di rigenerare un individuo completo partendo da cellule e/o tessuti differenziati.

Le cellule mature, altamente specializzate, mostrano la capacità di regressione verso uno stato meristematico, indifferenziato.

Processo di “dedifferenziazione”.

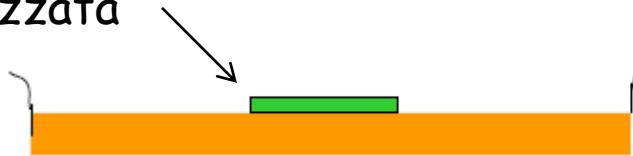


Processo di “ri-differenziazione” Pianta completa

in vitro è possibile ri-generare un organismo vegetale variando il rapporto di auxina e citochina (ormoni vegetali che regolano proliferazione e differenziamento)

- **CALLI** (ammassi cellulari sdifferenziati propagabili in vitro all'infinito)
 - **GERMOGLI**
 - **RADICI**

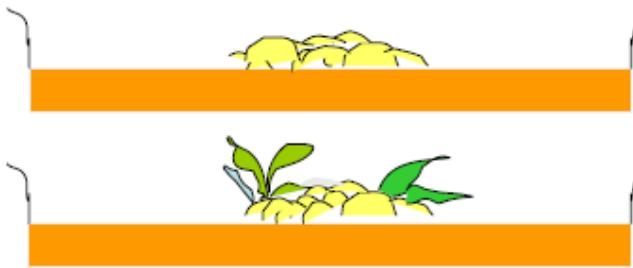
Foglia sterilizzata



CALLO



GERMOGLI



RADICI



Auxina/Citochina

Auxina/**Citochina**

Auxina/Citochina





Coltura di cellule vegetali

La tecnica delle colture “in vitro” consente

1. riprodurre sistemi biologici complessi in ambienti ristretti e tempi limitati, in condizioni ambientali (luce, temperatura, umidità ecc.) e nutrizionali (composizione dei terreni di coltura) strettamente controllati.
2. avere sempre materiale vegetale disponibile, svincolando le osservazioni dalla stagionalità e dalla durata del ciclo vegetativo
3. Ottenere uno screening veloce di selezione del germoplasma
4. Manipolare il corredo genetico, favorendo l'introduzione di geni e ottenendo cloni transgenici resistenti
5. realizzare e gestire collezioni clonali garantendo la conservazione di prezioso patrimonio genetico

Il **germoplasma** è il materiale ereditario trasmesso alla prole mediante le cellule germinali in grado di permettere di preservare in modo diretto la biodiversità a livello genetico e di specie.



Coltura di cellule animali

sviluppo di **tecniche di sterilità**
uso di **terreni di coltura** sempre più completi



ampliato utilizzo delle colture di cellule animali



“sistema modello”
semplificato e riproducibile
per lo studio della biochimica e della
fisiologia cellulare.

Coltura di cellule animali

Attualmente le colture cellulari vengono utilizzate:

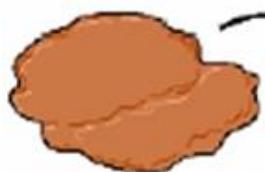
- per **la produzione di sostanze farmacologicamente attive** (anticorpi, vaccini, fattori di crescita ecc.)
- nei **test di tossicità di farmaci**, prima che questi vengano saggiati sugli animali o sull'uomo
- nei test di **ecotossicità**, per valutare l'effetto di inquinanti ambientali
- negli studi sui **meccanismi della fisiologia e dello sviluppo cellulari**
- negli **studi oncologici**
- nella **diagnosi di malattie genetiche**
- nella **creazione di organismi transgenici**



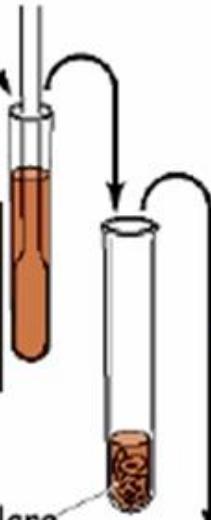
Coltura di cellule animali



Tessuto



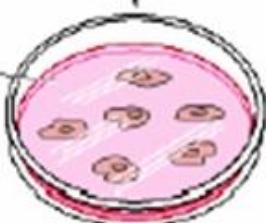
Un frammento di tessuto viene disperso in una sospensione di singole cellule.



Le cellule sono piastrate in una piastra di coltura in un mezzo nutriente

Sospensione cellulare

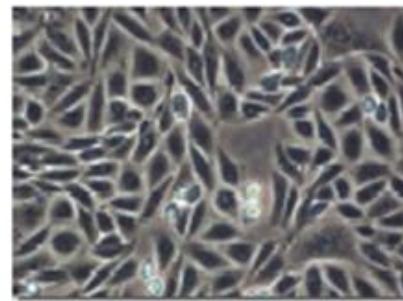
Le cellule di questa coltura primaria si attaccano alla piastra e crescono fino a coprirne la superficie.



Coltura primaria



Coltura secondaria



Cellule di ovaio di criceto

Le cellule possono quindi essere rimosse dalla piastra di coltura e ripiastrate a densità minore per formare una coltura secondaria.



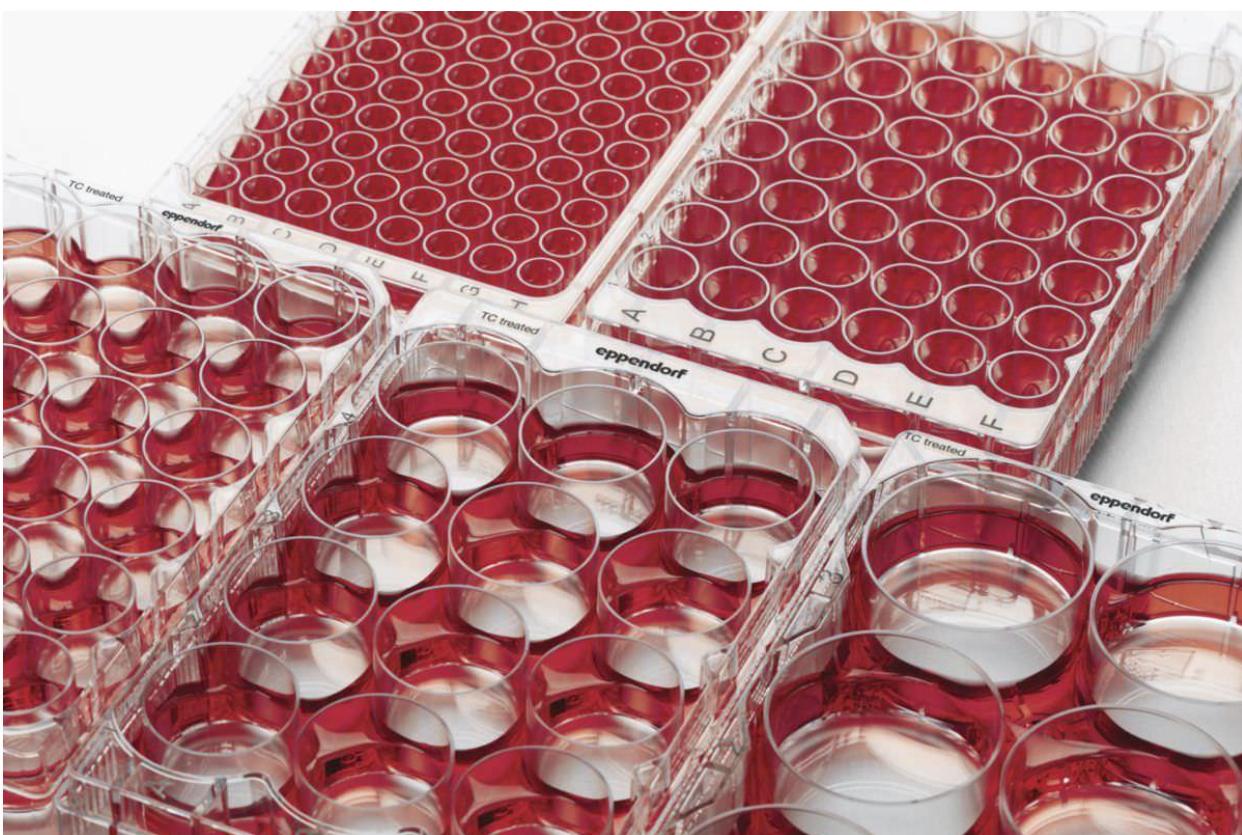
piastre Petri



**fiasche con tappo
ventilato**



piastre multipozzetto



Laboratorio per colture cellulari

centrifuga



cappa



incubatore



Le colture preparate direttamente da un tessuto si dicono **colture primarie**; le cellule isolate da un qualsiasi tessuto animale sono in grado di compiere **un numero finito di divisioni cellulari in vitro**, dopodiché vanno incontro a degenerazione e morte. Tale fenomeno avviene indipendentemente dalla presenza di metaboliti appropriati per la crescita e si indica come senescenza. In genere il numero di “cicli” che una cellula è in grado di effettuare in vitro dipende dall’età dell’animale.

Le **linee cellulari continue** derivano da singole cellule in cui mutazioni spontanee o indotte hanno annullato il programma genetico della senescenza.

Si dicono perciò **immortali**: proliferano in modo continuo in presenza degli opportuni metaboliti. Molte linee cellulari continue sono state ottenute a partire da tessuti tumorali (es. **HeLa**).



questa linea cellulare è stata isolata da un cancro della cervice uterina di **Henrietta Lacks** (dal cui nome deriva quello delle cellule), che morì di questo cancro nel 1951.

Linee cellulari particolarmente utilizzate.

3T3 fibroblast (mouse)

BHK21 fibroblast (Syrian hamster)

MDCK epithelial cell (dog)

HeLa epithelial cell (human)

Ptk1 epithelial cell (rat kangaroo)

L6 myoblast (rat)

PC12 chromaffin cell (derived from a rat pheochromocytoma)

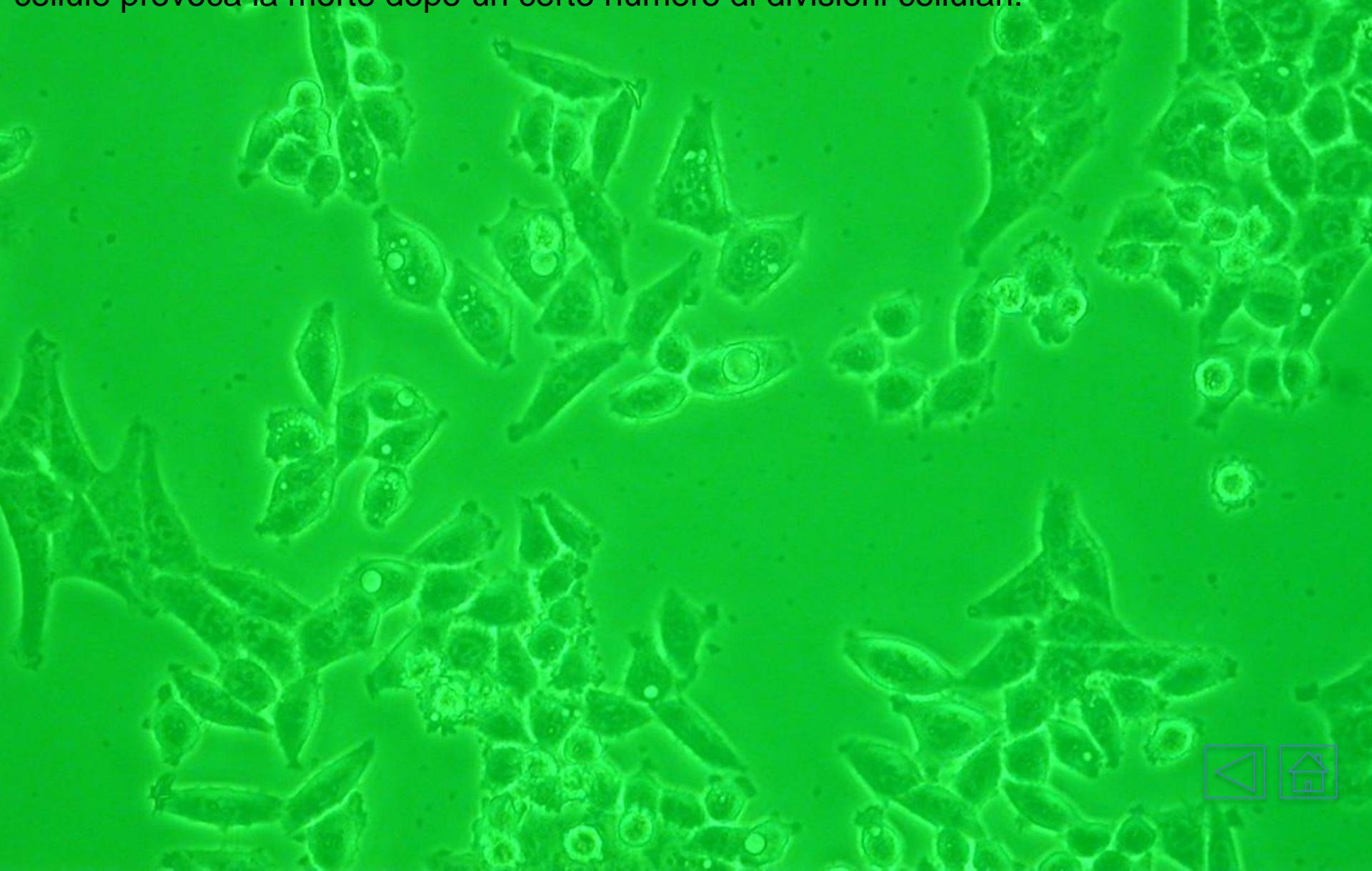
COS fibroblast (monkey)

CHO ovary (chinese hamster)

HEK-293 generated by transformation of embryonic kidney cells (human)



Le **HeLa** sono più resistenti delle altre cellule tumorali. Le HeLa possono dividersi molte più volte rispetto alle altre cellule e ciò dipende da una mutazione della telomerasi, che previene l'accorciamento del telomero durante la replicazione, cosa che nelle altre cellule provoca la morte dopo un certo numero di divisioni cellulari.



Coltura di cellule staminali

Cellule staminali totipotenti

possono dare origine a un individuo completo

- **cellula uovo fecondata, cellule vegetali**

Cellule staminali pluripotenti

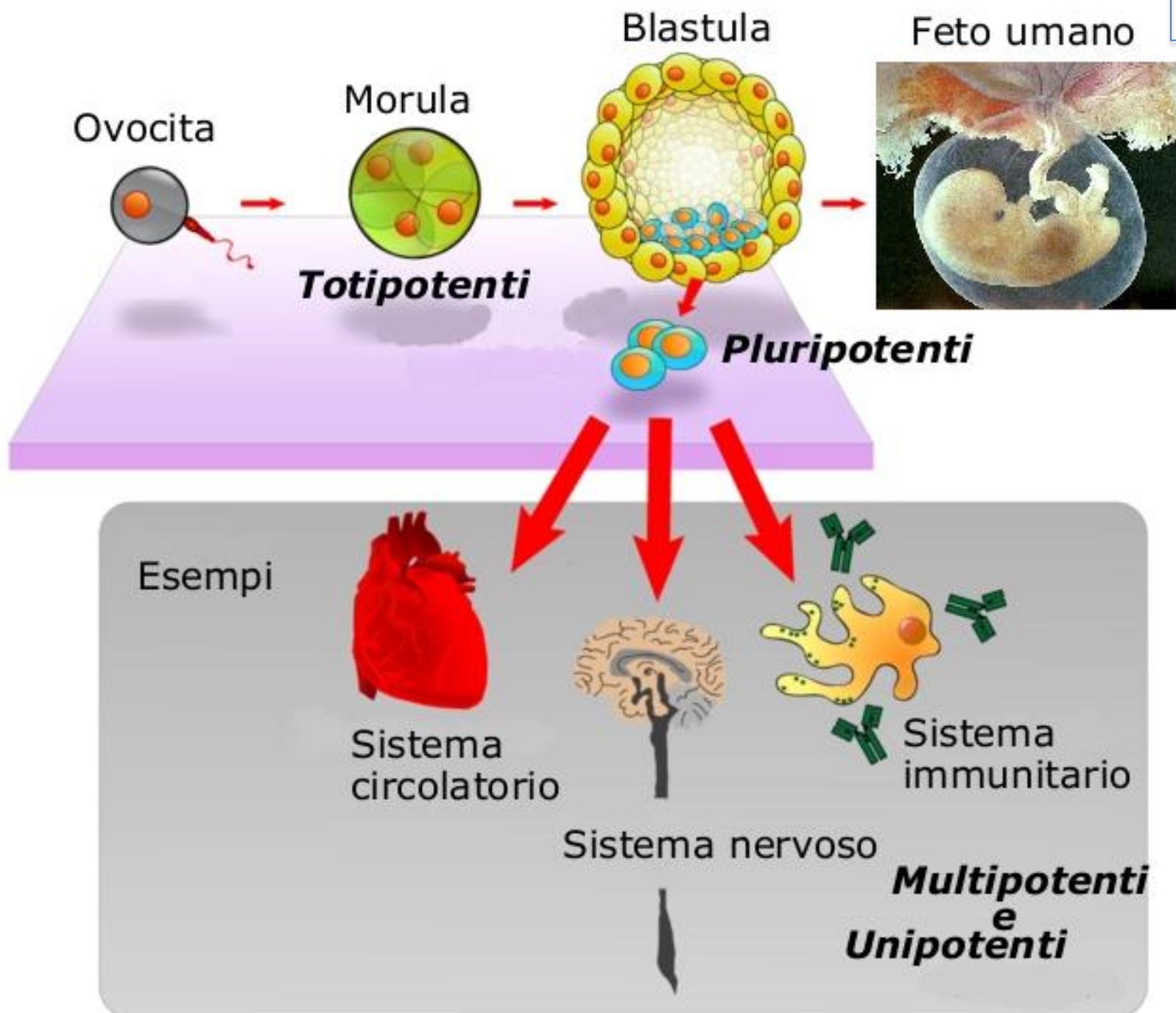
possono differenziarsi in ogni tipo di cellula

- **cellule staminali embrionali ES**

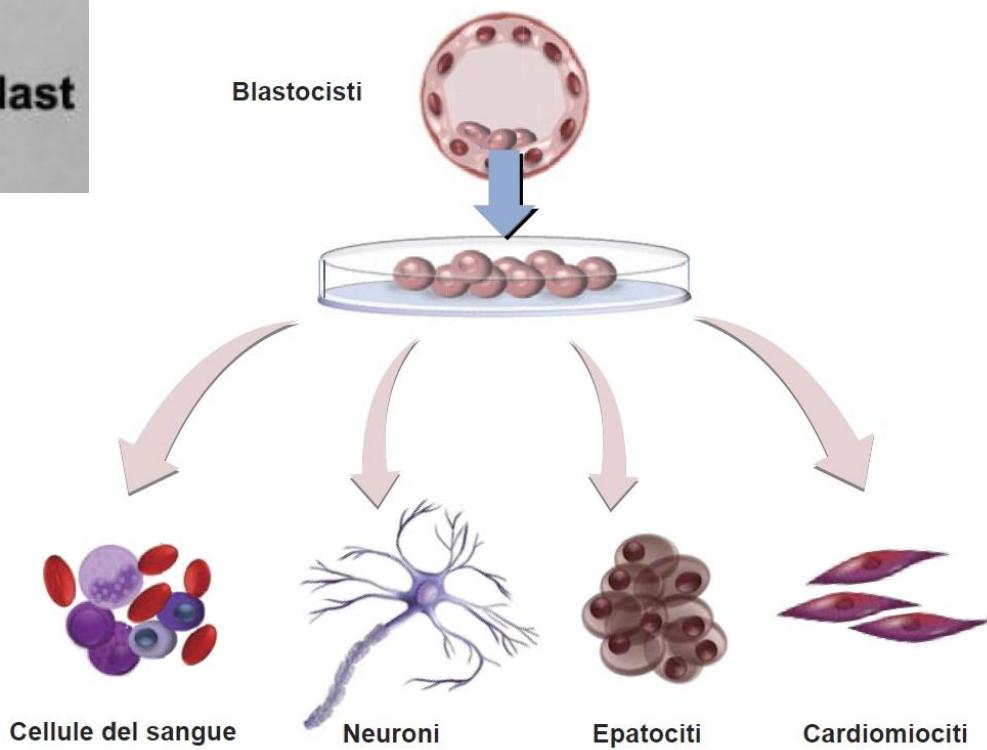
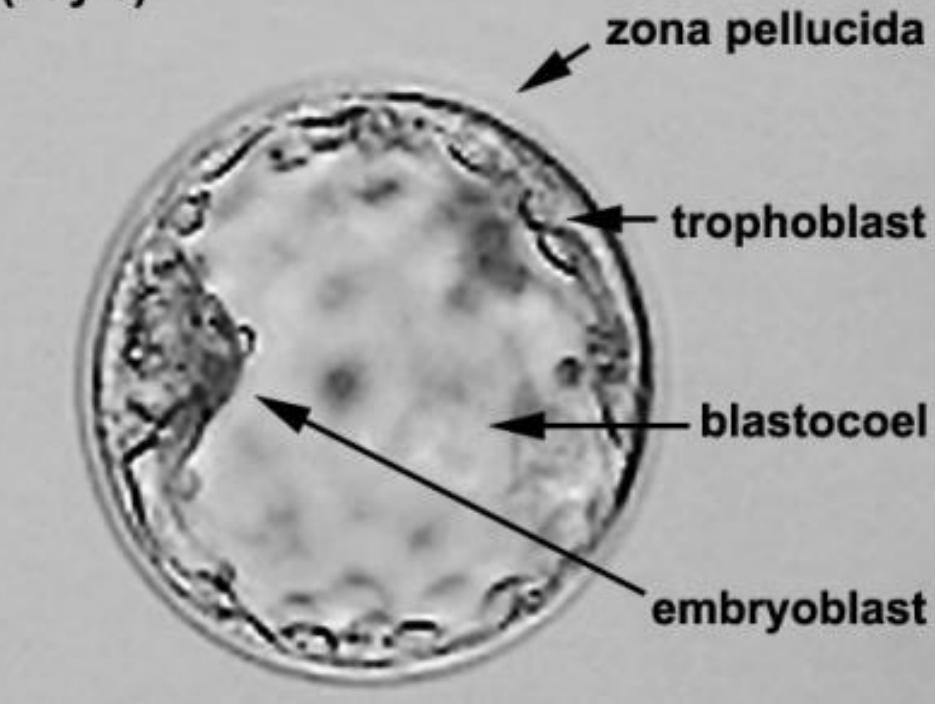
Cellule staminali multipotenti (o unipotenti)

cellule dei tessuti permanentemente immature, specializzate per sostituire cellule morte o danneggiate, possono dare a origine a diverse (o una) tipologie di cellule

- **cellule staminali adulte AS**



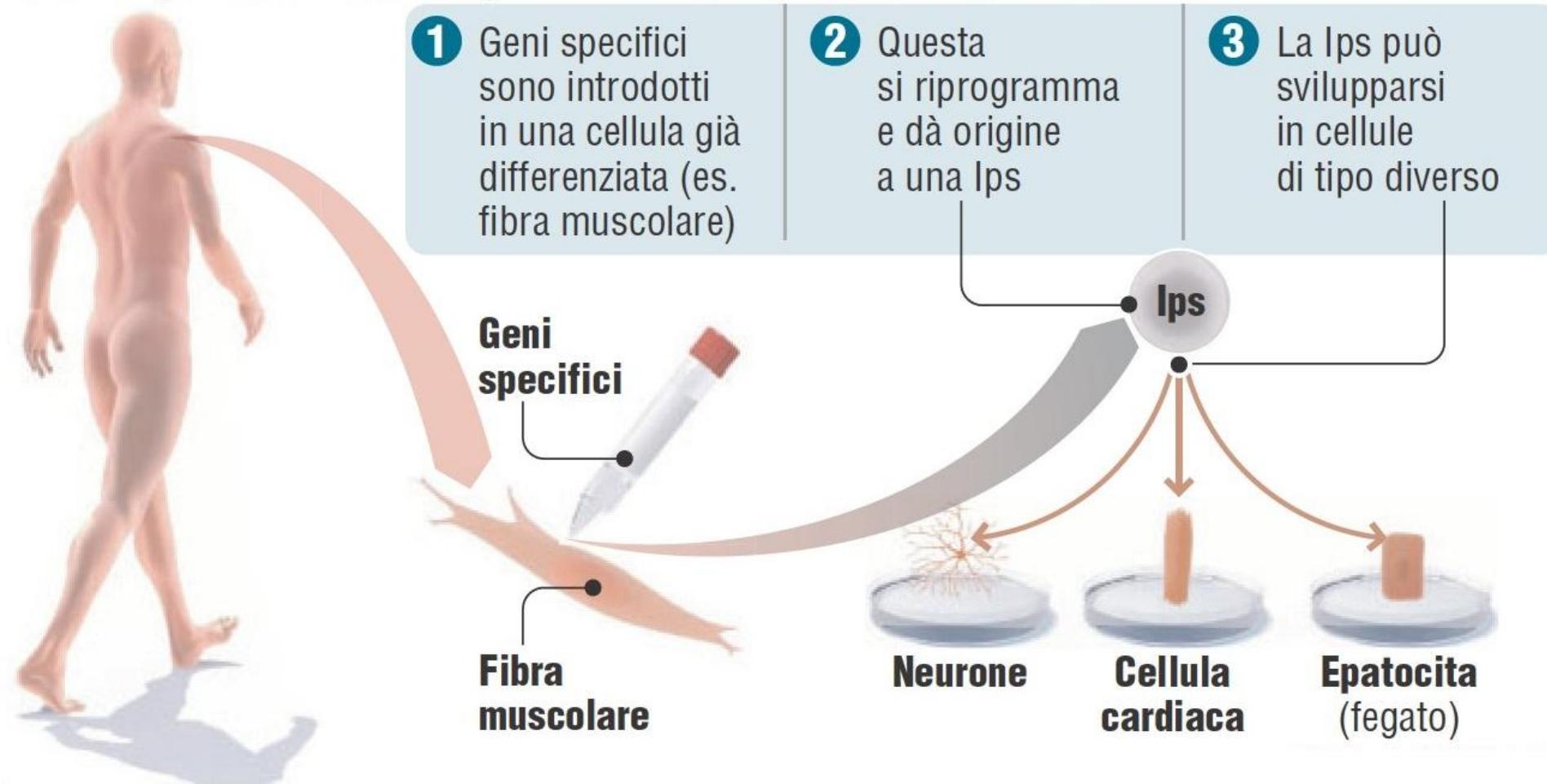
Human Blastocyst (day 5)



iPS o iPSC (*Induced Pluripotent Stem Cell*)

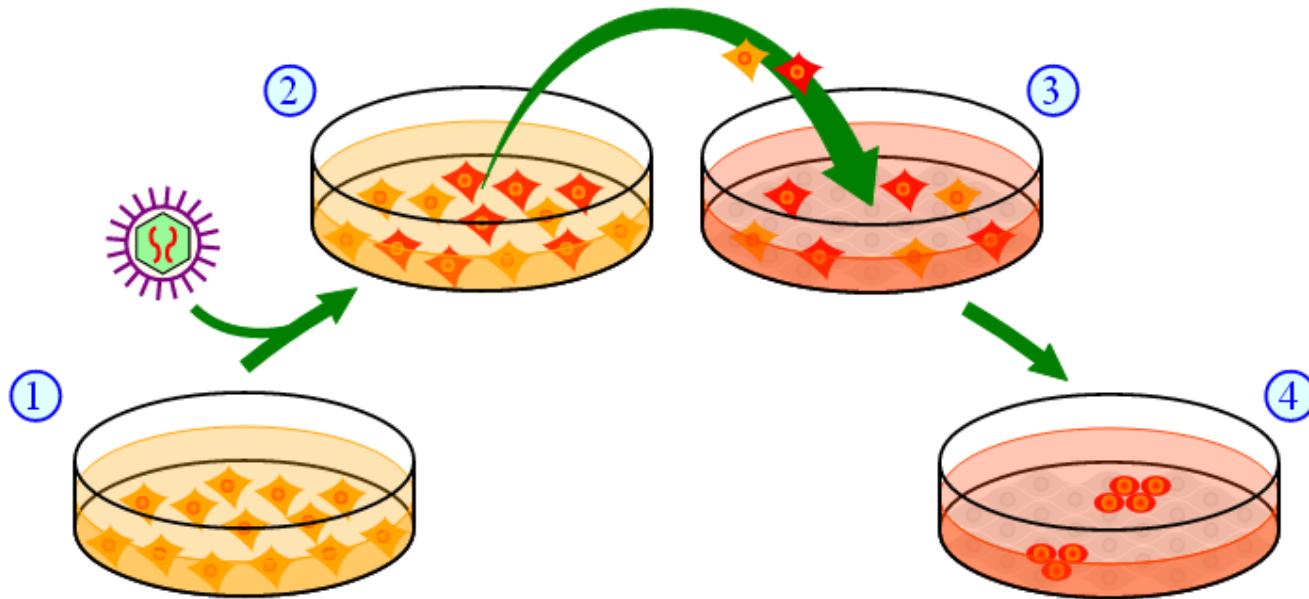


Le Ips (staminali pluripotenti indotte) sono cellule ottenute dalla riprogrammazione di cellule già differenziate e in grado di svilupparsi in diversi tipi di tessuti



Le iPSCs sono state prodotte per la prima volta nel 2006 da cellule di topo, e nel 2007 da cellule umane in una serie di esperimenti condotti dal Shinya Yamanaka presso l'Università di Kyoto.

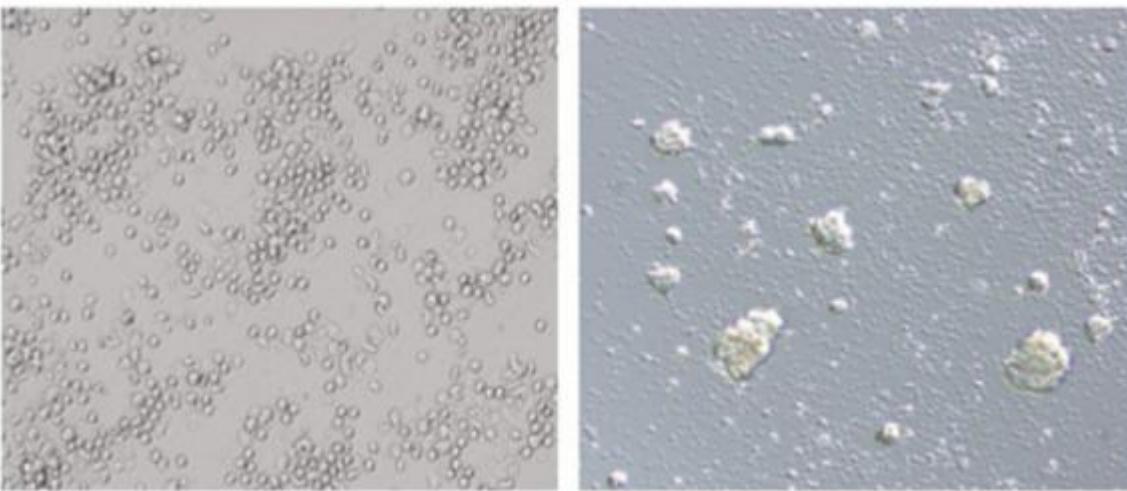
Il “metodo Yamanaka” per generare iPSC in vitro si basa sulla trasduzione di vettori virali che, inducendo l'espressione di particolari fattori di crescita, risveglia la staminalità di cellule già differenziate.



1. Le cellule iPS vengono tipicamente derivate per trasduzione di particolari geni associati alle staminali, all'interno di cellule non pluripotenti, come i fibroblasti adulti.
2. La trasduzione è normalmente ottenuta attraverso vettori virali, come i retrovirus. Le cellule rosse indicano le cellule che esprimono i geni esogeni
3. Raccogliere e coltivare le cellule
4. Dopo 3/4 settimane, piccoli gruppi di cellule trasdotte cominciano a diventare morfologicamente e biochimicamente simili alle staminali pluripotenti e sono isolate.

cellule pluripotenti indotte da stress (STAP) ??????

L'utilizzo di virus, così come la manipolazione genetica delle cellule, rappresenta un grosso limite alla conversione delle cellule iPSC in uno strumento affidabile per la medicina rigenerativa (potrebbe potenzialmente essere aumentata l'espressione di geni oncogeni).



Confronto tra i globuli bianchi coltivati in condizioni di basso pH de-differenziati in cellule pluripotenti (*a destra*), e cellule di controllo coltivate in condizioni normali (*a sinistra*)

Haruko Obokata e collaboratori hanno sviluppato un sistema completamente nuovo per generare in vitro cellule staminali pluripotenti. Esponendo linfociti già maturi a potenti **stimoli ambientali**, come per esempio livelli di pH molto bassi, i ricercatori sono stati in grado di riprogrammare le cellule a uno stadio più immaturo: sono nate così quelle che Obokata ha battezzato “cellule pluripotenti indotte da uno stress” o, per usare l’acronimo inglese, cellule STAP (Stimulus-Triggered Acquisition of Pluripotency).

La situazione in Italia

In Italia, la legge 40/2004 sulla procreazione medicalmente assistita consentiva la formazione di un numero massimo di tre embrioni da impiantare tutti insieme nell'utero. La legge è stata recentemente modificata, con la sentenza 151 della Corte Costituzionale pronunciata il 1° aprile 2009, allo scopo di tutelare la salute della donna ossia di evitare che, in caso di fallimento del primo trasferimento embrionale, donne in specifiche condizioni, per cui il trattamento di stimolazione ormonale rappresenta un rischio per la salute, debbano risottoporsi allo stesso trattamento.

Il numero di embrioni da produrre è adesso quello "strettamente necessario" ed è garantita l'autonomia del medico, il quale sceglie di volta in volta il miglior trattamento per tutelare la salute di donna a seconda delle specifiche condizioni del caso. Di fatto la sentenza della Corte Costituzionale ha eliminato il limite massimo di tre embrioni producibili per ciclo di trattamento e l'obbligo di un unico e contestuale impianto, imposti dalla legge 40, rendendo quindi possibile la crioconservazione degli embrioni prodotti non trasferiti. Per effetto di tale modifica, il numero di embrioni congelati, presso i 360 centri di fecondazione assistita presenti sul territorio nazionale, è aumentato di 10 volte in meno di un anno, passando da 763 a 7.337 (1).

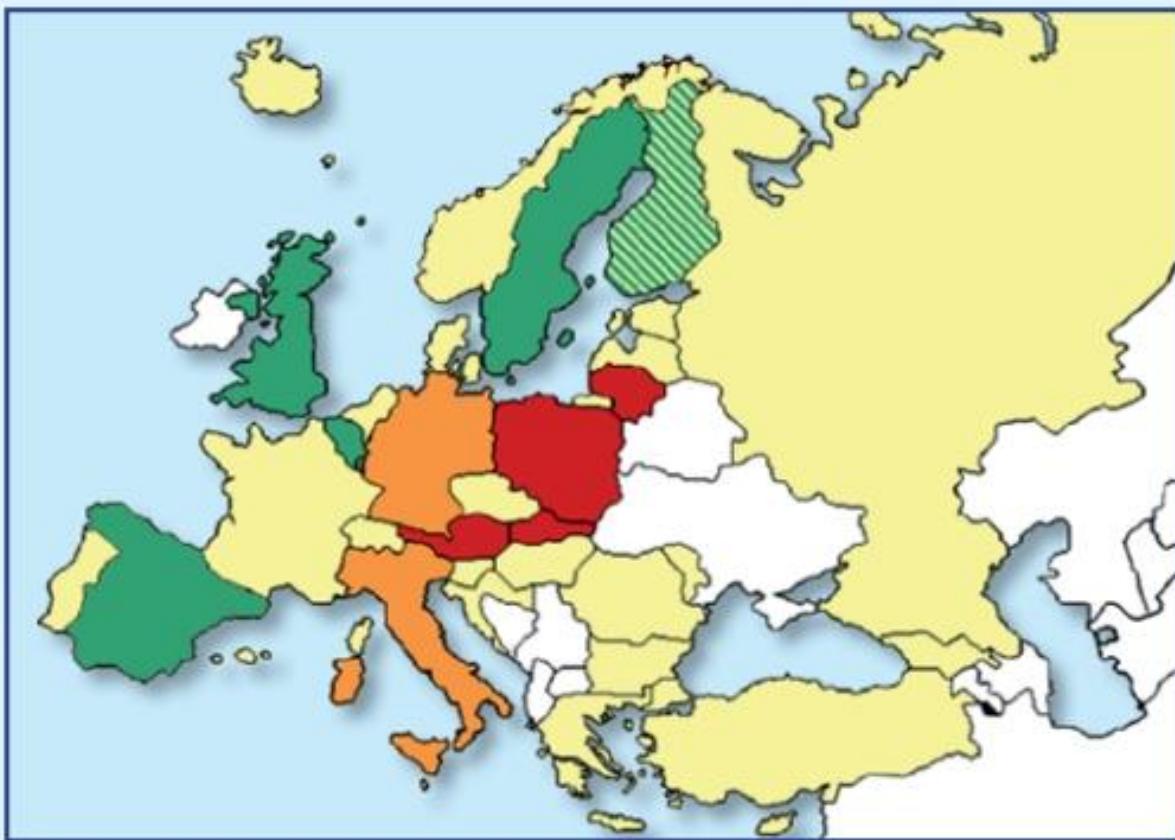


Uno sguardo al mondo

La legislazione sulle cellule staminali può essere definita:

- **permissiva:** la clonazione terapeutica è permessa sotto certe condizioni;
- **parzialmente permissiva:** la clonazione terapeutica è proibita; è consentito o non è vietato l'uso degli embrioni soprannumerari;
- **restrittiva:** è consentito l'uso di cellule staminali embrionali create prima di una certa data o importate dall'estero;
- **proibitiva:** è proibito l'impiego di embrioni e di cellule staminali embrionali.

Qui a fianco la situazione in Europa e quindi una panoramica nel resto del mondo.



(fonte: www.hinxtongroup.org)

Legislazione sulle cellule staminali:	
■	proibitiva
■	parzialmente permissiva
■	restrittiva
■	permissiva
■	permissiva e parzialmente permissiva*
■	insufficiente o non disponibile

* il prodotto della donazione terapeutica non è considerato un embrione



ASIA E OCEANIA



Legislazione sulle cellule staminali:

- proibitiva
- parzialmente permisiva
- restrittiva
- permisiva
- permisiva e parzialmente permisiva*
- inconsistente o non disponibile

* Il prodotto della clonazione terapeutica non è considerato un embrione

Cellule staminali embrionali

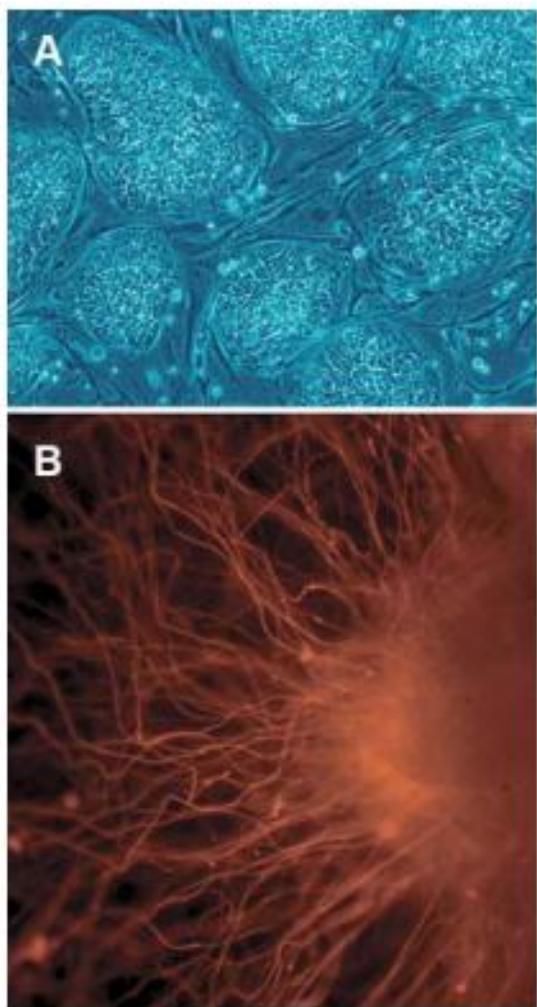


Figura 3. Cellule staminali embrionali (A) e cellule specializzate derivate da esse (B). (foto Benvenisty N., wikimedia commons)

Si possono usare le cellule staminali embrionali per curare malattie? Per adesso no. Ci sono ancora dei grossi ostacoli che non permettono di usare le cellule staminali embrionali per curare i pazienti: in primo luogo è difficile "convincere" una cellula staminale embrionale a diventare un'altra cellula più specializzata come una cellula muscolare, una cellula nervosa o un globulo rosso. Per ora la trasformazione delle cellule staminali embrionali in cellule specializzate viene realizzata solo in alcuni laboratori di ricerca con procedimenti lunghi e costosi (**Figura 3**).

Inoltre il modo in cui la cellula staminale embrionale diventa una cellula specializzata è ancora misterioso e poco controllabile. Questo porta al secondo problema, cioè che le cellule staminali embrionali in alcuni casi possono diventare cellule cancerose, dando origine a un particolare tipo di tumore chiamato **teratoma**. Il momento in cui le cellule staminali embrionali potrebbero essere usate in clinica è però sempre più vicino. Infatti nel 2009 sono iniziate le prime sperimentazioni per vedere l'effetto di staminali embrionali su un piccolo numero di pazienti con lesioni alla spina dorsale, seguite nel 2010 da altre prove su pazienti con una rara malattia degli occhi.

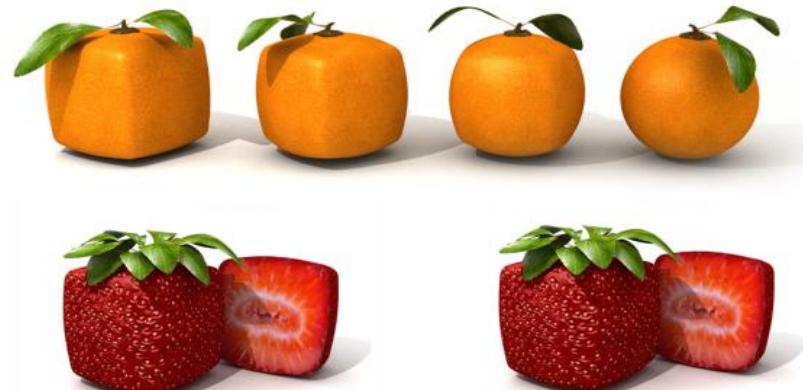
I risultati di queste sperimentazioni saranno importanti per decidere se continuare ad esplorare gli usi delle staminali embrionali per curare queste e altre malattie.

A cosa serve la ricerca sulle cellule staminali embrionali? Molti scienziati in tutto il mondo sono impegnati a studiare le cellule staminali embrionali in modo da poterle usare in medicina.

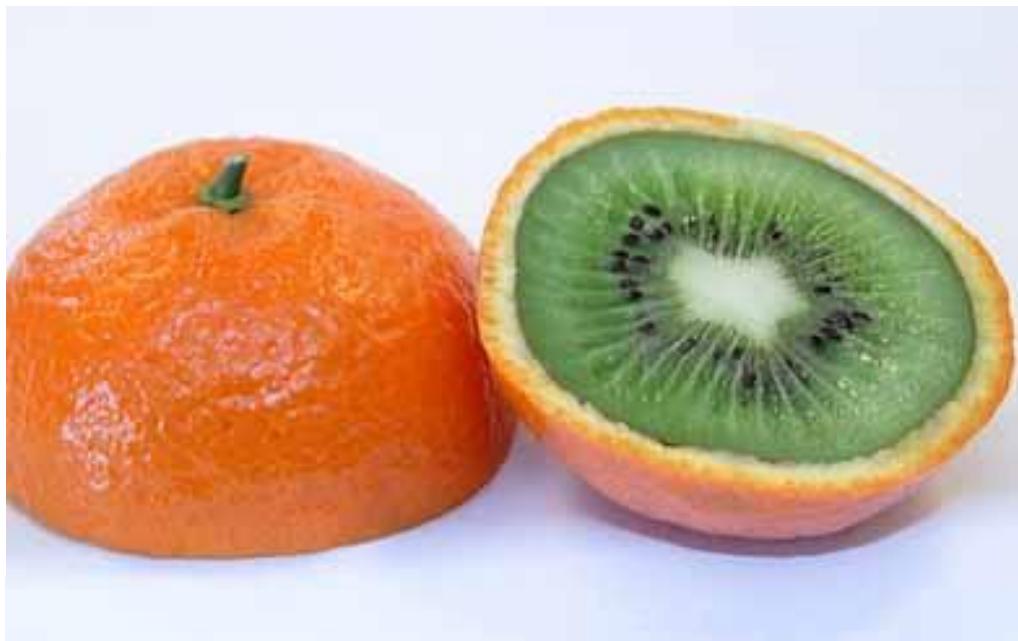
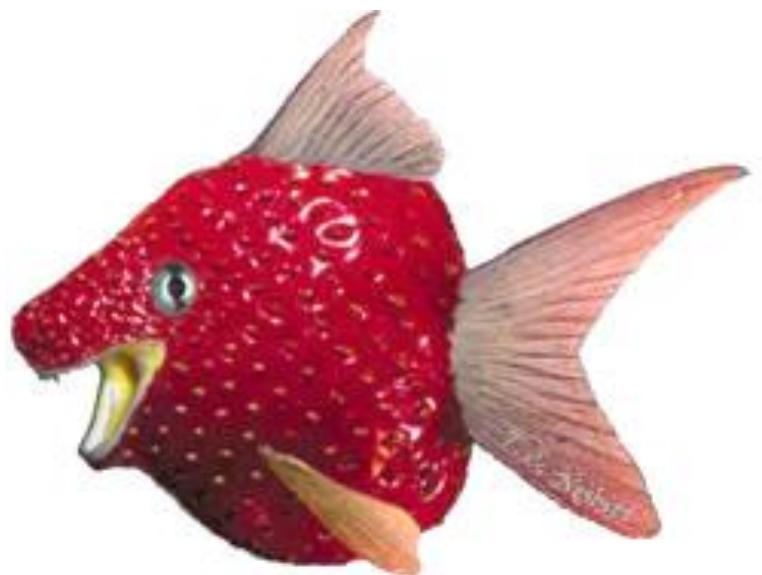
A cosa servono? Le cellule staminali adulte, come quelle embrionali, in natura servono a rigenerare e a riparare i tessuti di cui fanno parte, e potrebbero avere lo stesso uso anche in medicina, per rimpiazzare delle parti di un organo o di un tessuto perdute o danneggiate. Nonostante le loro potenzialità siano più limitate rispetto alle cellule staminali embrionali, in quanto possono generare solo pochi tipi di cellule specializzate e in numero minore, presentano diversi vantaggi che le rendono estremamente preziose:

- 1) **Possono essere estratte da una persona adulta e reimpiantate nella stessa persona, evitando problemi di incompatibilità.** L'auto-trapianto di cellule del midollo osseo viene comunemente fatto per persone che devono subire una chemioterapia molto aggressiva: a queste vengono prelevate delle cellule staminali del midollo, quindi viene effettuata la chemioterapia e infine le staminali vengono rimesse nel circolo sanguigno della stessa persona in modo che vadano a ripopolare il midollo distrutto dalla chemioterapia. Le cellule staminali adulte possono essere anche usate per la terapia genica: in questo caso vengono estratte da un paziente portatore di una grave malattia genetica, vengono modificate in laboratorio in modo da riparare il difetto e reintrodotte nel paziente.
- 2) **Non pongono problemi etici**, poiché per ottenerle non è necessario distruggere embrioni.

Si possono usare le cellule staminali adulte per curare malattie? Sì, le cellule staminali adulte sono già impiegate per curare alcune malattie: le cellule staminali del sangue sono usate per curare leucemie e linfomi, le cellule staminali corneali vengono trapiantate per rimediare a danni della cornea, le cellule staminali della pelle vengono adoperate per curare i grandi ustionati. Inoltre le cellule staminali adulte sono in sperimentazione per un gran numero di altre malattie. Le speranze più grandi sono riposte nelle cellule staminali neurali e nelle cellule staminali mesenchimali, che sono in fase di sperimentazione per curare un gran numero di malattie.



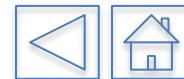
la tecnologia del DNA ricombinante



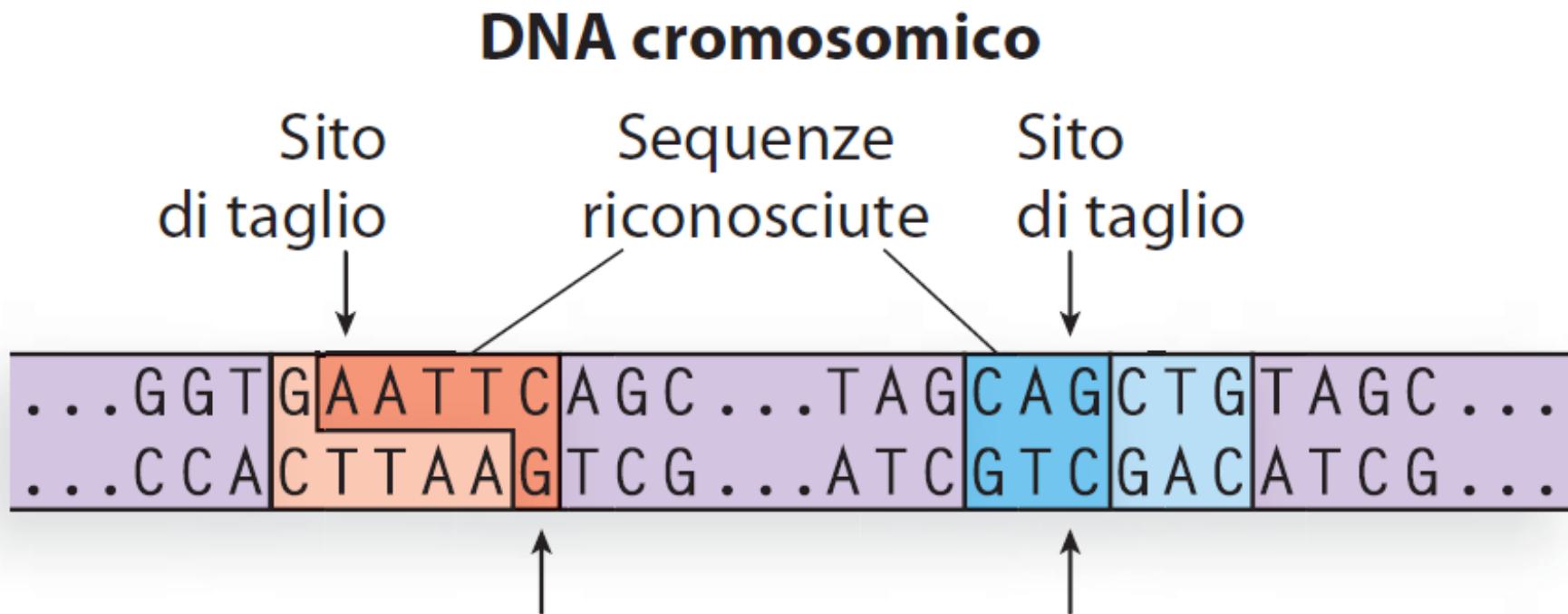
la tecnologia del DNA ricombinante

1. Tagliare il DNA – gli enzimi di restrizione
2. Separare miscele di frammenti di DNA, elettroforesi su gel di agarosio
3. Incollare il DNA – la DNA ligasi
4. Individuare sequenze specifiche di basi analisi di ibridazione
5. Copiare il DNA la DNA polimerasi
6. Sintetizzare DNA da uno stampo di RNA (trascrittasi inverse e DNA)
7. Amplificare il DNA: la PCR
8. Sequenziare il DNA
9. CRISPR
10. Clonaggio del DNA
 - Vettori di clonaggio
 - Modalità di introduzione del vettore di DNA nelle cellule ospiti
 - Geni marcatori
 - Biblioteche di DNA

Tagliare il DNA – gli enzimi di restrizione



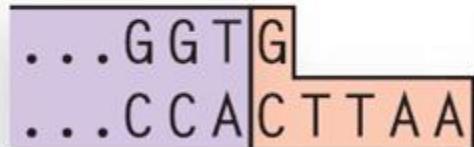
Le **endonucleasi di restrizione** sono enzimi batterici in grado di legarsi a specifiche sequenze del DNA (generalmente di 4 – 6 paia di basi) e **tagliare la doppia elica** all'interno della sequenza bersaglio.



riconoscono sequenze palindromiche lunghe 4- 6 paia di basi

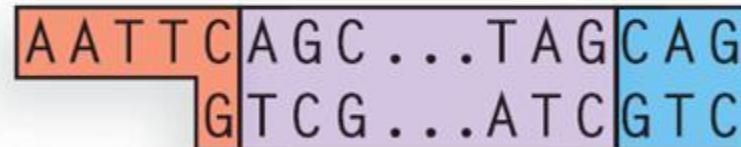
Il taglio genera estremità che possono essere **piatte** oppure **sporgenti**, nel qual caso si definiscono **coesive (sticky ends)**

Endonucleasi
di restrizione
EcoRI

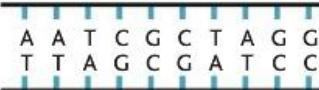
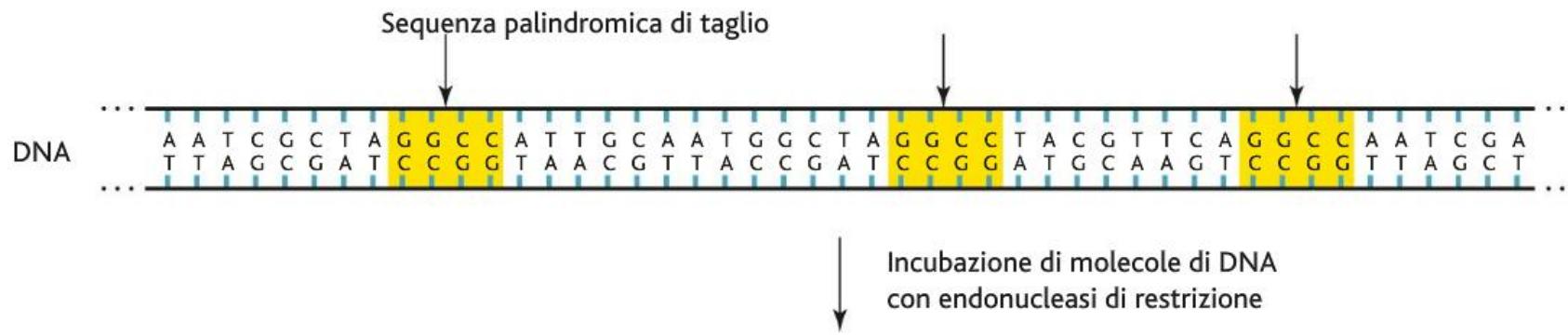


Estremità coesive

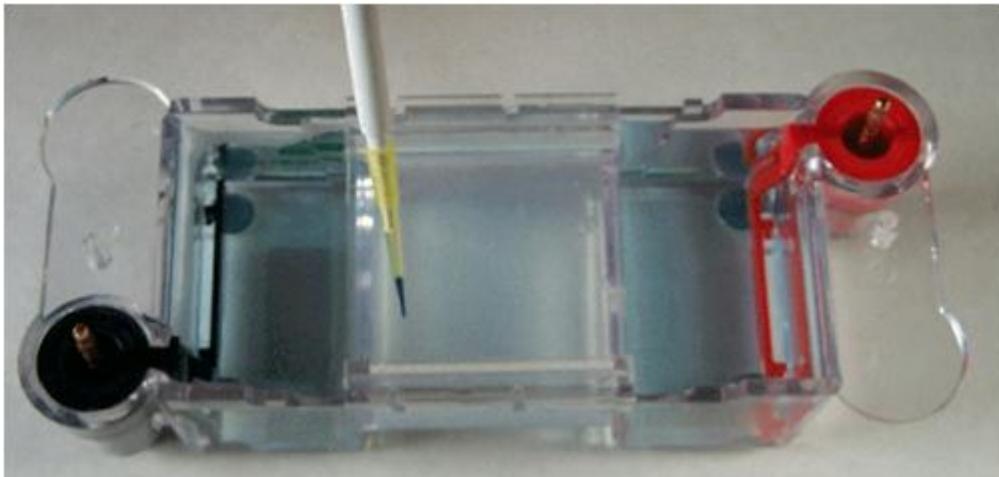
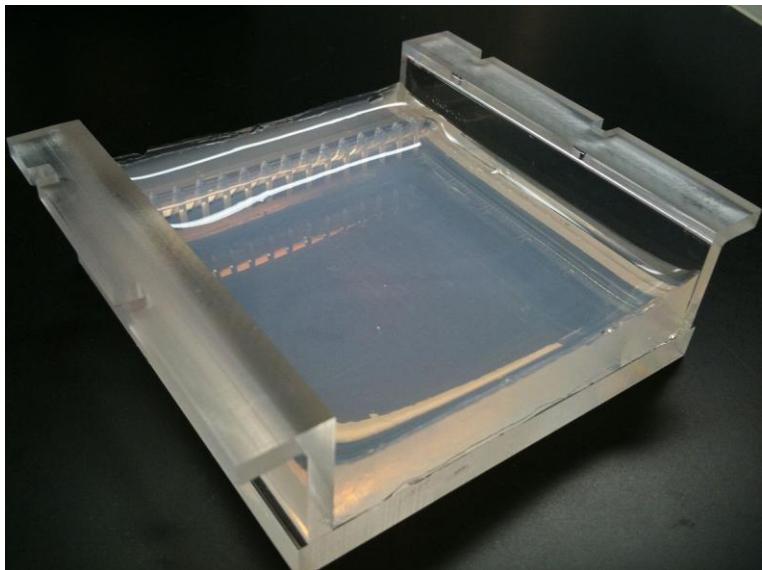
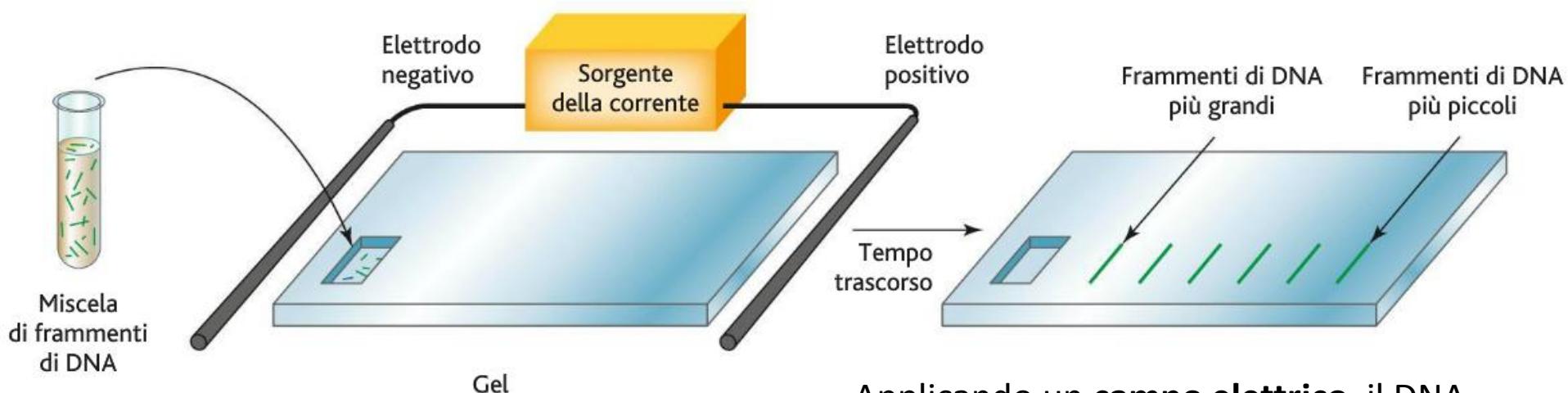
Endonucleasi
di restrizione
Pvull



Estremità piatte

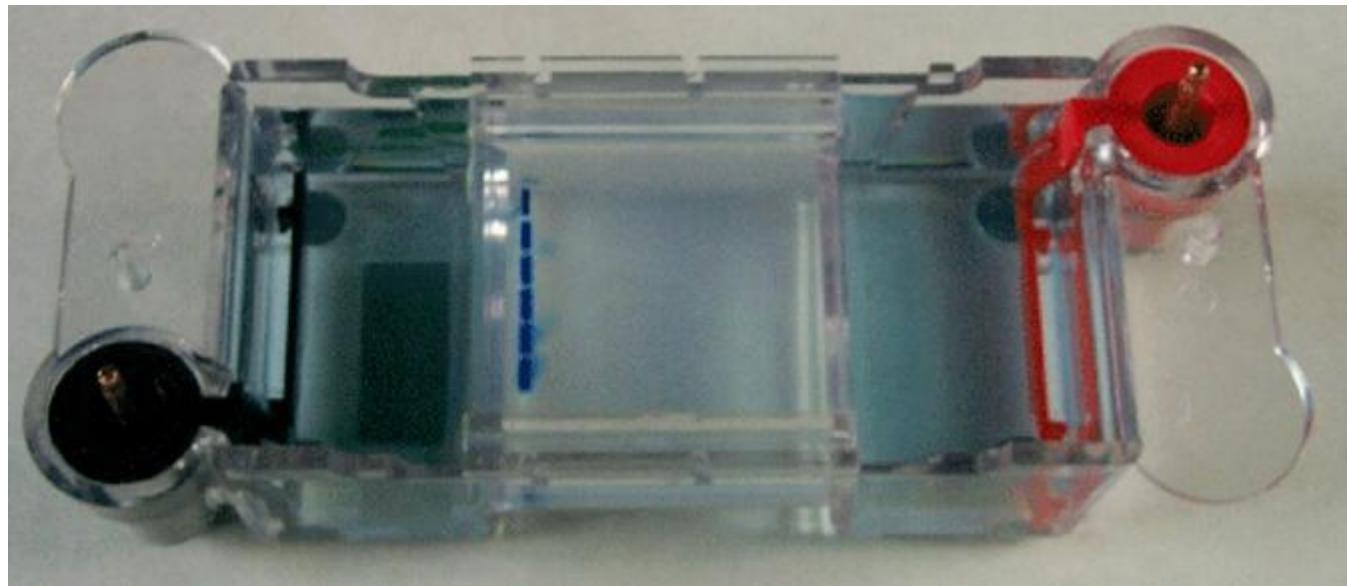
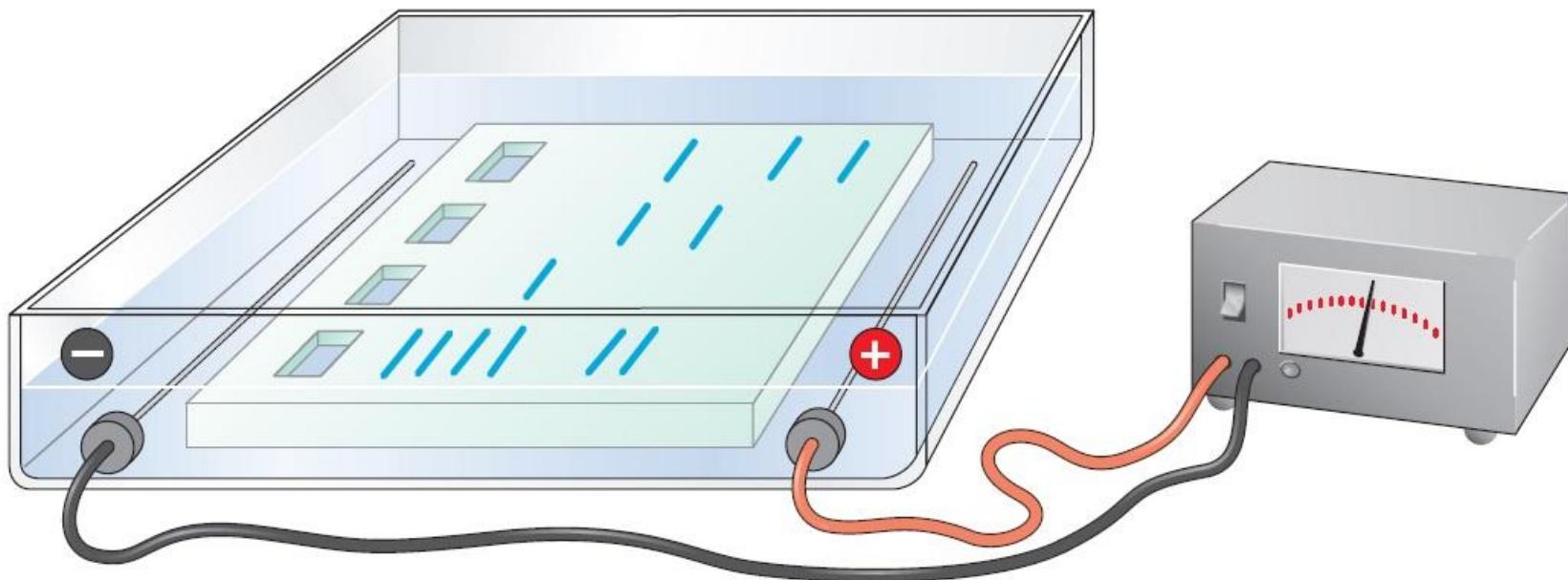


Separare miscele di frammenti di DNA elettroforesi su gel di agarosio

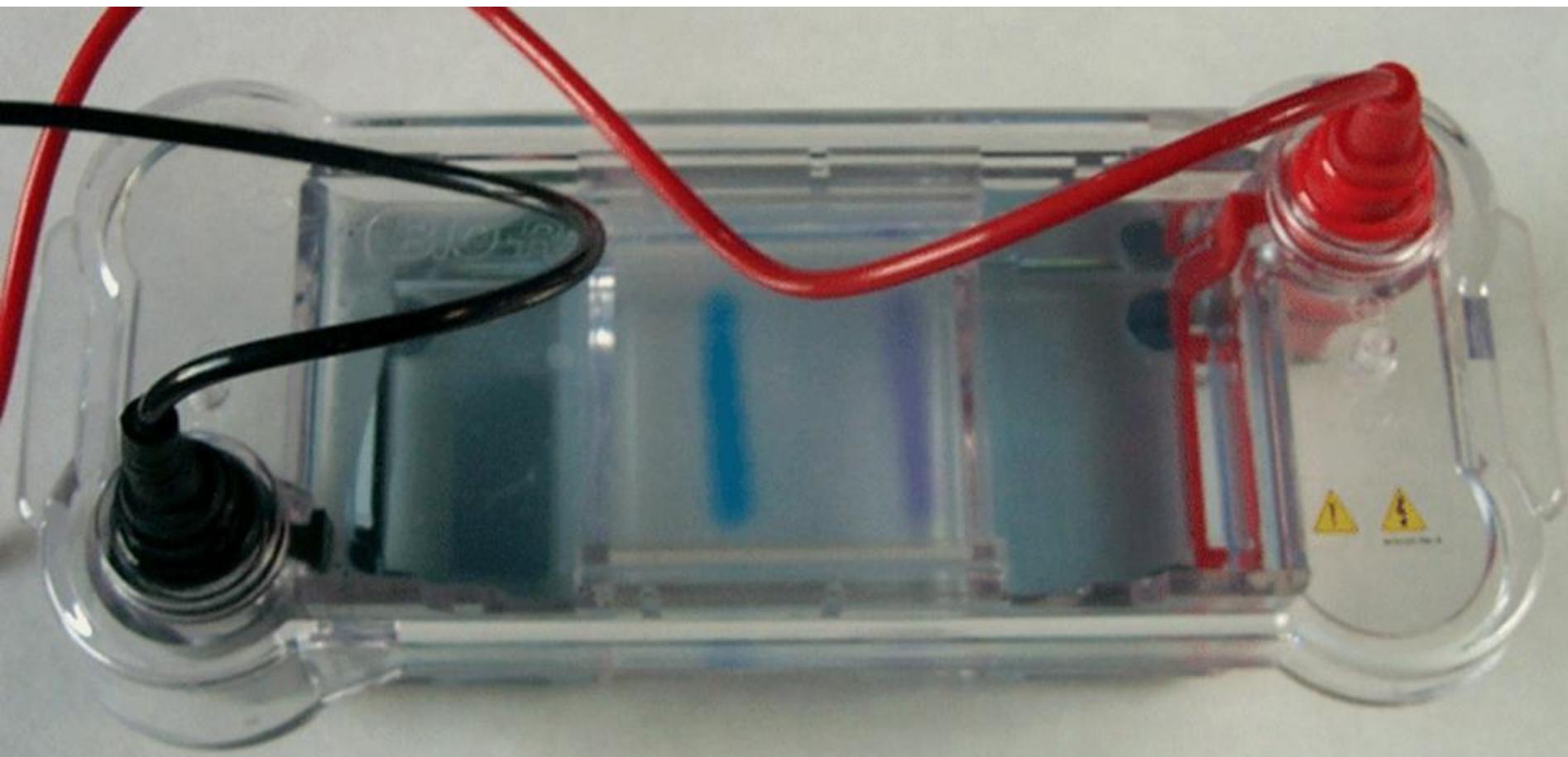


Applicando un **campo elettrico**, il DNA (carico **negativamente**) migra verso il **polo positivo** e le molecole si separano in base al **peso molecolare (P.M.)**

Elettroforesi su gel di agarosio



Elettroforesi su gel di agarosio

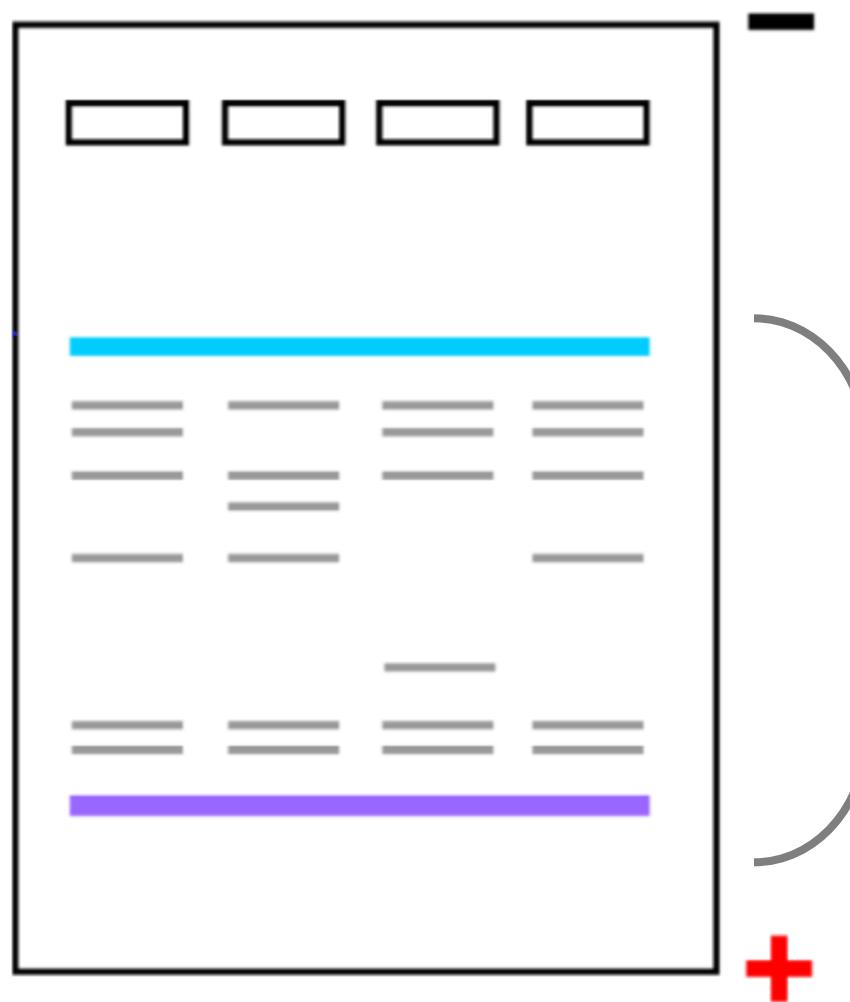


Elettroforesi su gel di agarosio

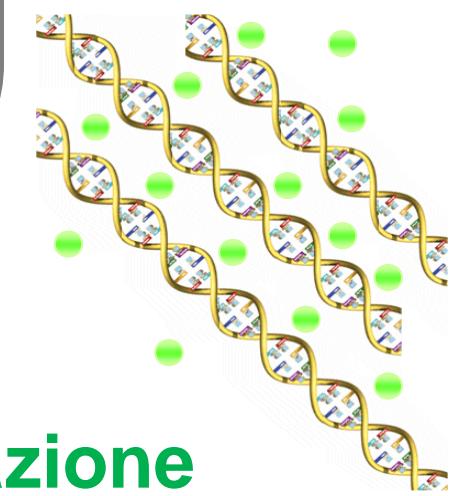
Xilene cianolo
(circa 4 Kpb)



Blu di bromofenolo
(circa 300bp)



colorazione



.....I'.....II'.....III'.....IV'.....V'.....VI'.....VII'.....VIII'.....IX'.....X'.....XI'.....XII'.....T'



L

3000 bp

2000

1000

900

800

700

600

500

450

400

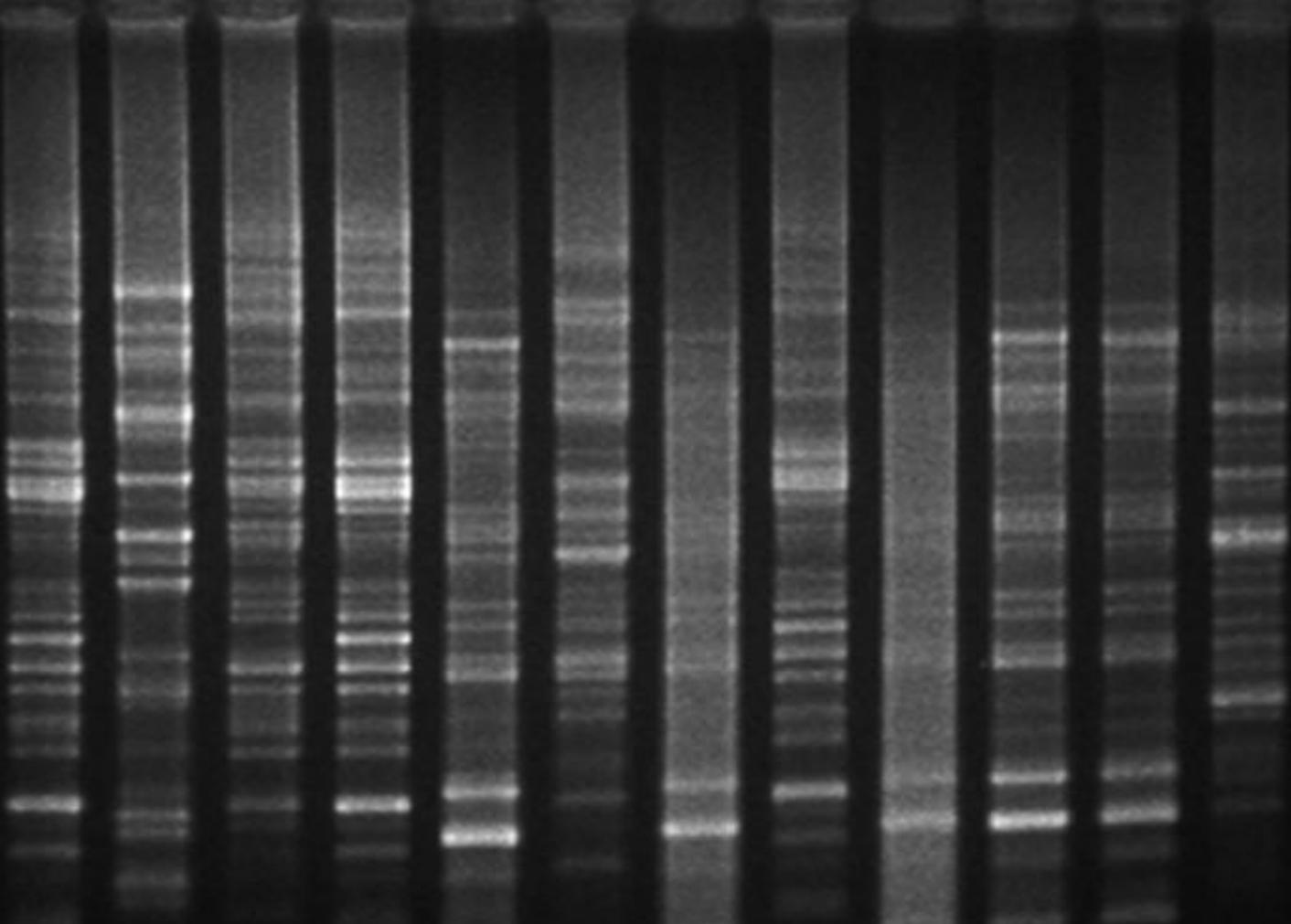
350

300

250

200

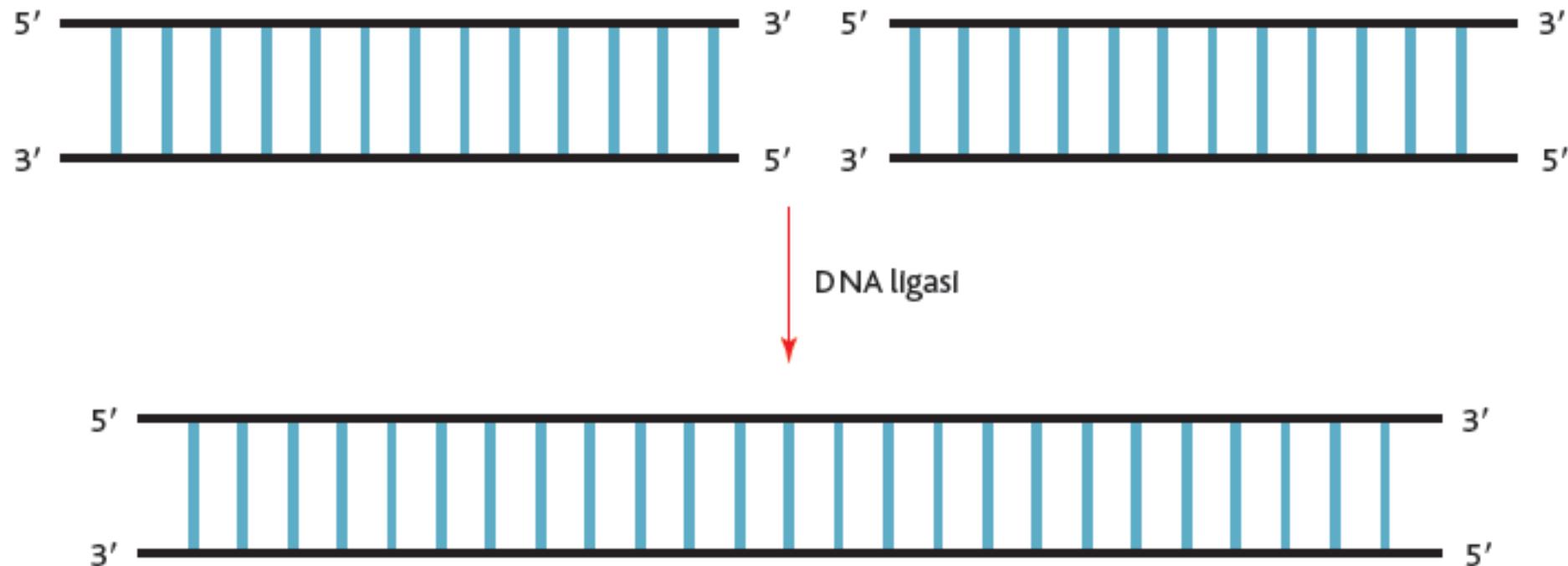
150



Incollare il DNA – la DNA ligasi



Per inserire il DNA all'interno di un organismo è necessario utilizzare le **DNA ligasi**, enzimi presenti in tutte le cellule e in grado di ripristinare il **legame fosfodiesterico** tra due nucleotidi adiacenti in una catena di DNA. In questo modo è possibile saldare insieme due frammenti di DNA distinti.



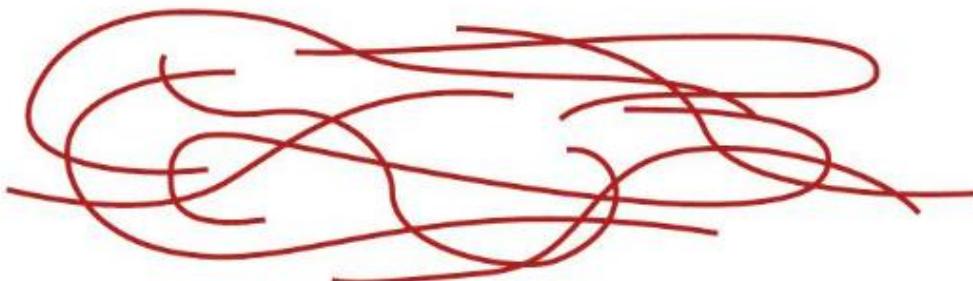
Individuare sequenze specifiche di basi analisi di ibridazione



A A G C T A T G C A T T C C G

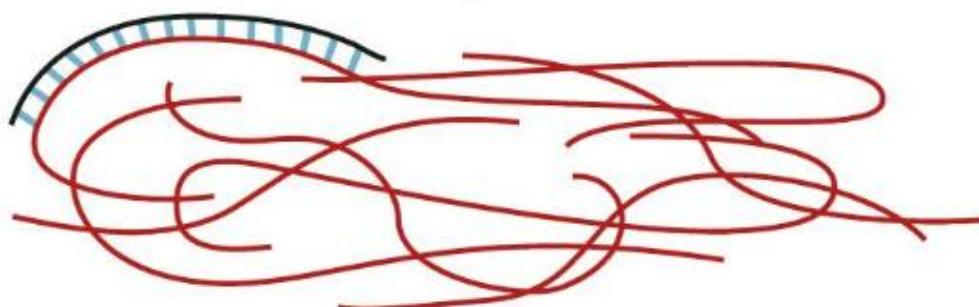
Sonda a singolo
filamento

+



Campione di DNA
con filamenti
separati

*contiene la sequenza
genica di interesse?*



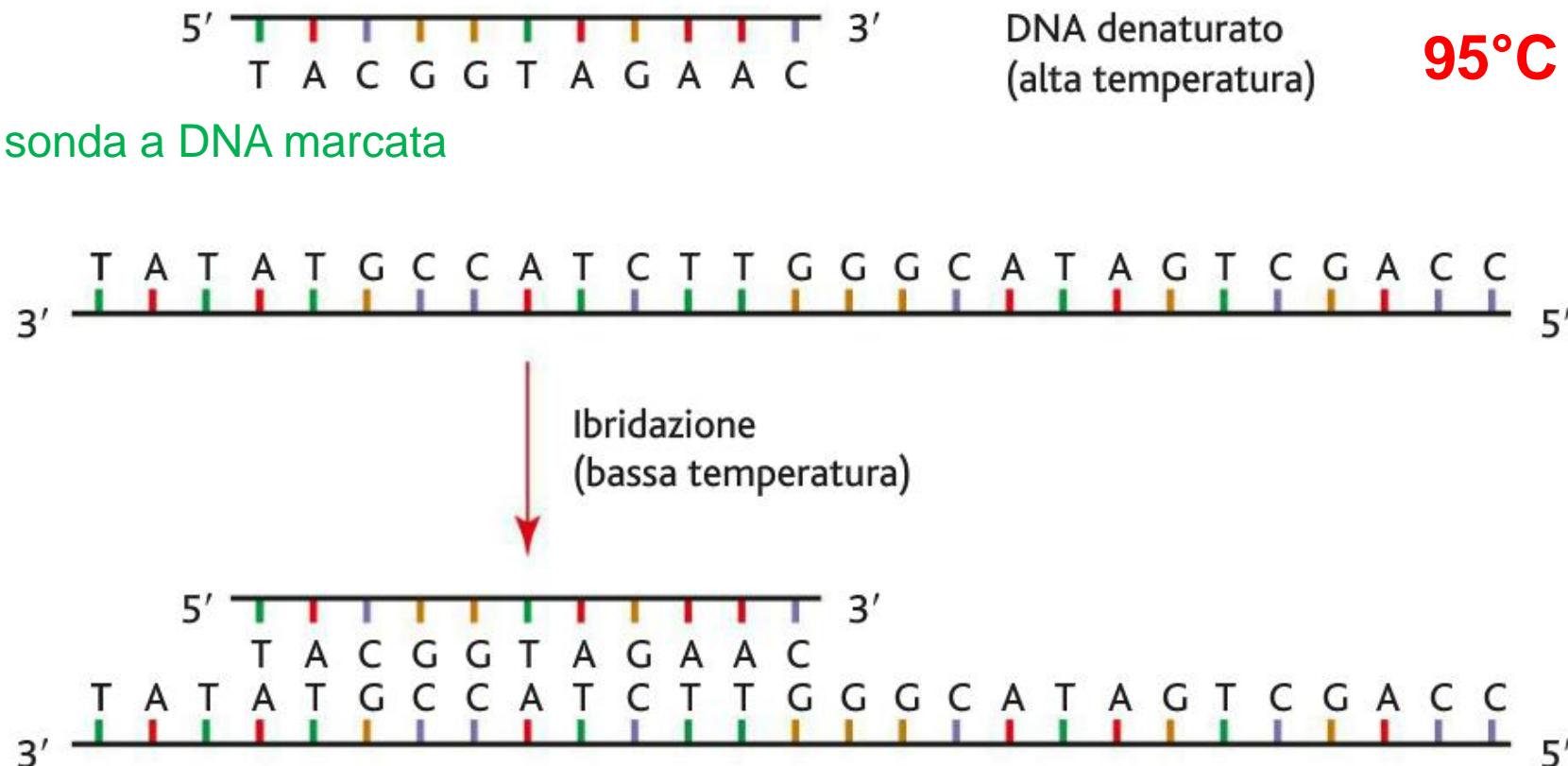
Se il campione di DNA contiene la sequenza di basi complementari, la sonda formerà coppie di basi con il campione di DNA, cioè ibriderà con il campione e si attaccherà a esso

Individuare sequenze specifiche di basi

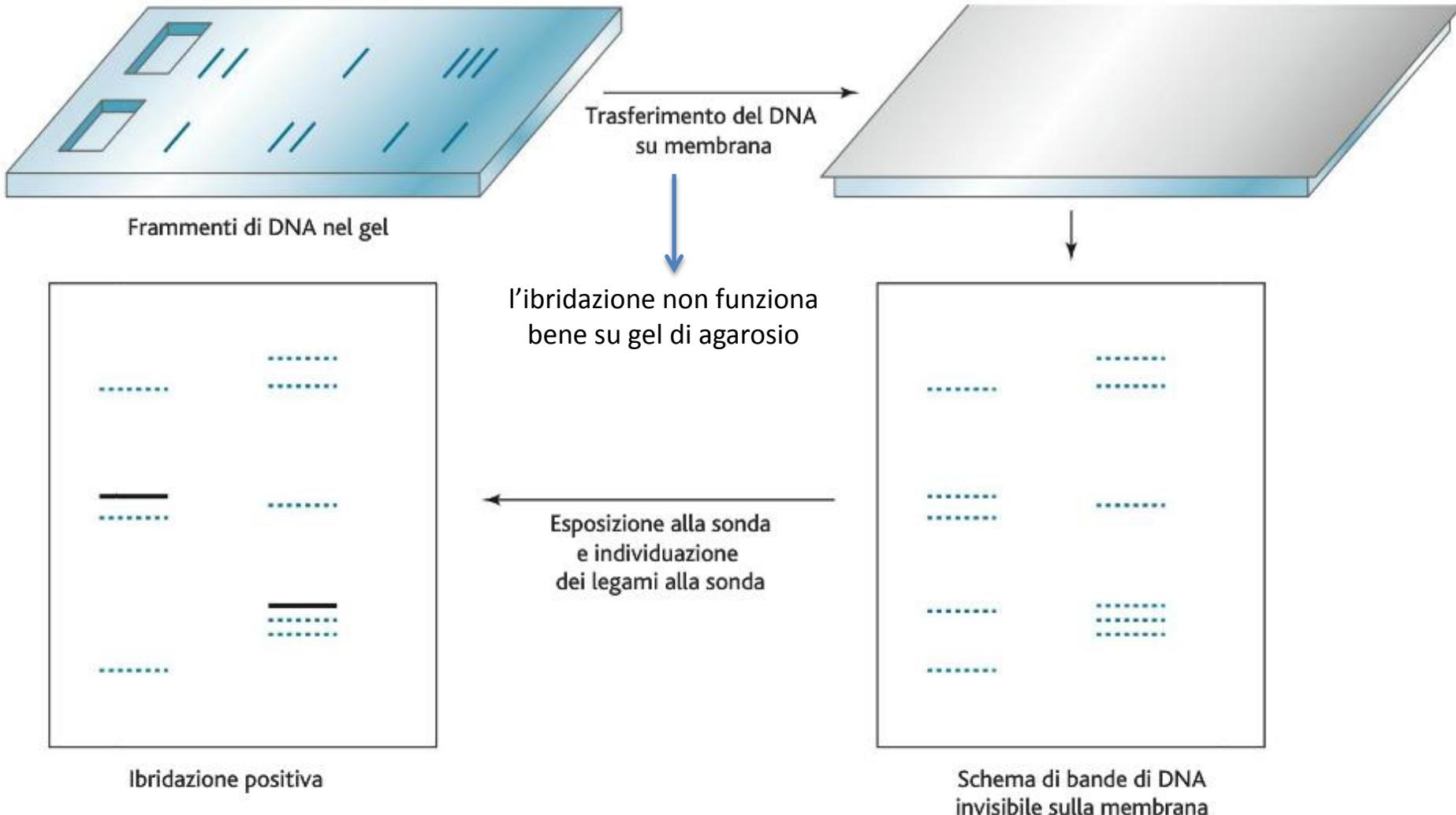


Ibridazione del DNA

processo spontaneo attraverso cui due filamenti singoli di DNA con sequenze di basi complementari si appaiano formando una molecola a doppio filamento



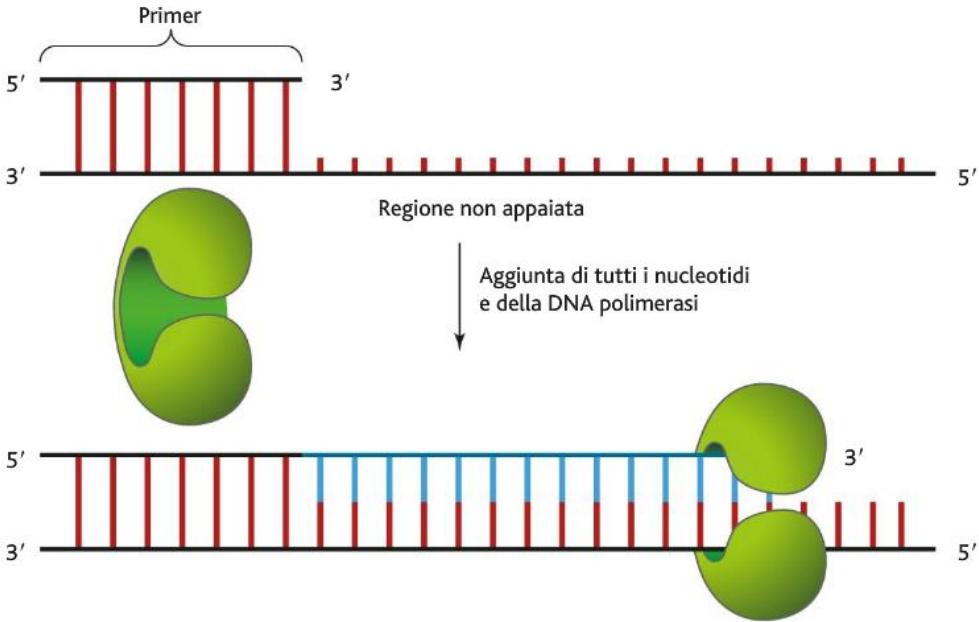
Individuare sequenze specifiche di basi localizzare una sequenza di basi in un frammento



Southern blotting → **assorbimento**

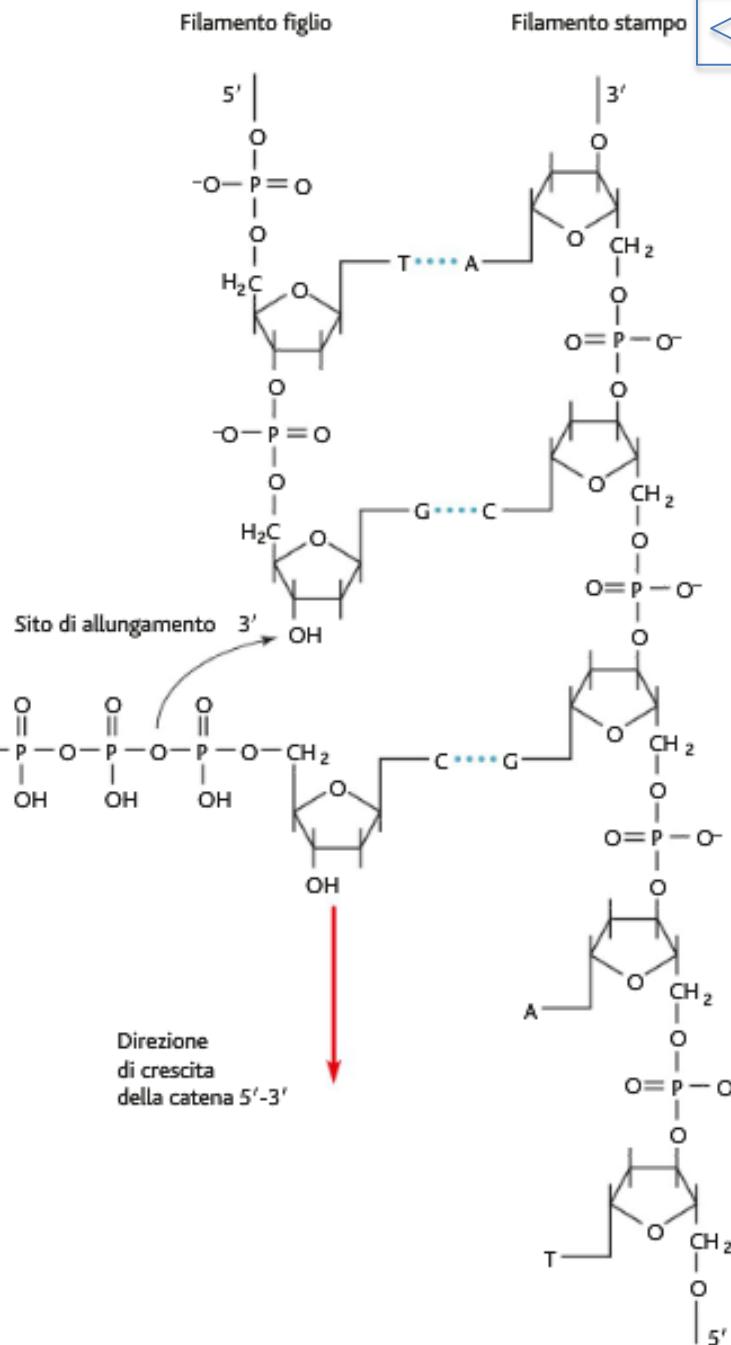
Copiare il DNA

la DNA polimerasi

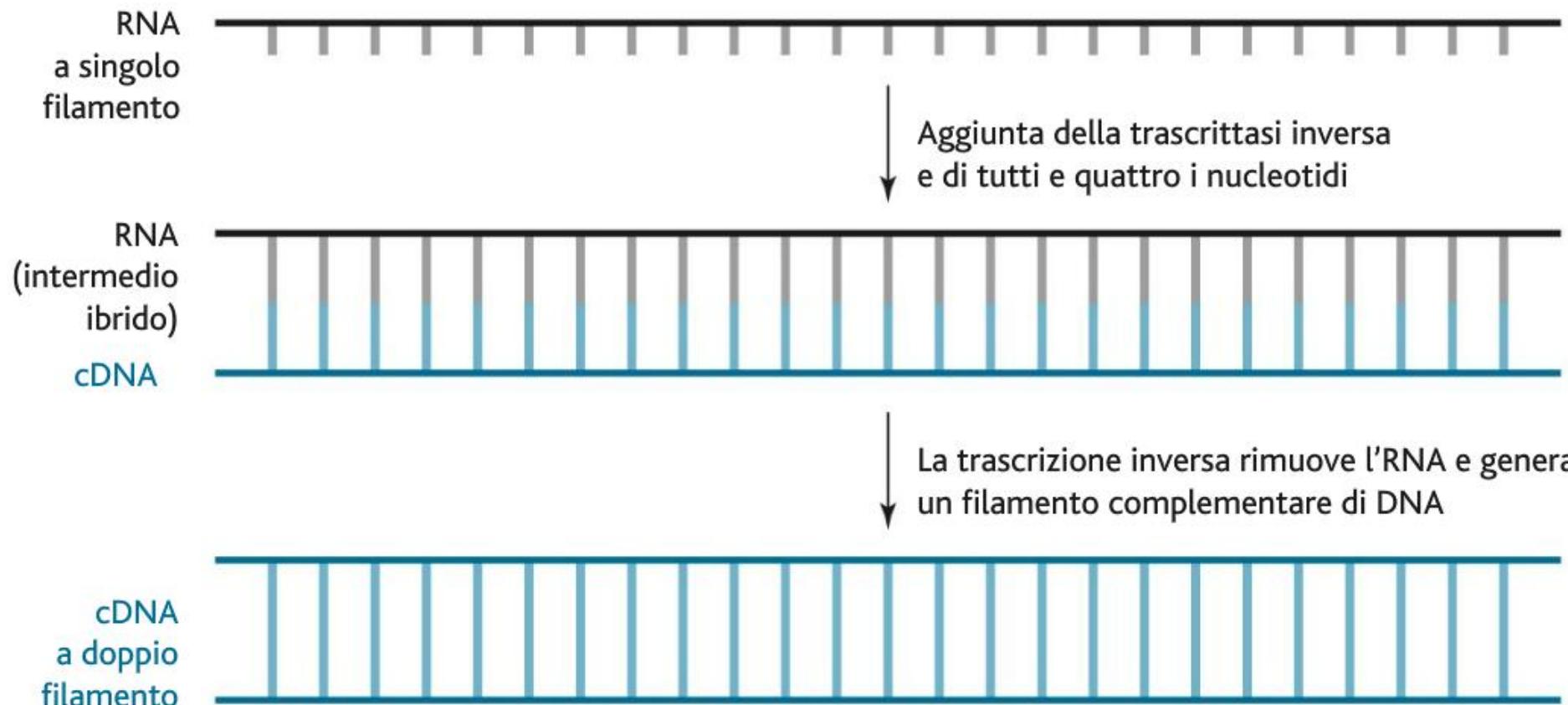


Inserisce nucleotidi all'estremità 3'
del filamento in crescita

Richiede uno stampo di DNA a filamento singolo
Richiede un primer (oligonucleotide sintetico)



Sintetizzare DNA da uno stampo di RNA le trascrittasi inverse e la sintesi di cDNA



per ottenere un gene già sottoposto a splicing, destinato a una cellula batterica

[splicing](#)

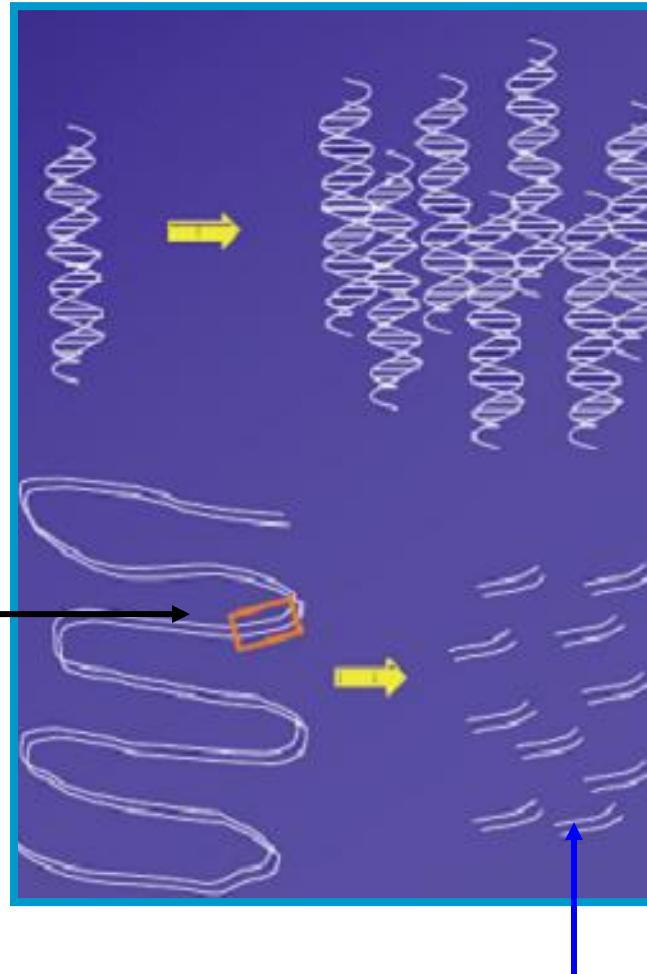
[splicing alternativo](#)

[ciclo virus HIV](#)

Amplificare il DNA: la PCR (Polymerase Chain Reaction)

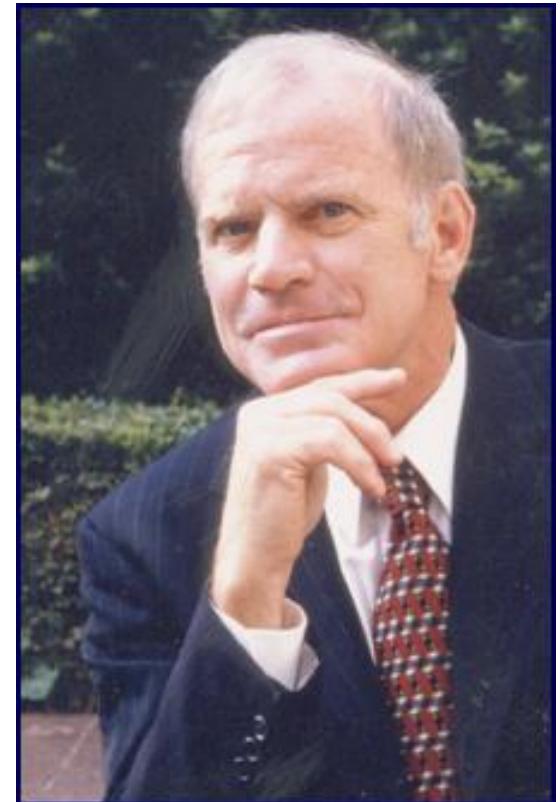


Permette di amplificare in modo selettivo SOLO UNA REGIONE del DNA



Cos'è la Polymerase Chain Reaction (PCR)?

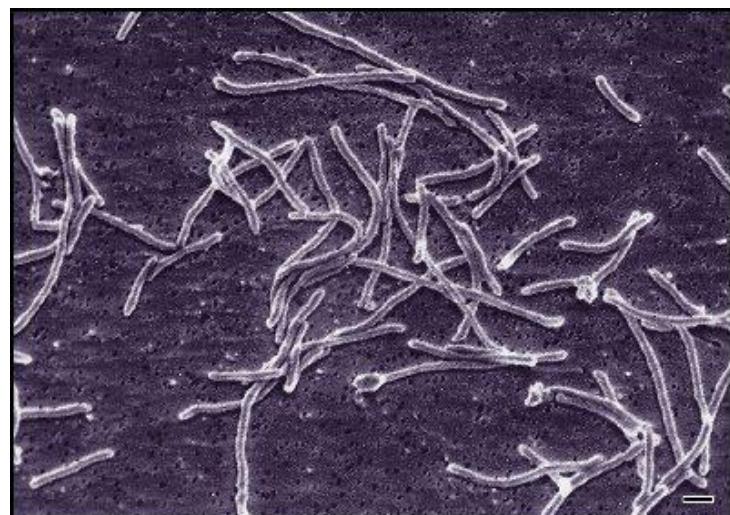
“Conoscevo abbastanza l’informatica, e questo mi permetteva di comprendere il potere di una procedura matematica reiterativa: di quando cioè applichi una determinata procedura a un numero iniziale per ottenerne un altro, e poi la ripeti sul nuovo numero, e così via... Se avessi potuto far sì che un breve tratto di DNA sintetico trovasse una particolare sequenza, e poi avviare un processo di riproduzione, mi sarei avvicinato alla soluzione... All’improvviso capii come fare... In un ciclo di replicazione avrei potuto avere due copie, in due cicli quattro, e in dieci cicli... “Cazzo”, sbottai, e mollai l’acceleratore... All’altezza della pietra miliare 46.58, sulla Highway 128, stava per affacciarsi l’era della PCR.” (da Ballando nudi nel campo della mente – Kary Mullis, Premio Nobel per la Chimica nel 1993).



Cosa occorre per la reazione di PCR ?

- **DNA:** regione che si desidera amplificare
- **PRIMERS:** oligonucleotidi complementari alle estremità del frammento da amplificare
- **NUCLEOTIDI:** miscela di dATP ; dCTP ; dGTP ; dTTP
- **ENZIMA:** Taq DNA polimerasi

Thermus aquaticus è un batterio termofilo isolato per la prima volta nelle pozze di acqua calda del parco nazionale di Yellowstone.



Quali operazioni vengono compiute?

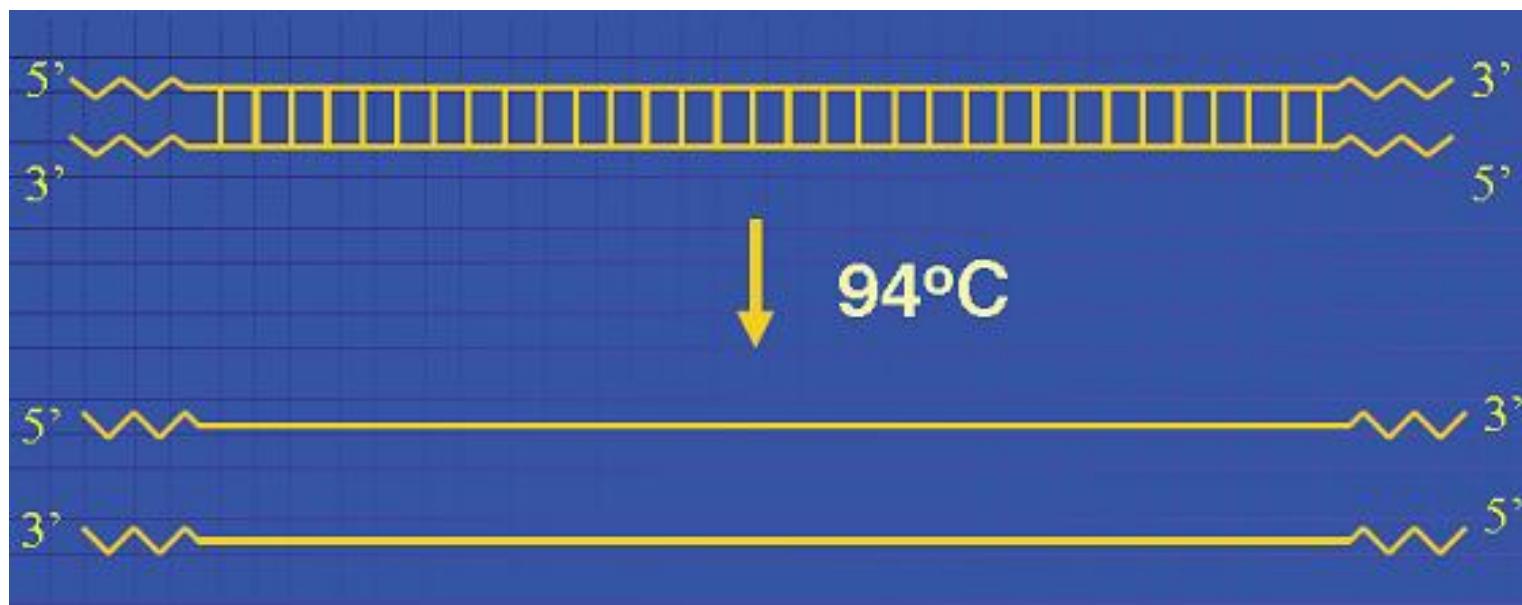
- Immissione dei reagenti nella PCR
- Variazione ciclica della temperatura:
 - **94 °C** Separazione filamenti complementari
 - **55 °C** Appaiamento
 - **72 °C** Allungamento
- Ripetizione del ciclo per n volte

un **termociclato**, la macchina usata per la PCR



1a FASE : Separazione filamenti complementari 94 °C

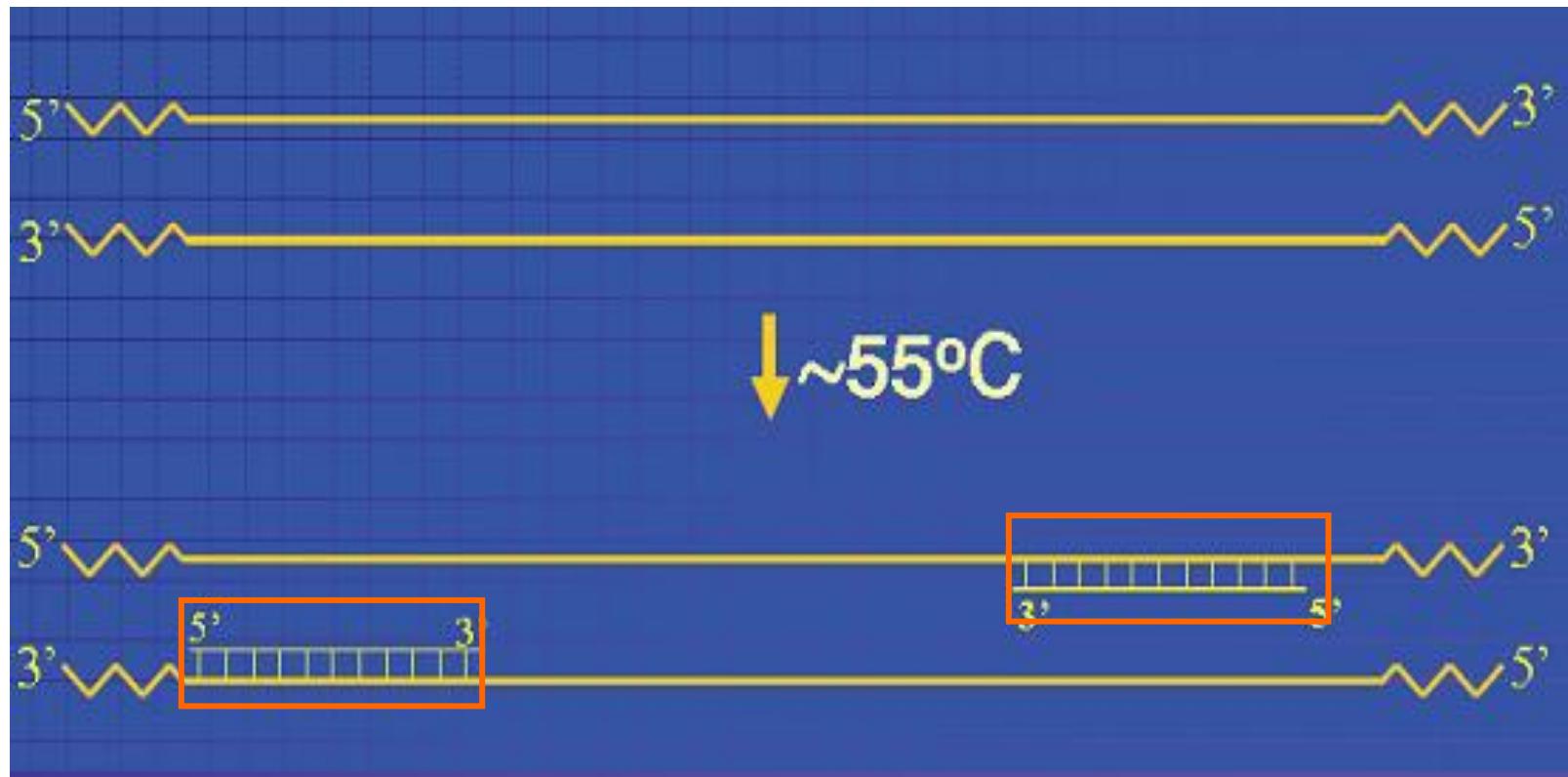
Il calore provoca la denaturazione del DNA con separazione dei 2 filamenti complementari



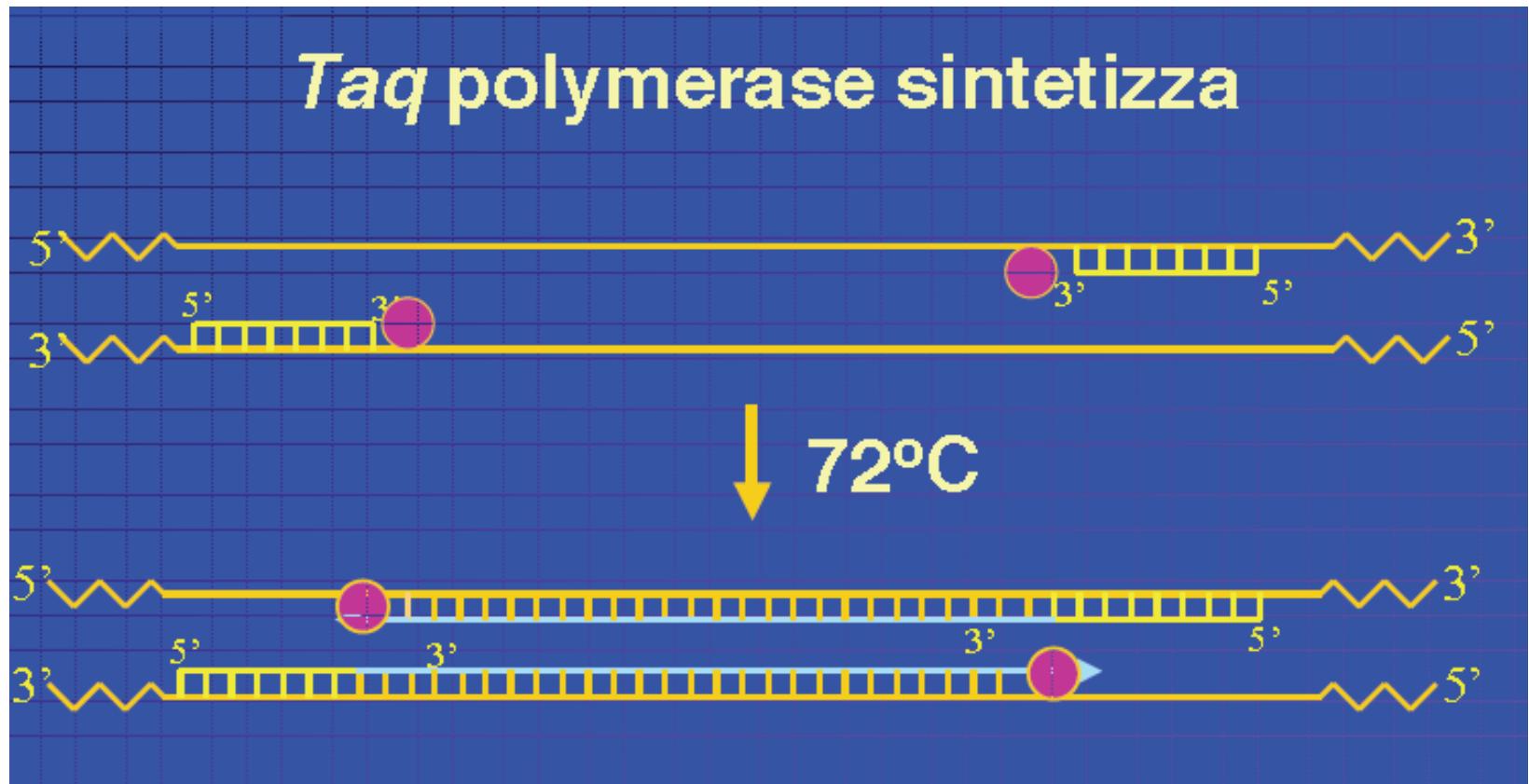
Questo processo risulta però incompatibile con la DNA polimerasi umana, che viene distrutta alle temperature necessarie alla denaturazione .

2a FASE : Appaiamento, temperatura circa 55 °C

I PRIMERS si legano alle estremità della regione da amplificare grazie alla complementarietà delle basi

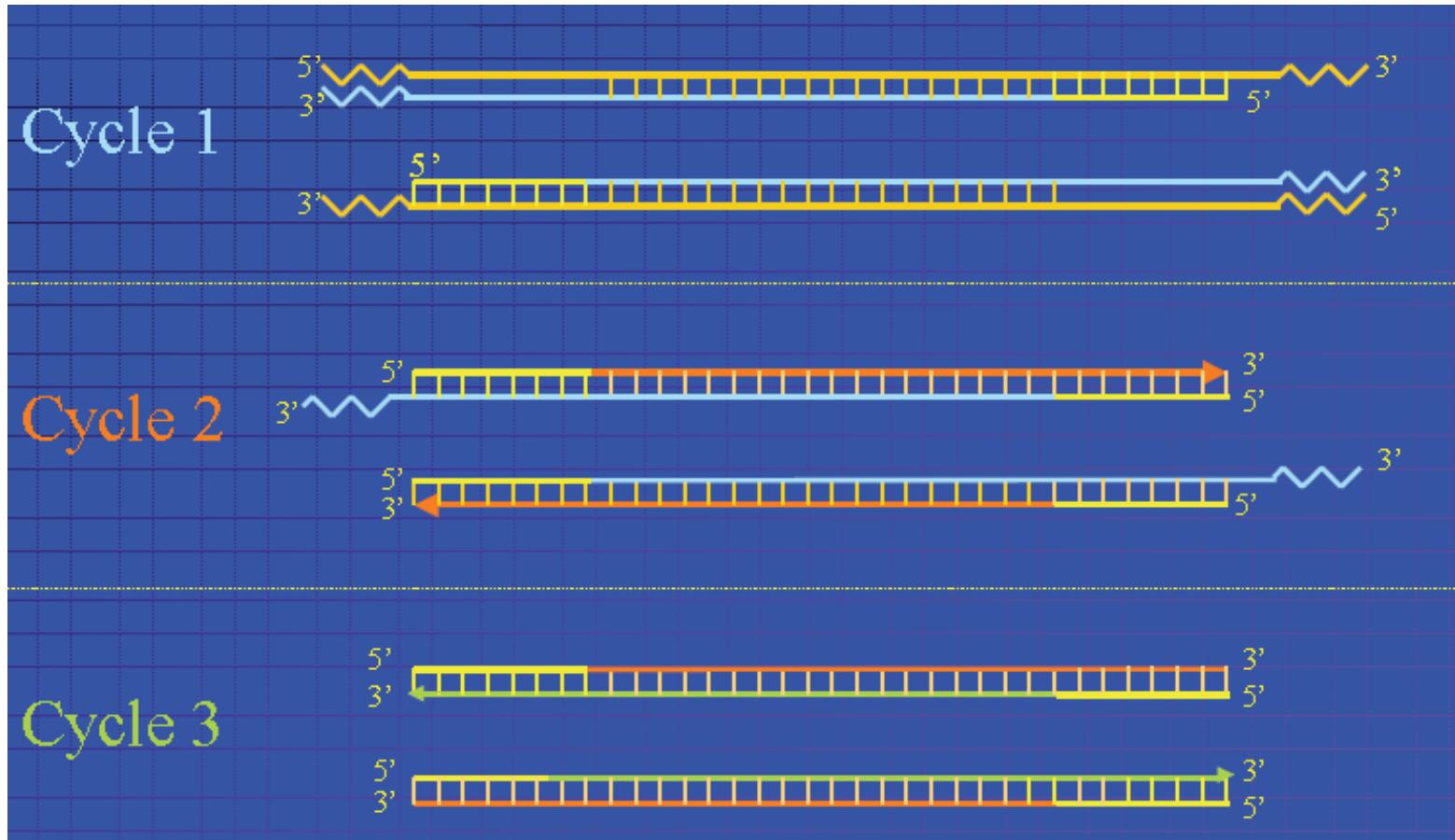


3a FASE: ALLUNGAMENTO a 72 °C



La temperatura viene alzata fino a 72 °C al fine di massimizzare l'azione della TAQ polimerasi che determina un allungamento dei *primer* legati, utilizzando come stampo il filamento singolo di DNA.

DAL 3° CICLO IN POI SI HA L'AMPLIFICAZIONE SPECIFICA DEL FRAMMENTO SELEZIONATO



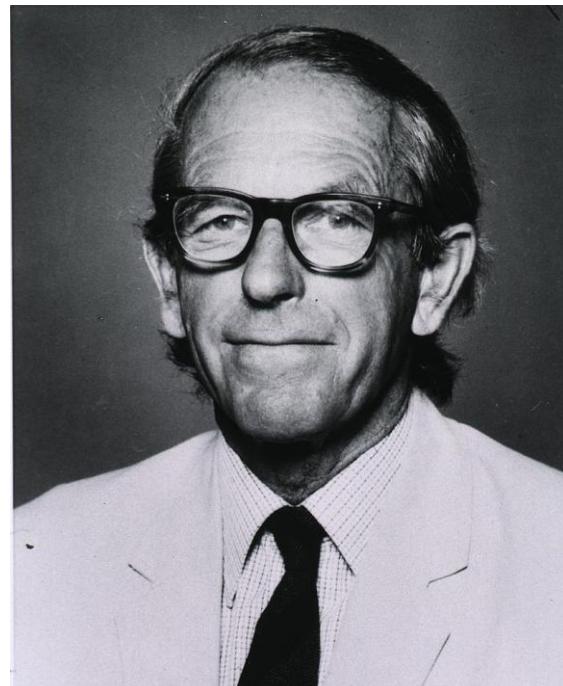
Sequenziare il DNA

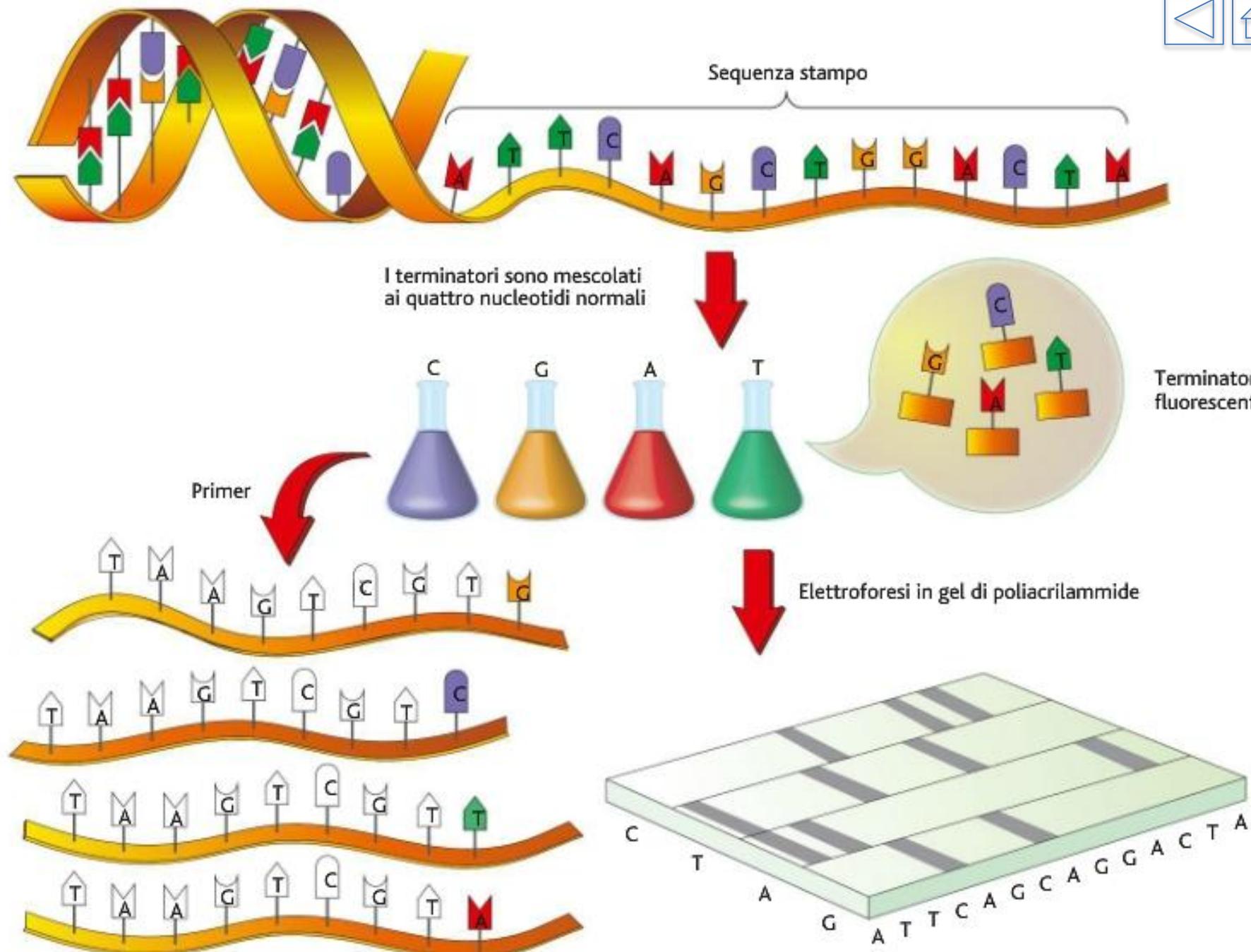


Determinare l'ordine dei diversi **nucleotidi** (quindi delle quattro basi azotate che li differenziano) che costituiscono l'acido nucleico

**metodo Sanger con
terminatori di catena**
(chain termination method – 1975)

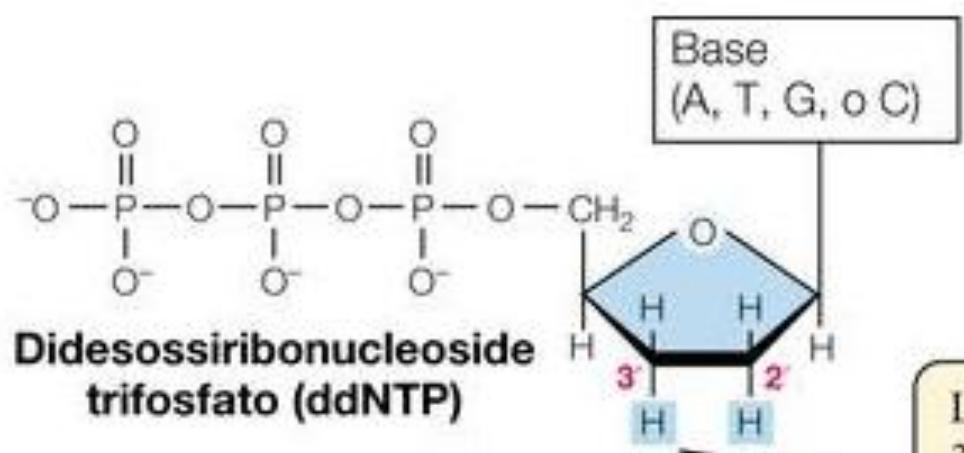
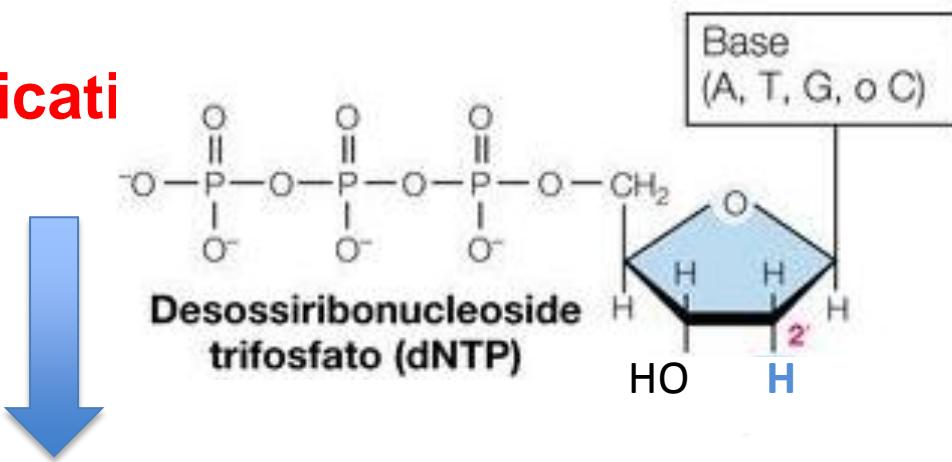
Frederick Sanger (1918 – 2013) chimico britannico,
premio Nobel per la chimica nel 1958 e nel 1980





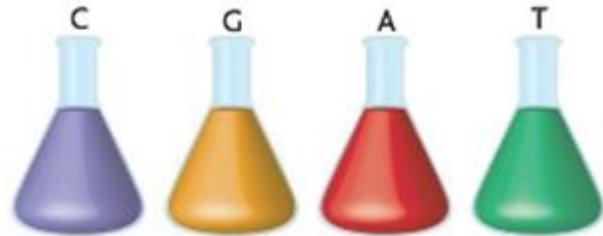
Si basa su:

- PCR
- uso di nucleotidi modificati

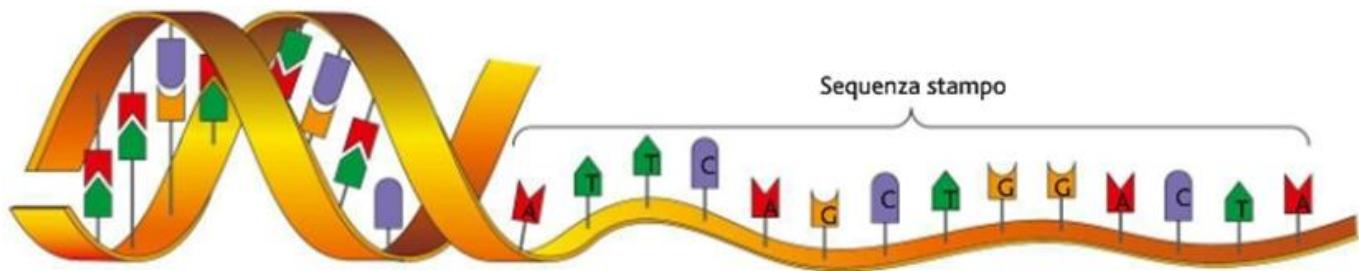


L'assenza del gruppo -OH in posizione 3' impedisce l'aggiunta di un altro nucleotide alla catena in via di sintesi.

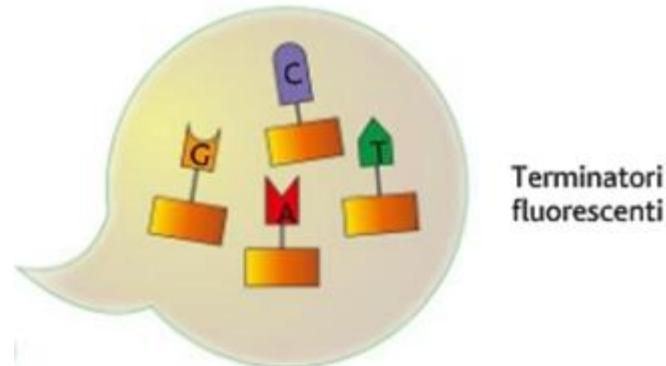
La sequenza di DNA viene studiata **preparando QUATTRO miscele di reazione** che contengono:



- il **DNA da sequenziare** (funziona da stampo)



- un **primer** per iniziare la reazione di polimerizzazione
- la **DNA polimerasi**
- quattro **deossinucleotidi** (dATP, dGTP, dTTP, dCTP)
- in ogni miscela uno dei quattro **nucleotidi dideossi** (ddATP, ddGTP, ddTTP, ddCTP)

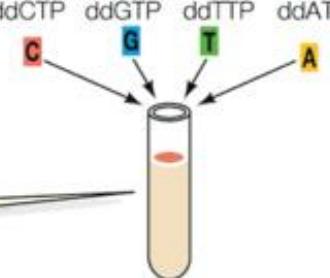




1 Viene isolato un frammento di DNA a singolo filamento di cui si vuole determinare la sequenza delle basi (lo stampo).

5' ?????????????????????? 3'

2 Ognuno dei ddNTP è legato a un diverso colorante fluorescente.



3 A un campione del DNA di cui si vuole determinare la sequenza viene aggiunto un primer, la DNA polimerasi, i dNTP e i ddNTP fluorescenti; ha inizio la sintesi.

Filamento stampo

5' ?????????????????CGCA 3'
3' GCGT 5' Primer (sequenza nota)

4 Nell'esempio il risultato mostra cosa si lega alla T presente nel filamento da sequenziare. Se casualmente si lega ddATP A invece di dATP, la sintesi si arresta. Viene così ottenuta una serie di frammenti di lunghezza differente, ognuno dei quali termina con un ddNTP.

5' T????????????????CGCA 3'
3' AATCTGGGCTATTGGGGCGT 5'

5' TT????????????????CGCA 3'
3' ATCTGGGCTATTGGGGCGT 5'

5 I frammenti neosintetizzati di lunghezza differente vengono separati mediante elettroforesi.

Elettroforesi

A
A
T
C
T
G
G
G
C
T
A
T
C
G
G

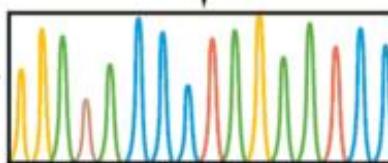
Frammento più lungo

Laser

Rivelatore

6 Ogni frammento emette fluorescenza di un colore che identifica il ddNTP che ne ha determinato l'arresto della sintesi. Il colore all'estremità di ogni frammento viene rivelato per mezzo di un raggio laser.

7 La sequenza del DNA può essere dedotta in base ai colori di ciascun frammento di DNA neosintetizzato...



8 ... e convertita nella sequenza complementare del filamento stampo.

3' AATCTGGGCTATTGGGGCGT 5'
5' TTAGACCCGATAAGCCCGCA 3'

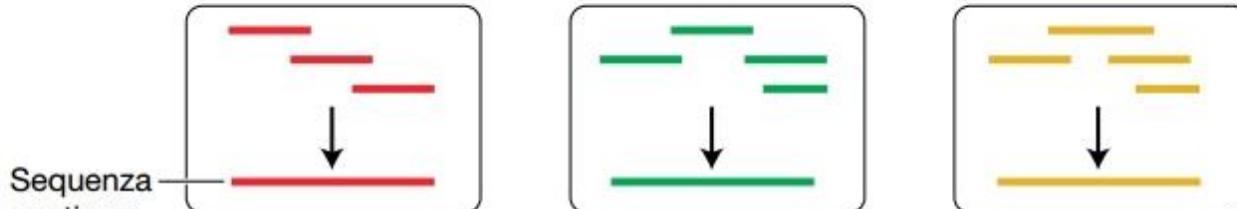
Genoma

- 1 Taglio in frammenti casuali di molte copie del genoma



- 2 Sequenziamento di ogni frammento

- 3 Sovrapposizione delle sequenze di lettura



- 4 Sovrapposizione dei contig per ottenere la sequenza completa



La logica per ottenere la sequenza di un genoma Per ottenere la sequenza completa del genoma, il DNA viene tagliato in piccoli frammenti successivamente sequenziati. Le sequenze così ottenute, vengono infine sovrapposte fino a ottenere una sequenza consenso a doppia elica del genoma.





febbraio 2001, pubblicazione dei primi lavori sulla sequenza del genoma umano

L'esame delle sequenze ha rivelato alcuni dati di estremo interesse. Il più sorprendente è che il nostro genoma contiene **circa 25.000** geni, contro i circa 100000 che i genetisti ritenevano plausibili in precedenza.

Il progetto genoma umano

avviato nel **1988** da J.Watson
completato nel **2003** dal National
Institutes of Health (NIH), dalla
società americana Celera
Genomics e dal consorzio
internazionale HGP





Circa il 95% del DNA umano è costituito da sequenze che non vengono mai tradotte in polipeptidi (*junk DNA* - DNA spazzatura)

Per esempio:

- **telomeri** indispensabili per la conservazione dei cromosomi.
- **introni**, per il meccanismo di splicing alternativo.
- sequenze coinvolte nella **regolazione** dell'espressione genica, direttamente o attraverso speciali RNA, come nel caso del meccanismo chiamato **interferenza dell'RNA**.
- **pseudogeni**, antichi geni che hanno perso funzionalità in seguito a mutazioni. Molti biologi ritengono che la loro presenza possa favorire, per mutazione, la comparsa di nuovi geni in una specie. Vi sono inoltre rari casi di pseudogeni che hanno riacquistato la funzione perduta attraverso una successiva mutazione.
- **trasposoni**, elementi in grado di moltiplicarsi e spostarsi nel DNA che da soli costituiscono fino al 50% del genoma umano.



A cosa serve il Progetto Genoma Umano?

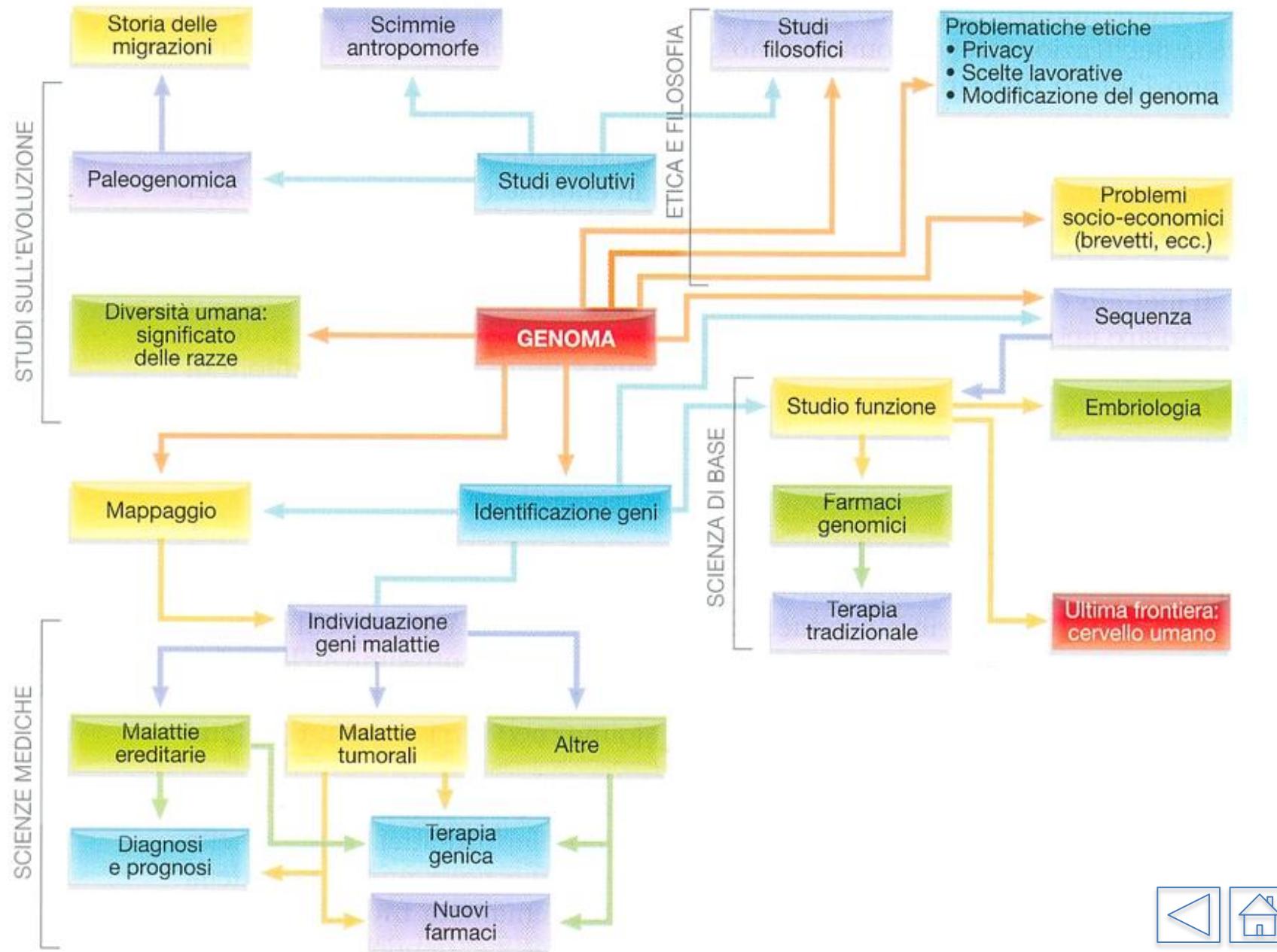
L'idea di fondo del Progetto è l'acquisizione di conoscenze che permetteranno di comprendere i **meccanismi della genetica umana** e **l'implicazione dei geni nello sviluppo delle malattie umane**.

Sequenziato il genoma, il prossimo obiettivo è quello di **associare ad ogni sequenza genica una funzione**.

Questo permetterà di identificare la predisposizione a sviluppare una malattia su base genetica in epoca prenatale o nell'adulto, in fase asintomatica, permettendo di prevenirne o ritardarne l'insorgenza. Inoltre potranno essere compresa la natura genetica dei fenomeni biologici nell'uomo, in particolare quelli patologici.

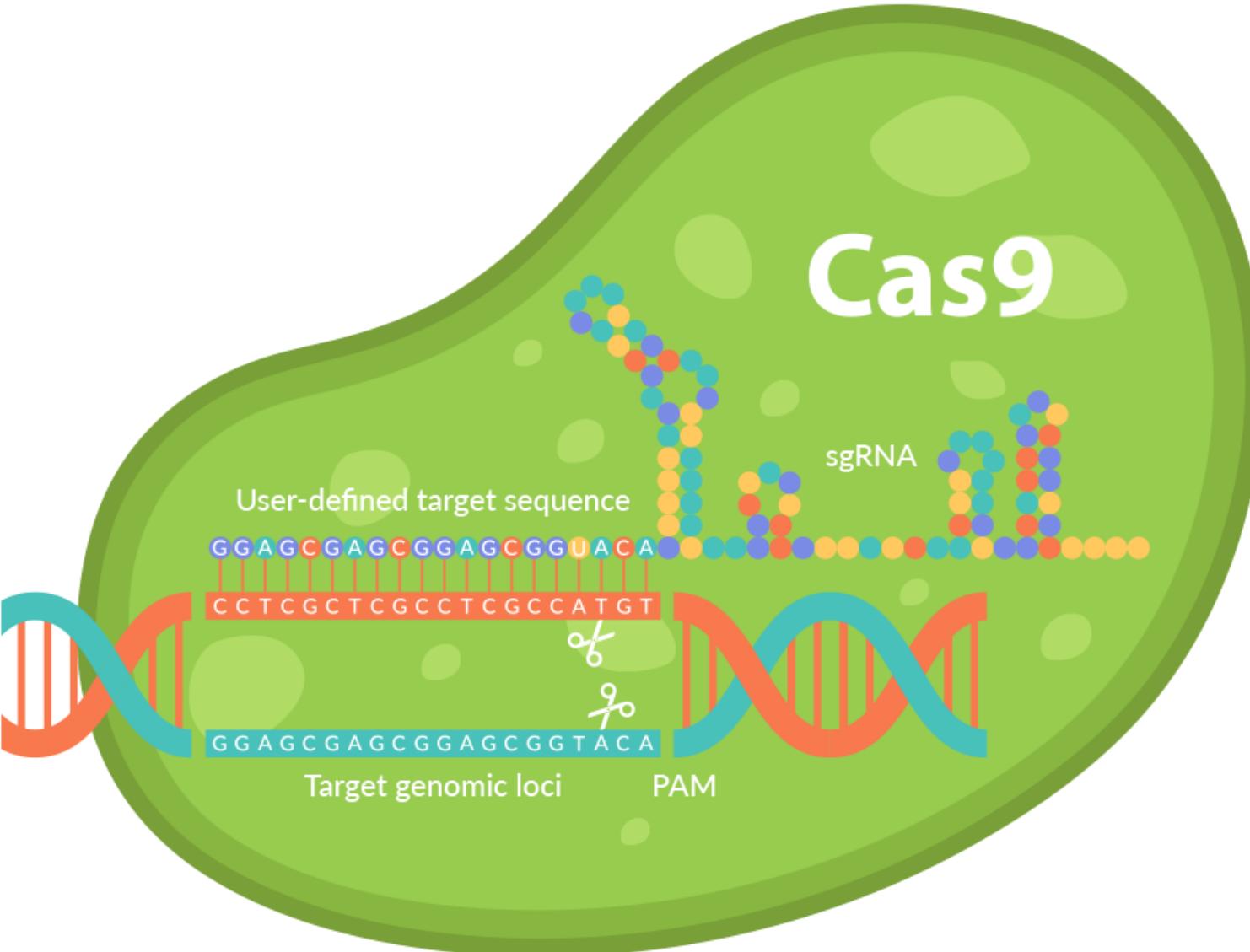
Queste possibilità cambierebbero il modo di vedere la medicina, che dal trattamento per la cura di malattie conclamate passerebbe alla **prevenzione** su base genetica individuale.

Ricadute del progetto genoma umano sulle diverse aree della scienza



CRISPR: il chirurgo del genoma

*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
(brevi ripetizioni palindrome raggruppate e separate a intervalli regolari)*





CRISPR

Le sequenze CRISPR sono state osservate nel genoma di diversi batteri, di cui costituiscono **una sorta di sistema immunitario adattativo**.

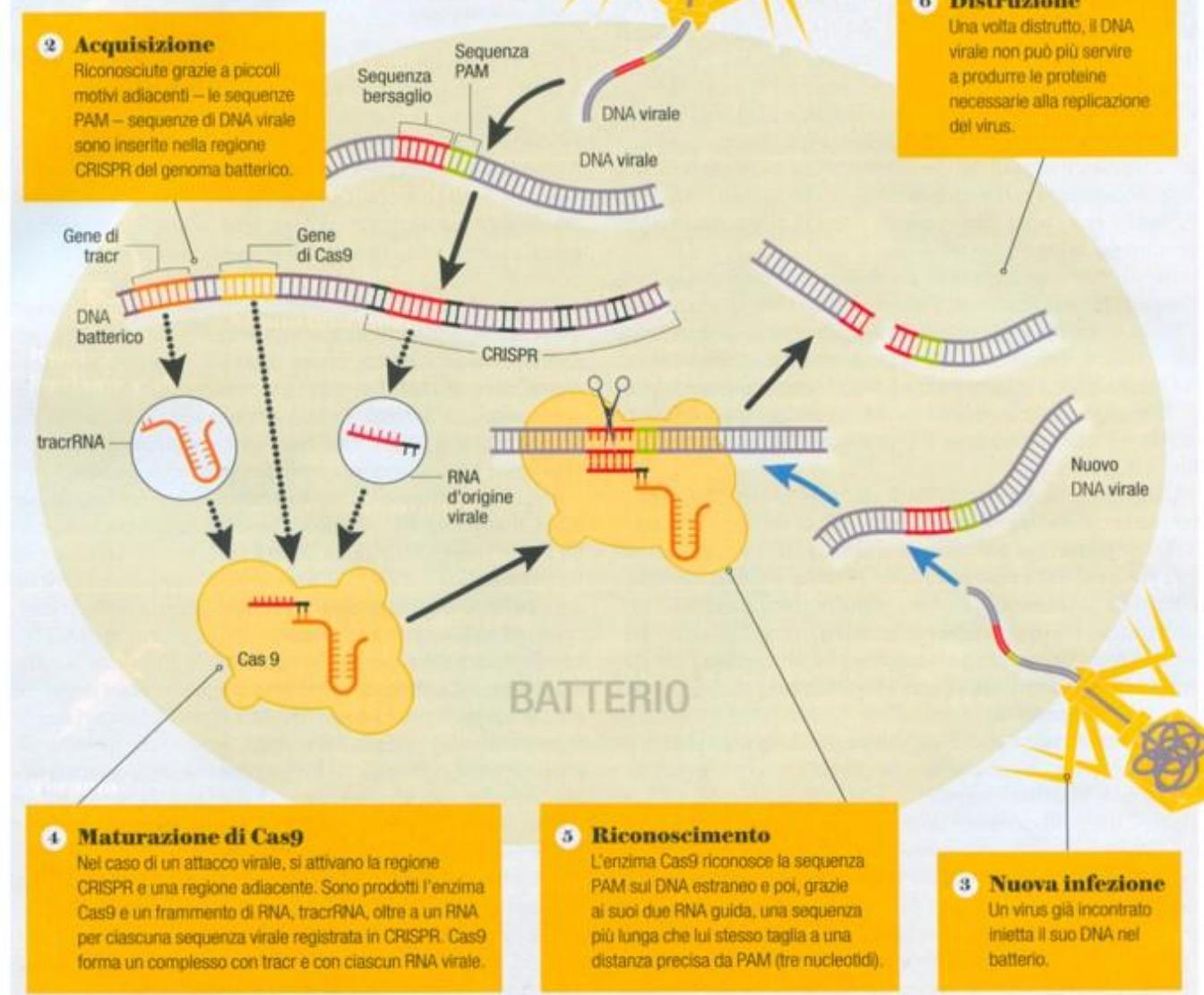
Se il batterio viene infettato da un virus, può **integrare alcune regioni del genoma virale** nel proprio DNA. Si forma così un **archivio di sequenze CRISPR** utile per combattere infezioni future.

In caso di altre infezioni da parte dello stesso virus, le sequenze CRISPR sono **trascritte in corti RNA guida** (con sequenza complementare al genoma virale), ai quali si abbina l'**enzima Cas9** (CRISPR - associated system).

Appaiandosi alla sequenza complementare sul DNA virale, **l'RNA guida Cas9 sul bersaglio e il DNA virale viene digerito**.

Come il sistema CRISPR-Cas9 protegge il batterio

Grazie al sistema CRISPR-Cas9, numerosi batteri riconoscono un virus che li ha già infettati e ne contrastano l'attacco. Simile a una biblioteca, CRISPR è una regione del genoma batterico dove, durante un attacco virale, il batterio accumula sequenze di DNA del virus stesso. Nel caso di un attacco successivo, l'enzima Cas9, guidato da due RNA, riconoscerà il nuovo DNA virale introdotto e lo disattiverà, tagliandolo.



Le applicazioni di CRISPR – Cas9

Questo sistema può essere sfruttato per creare **librerie di RNA-guida** in grado di appaiarsi virtualmente a qualsiasi sequenza genica.

Si costruisce un RNA - guida fondendo un RNA di origine batterica (*tracrRNA*) e un RNA complementare alla sequenza che si vuole modificare.

Una volta espresso nella cellula, l'RNA guida si accoppia a Cas9 e lo guida sulla sequenza bersaglio.

Questo sistema è perfettamente funzionante anche negli eucarioti.



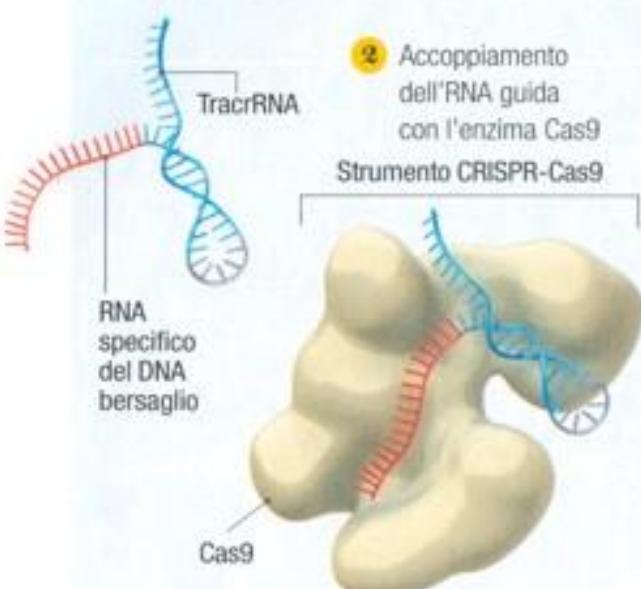
Jennifer Doudna ed Emmanuelle Charpentier mentre ritirano il premio Principessa delle Asturie 2015 per la ricerca scientifica e tecnologica

Come funziona lo strumento CRISPR-Cas9

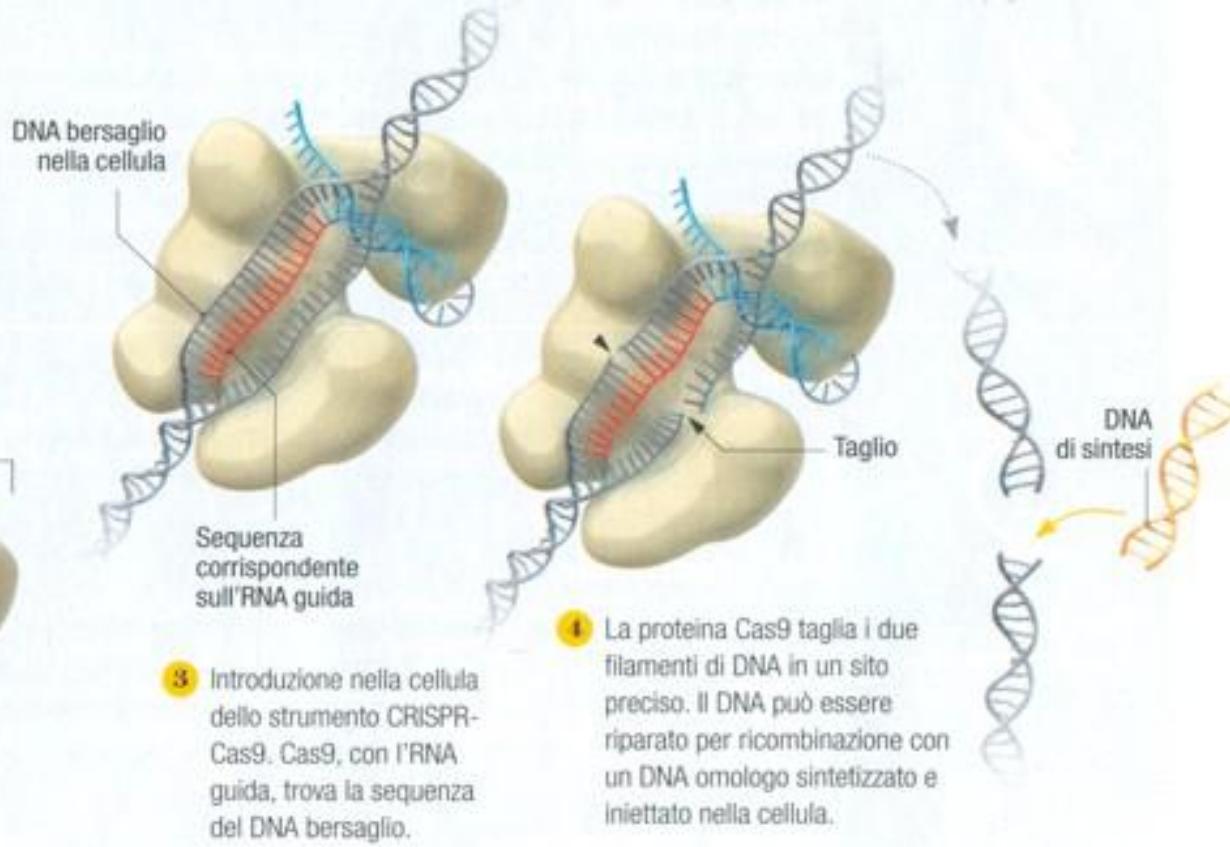
I batteri hanno sviluppato un'arma precisa ed efficace, CRISPR-Cas9, contro le invasioni virali. I biologi l'hanno sfruttata per farne forbici molecolari che tagliano, nelle cellule, il DNA in un sito bersaglio. Contrariamente ai metodi precedenti per modificare il genoma, i quali richiedono enzimi spe-

cifici in ciascuna situazione, lo strumento CRISPR-Cas9 utilizza la stessa proteina, l'enzima Cas9, per ogni situazione. Il solo elemento specifico da costruire è un RNA, che guida l'enzima Cas9 nel punto del genoma da tagliare. E gli RNA sono molto più semplici da sintetizzare degli enzimi.

- Costruzione di un RNA guida per fusione delle sequenze di un RNA batterico (tracrRNA) e di un RNA specifico (complementare) della sequenza del DNA bersaglio.



- Accoppiamento dell'RNA guida con l'enzima Cas9
Strumento CRISPR-Cas9

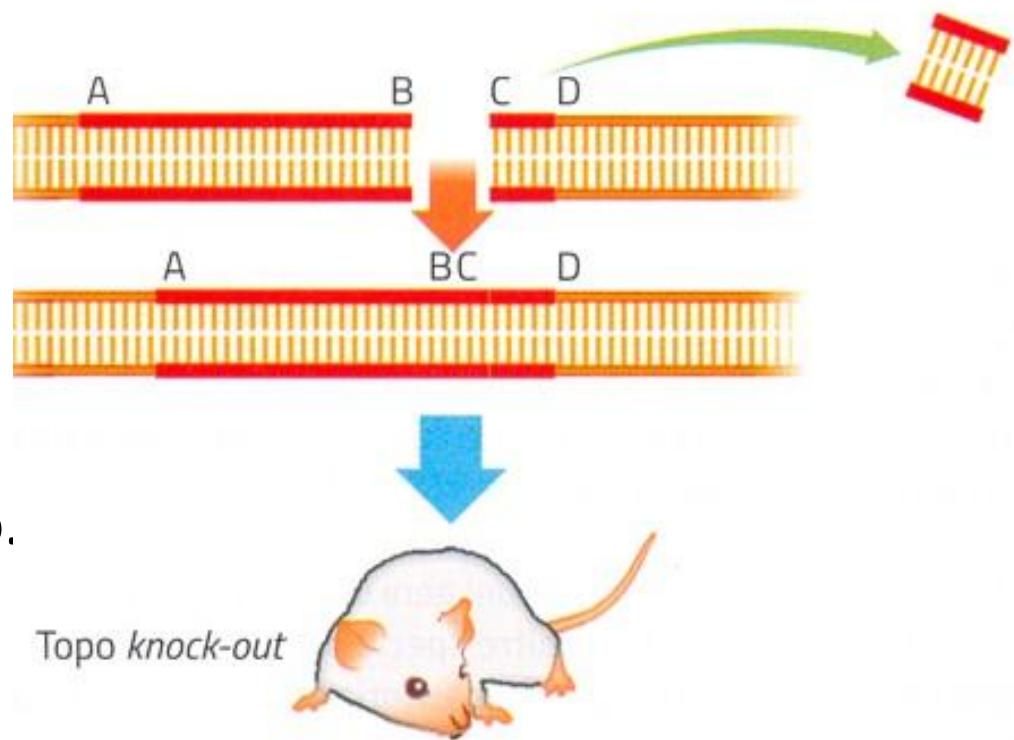


- Introduzione nella cellula dello strumento CRISPR-Cas9. Cas9, con l'RNA guida, trova la sequenza del DNA bersaglio.

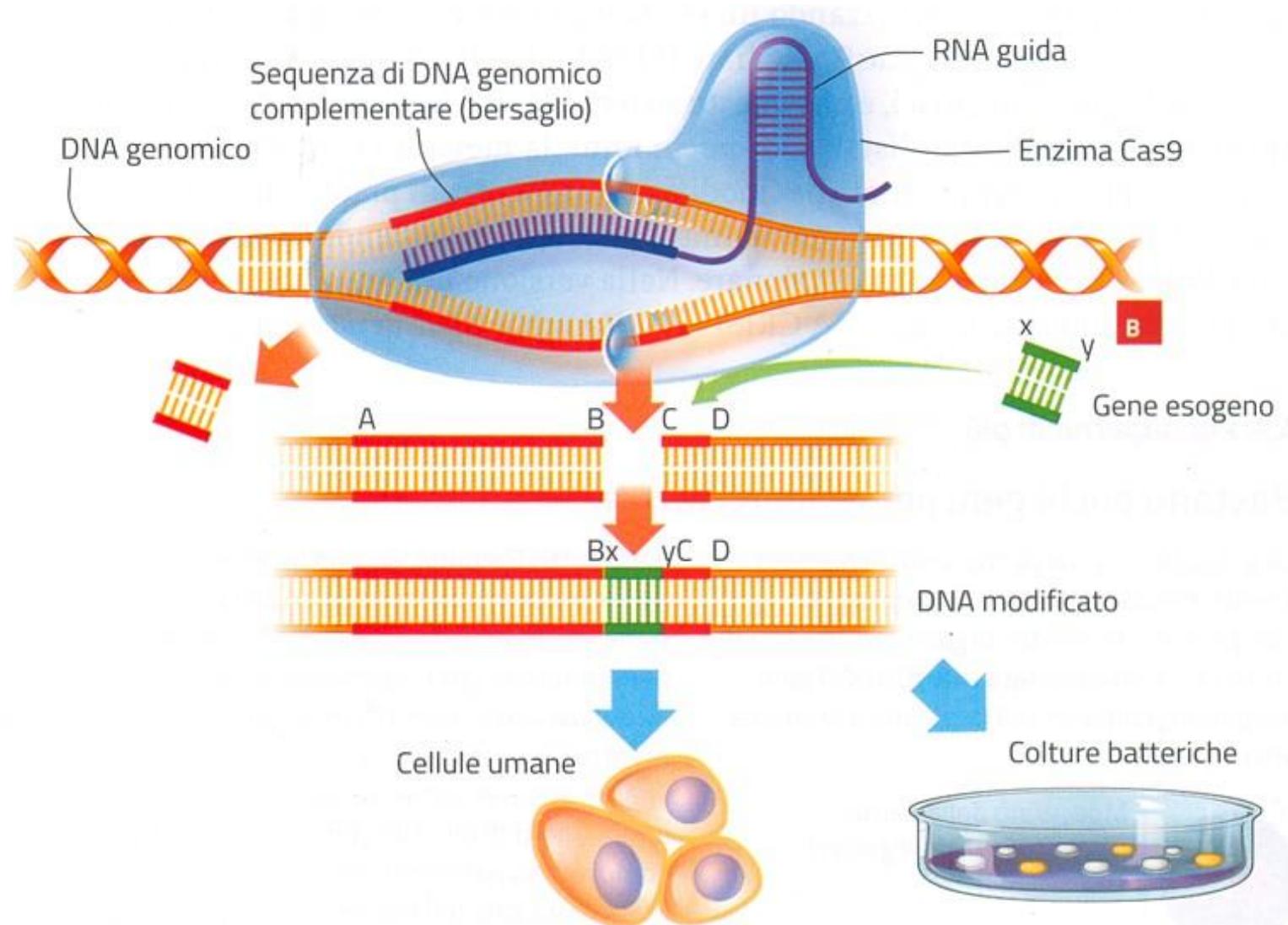
La metodica CRISPR – Cas9 è divenuta la metodica più usata per modificare il genoma di piante e animali.

1. Un RNA - CRISPR guida Cas9 verso una **specifica sequenza** che sarà tagliata. Questo induce meccanismi di **riparazione** che portano a ricongiungere le sequenze tagliate. Questo porta però a mutazioni frame-shift con conseguente inattivazione del gene riarrangiato.

La tecnica è molto utile
per **inattivare**
in modo selettivo un gene,
per studiarne la funzione
o impedirne il funzionamento.



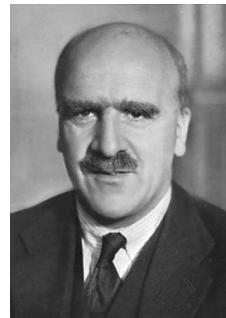
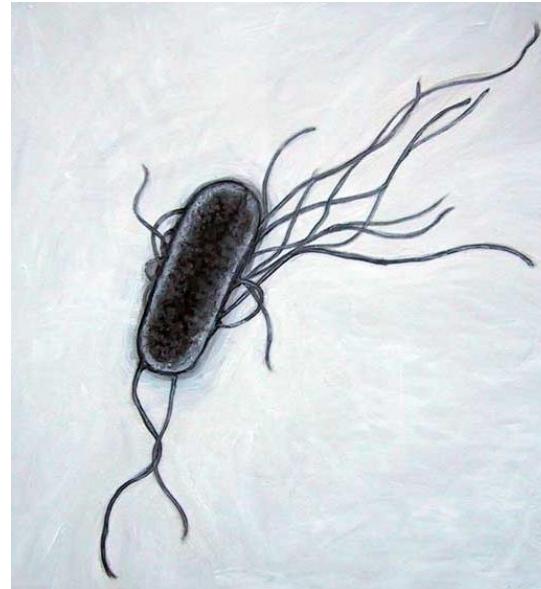
2. Se, oltre all'RNA guida, viene fornito anche un DNA stampo, questo DNA può essere **integrato** a livello del sito di taglio.



L'ingegneria genetica: come ritessere il tessuto della vita

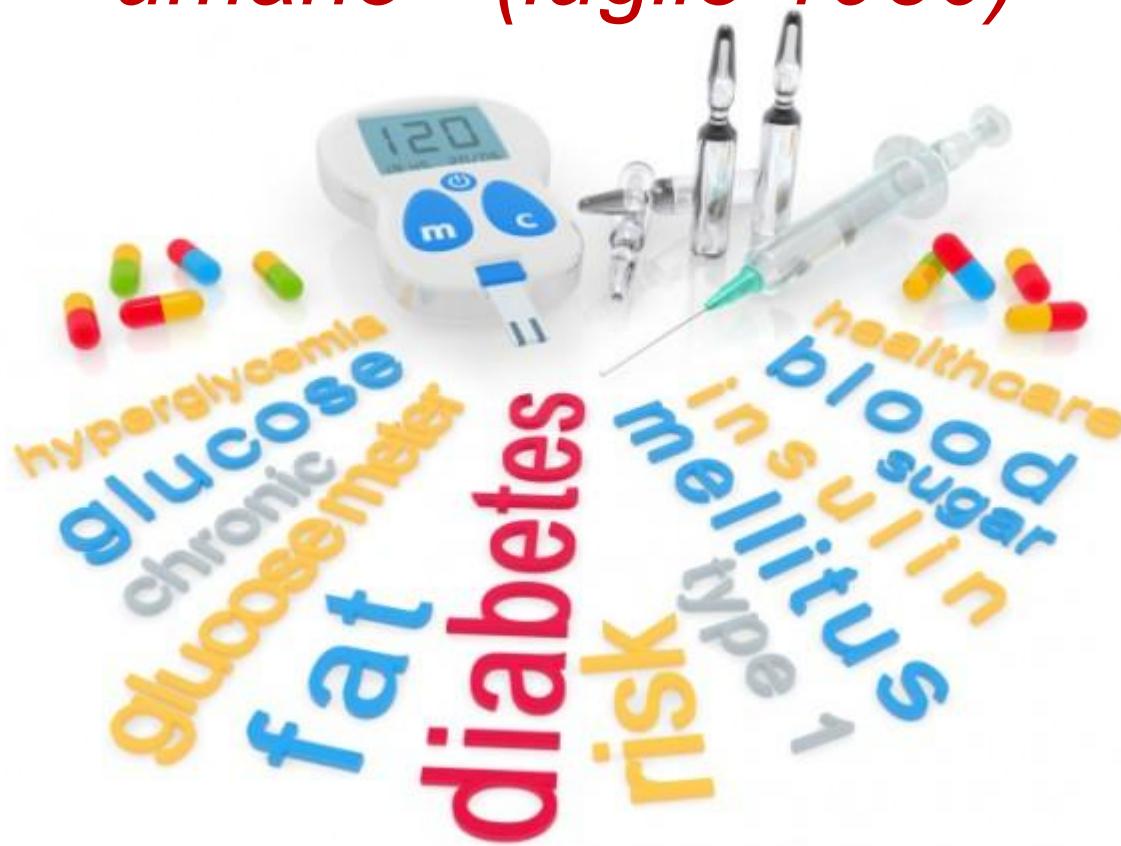
I'INSULINA

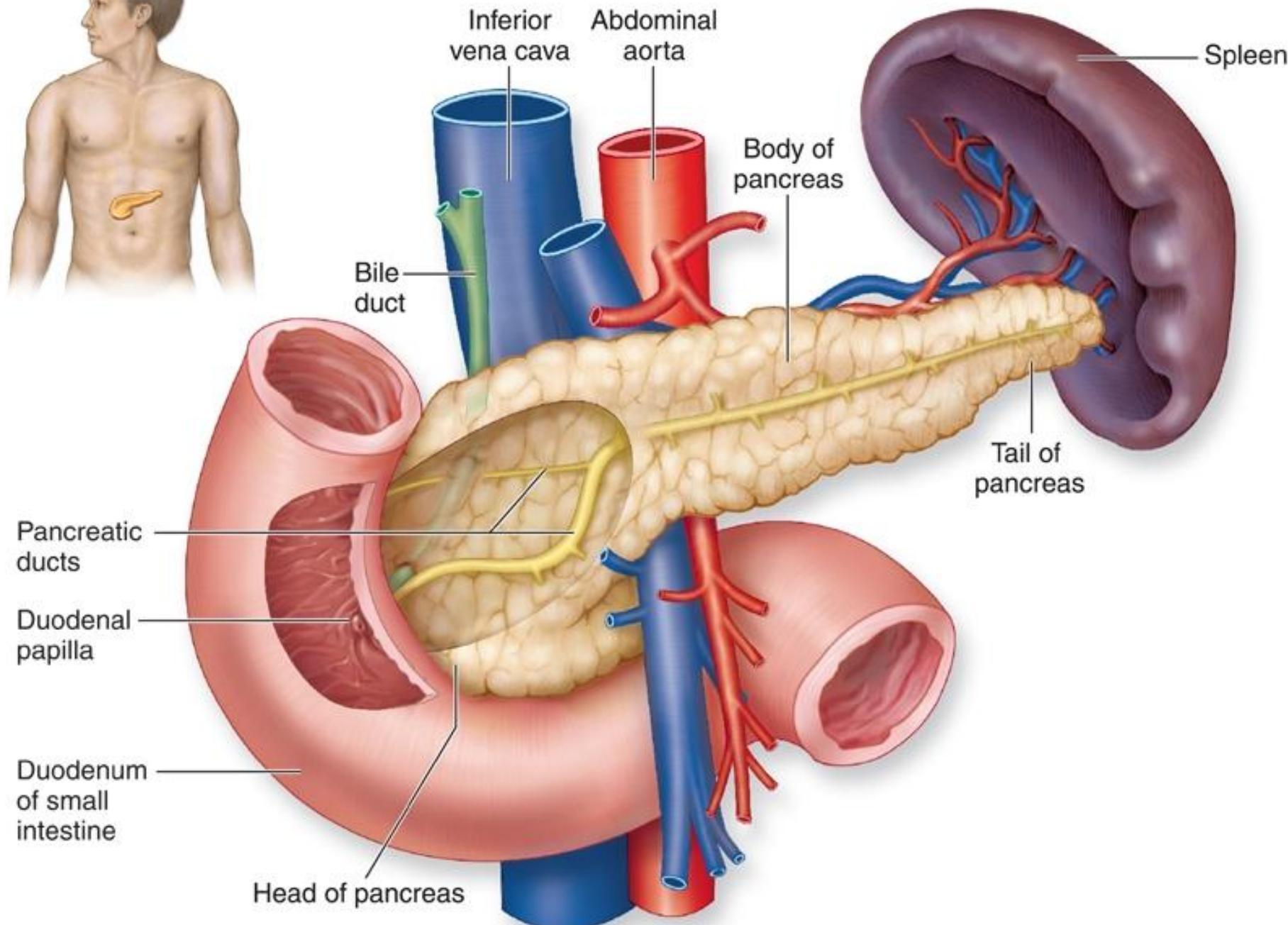
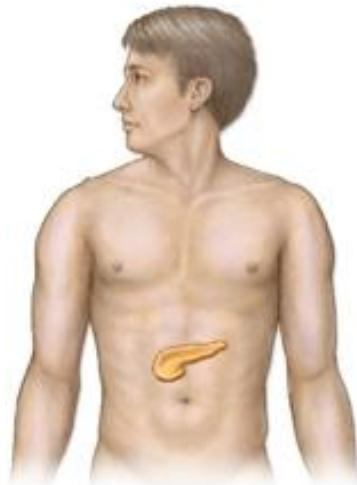
*“Perché darsi la pena
di fabbricare
dei composti chimici
quando una bestiola
può farlo per noi?”*

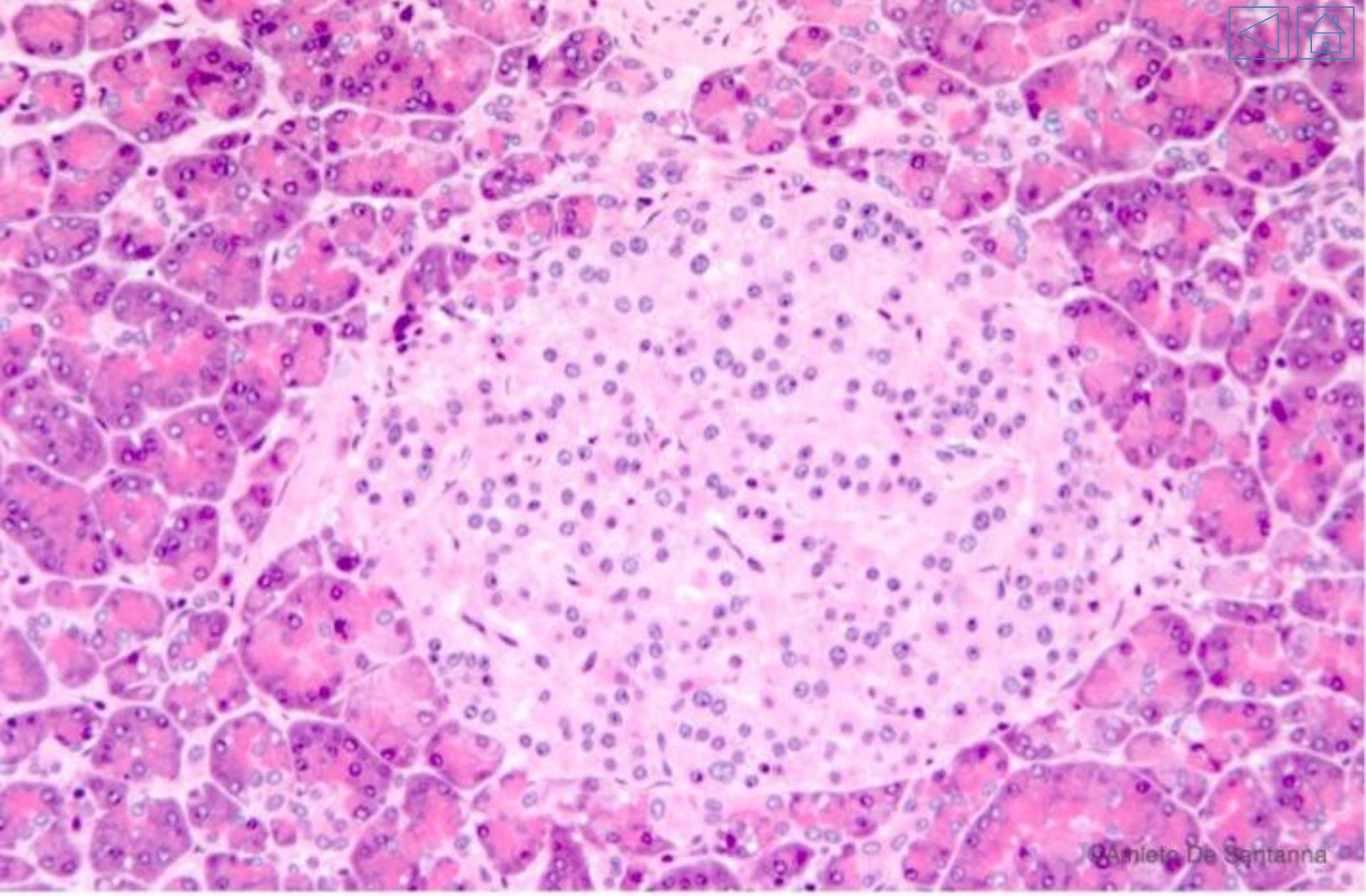


J.B.S. Haldane, 1929

*“sembra che l’insulina umana,
sintetizzata geneticamente, sia non
dannosa ed efficace all’organismo
umano” (luglio 1980)*







Amielo De Santanna

Pancreas umano, isolotto del Langherans. La parte endocrina del pancreas è organizzata in cordoni epiteliali solidi raccolti a gomito a formare un isolotto ad attività endocrina immerso in tessuto esocrino formato da acini pancreatici. Em-Eo 100x

Nel luglio del 1980, diciassette pazienti volontari hanno ricevuto iniezioni di insulina al Guy's Hospital di Londra:

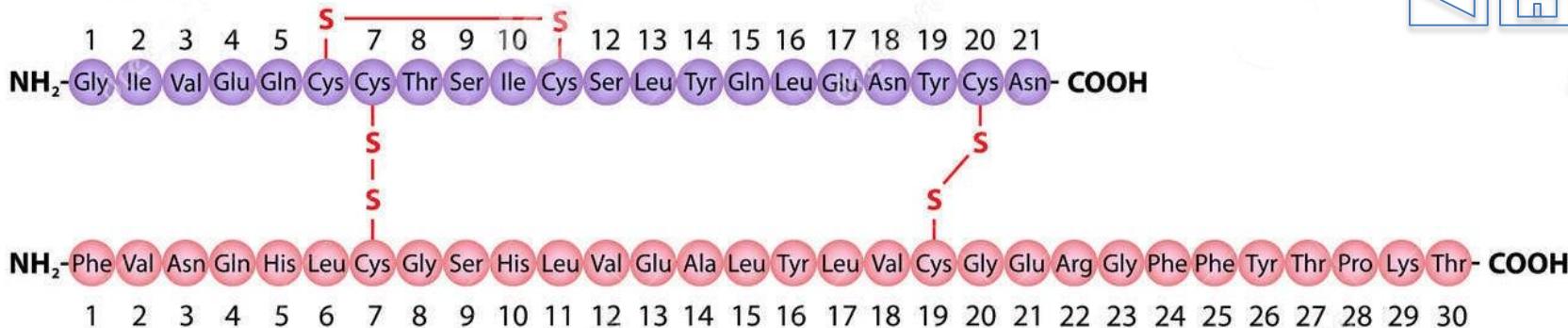
sono stati i primi esseri umani ad essere trattati con una **farmaco sintetizzato dall'ingegneria genetica**.

Solo due anni dopo l'insulina prodotta dai batteri divenne la prima sostanza chimica generata da batteri e autorizzata all'uso regolare da parte di pazienti umani.

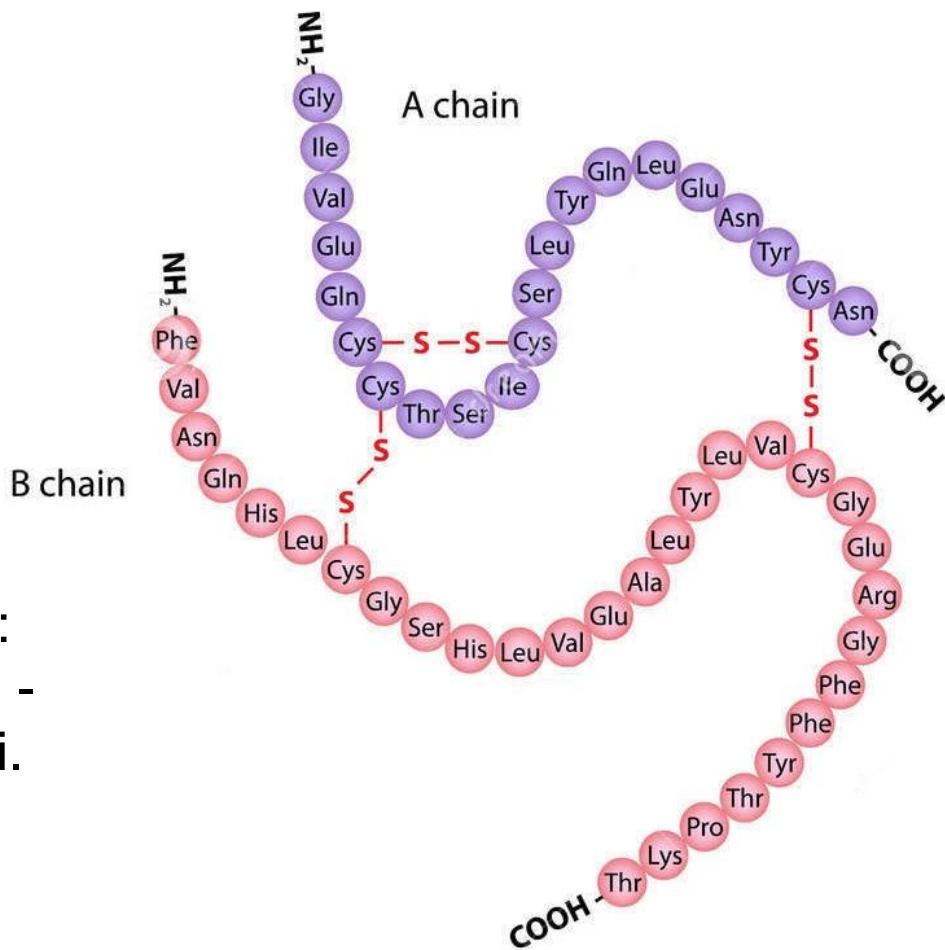




A chain

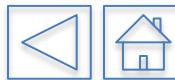


B chain



Insulina

è formata da due catene
unite da due ponti solfuro:
catena A di 21 aminoacidi -
catena B di 30 aminoacidi.



L'insulina agisce, direttamente o indirettamente, su gran parte dei tessuti corporei, ad eccezione dell'encefalo. Alcuni dei suoi effetti:

- **aumenta la captazione del glucosio nelle cellule** stimolandone la diffusione facilitata: aumentano così le reazioni a cui il glucosio prende parte, quali la glicolisi, la sintesi di grasso e di glicogeno;
- **aumenta la sintesi di glicogeno**, stimolando l'attività dell'enzima che ne catalizza la formazione;
- **aumenta la sintesi di acidi grassi e la formazione di trigliceridi**, in quanto stimola le cellule del tessuto adiposo ad assumere i lipidi presenti nel sangue e inibisce l'attività dell'enzima che catalizza la demolizione dei trigliceridi;
- **promuove il trasporto attivo di aminoacidi nelle cellule**, soprattutto muscolari: aumenta così la sintesi proteica e riduce la proteolisi;
- **stimola gli enzimi coinvolti nell'utilizzo del glucosio** ed inibisce quelli coinvolti nella sua sintesi (diminuzione della gluconeogenesi);

PRIMA (1921-1980)..... l'insulina si purificava dal pancreas di suini e bovini

Insulina umana e animale.			
SPECIE	CATENA A		CATENA B
Umana	Thr ⁸	Ile ¹⁰	Thr ³⁰
Suina	Thr ⁸	Ile ¹⁰	Ala ³⁰
Bovina	Ala ⁸	Val ¹⁰	Ala ³⁰



Differisce in **1 sola posizione**:

Thr B30 → Ala B30



Differisce in **3 posizioni**:

- Thr A8 → Ala A8
- Ile A10 → Val A10
- Thr B30 → Ala B30



- Immunogene
- Presenza di contaminanti
- Rischio di trasferimento virus
- Alti costi di estrazione e purificazione → **70 MAIALI PER I PAZIENTI PER I ANNO**

produzione di insulina mediante ingegneria genetica

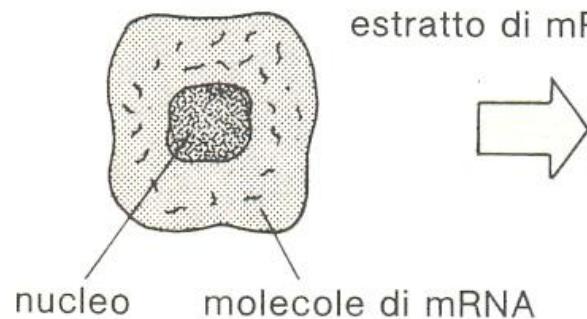
QUATTRO FASI

- 1. ottenere il gene per la sostanza desiderata**
- 2. inserire il gene nel microrganismo**
- 3. indurre il microrganismo a sintetizzare la sostanza estranea che gli viene richiesta**
- 4. raccogliere il prodotto della sintesi**

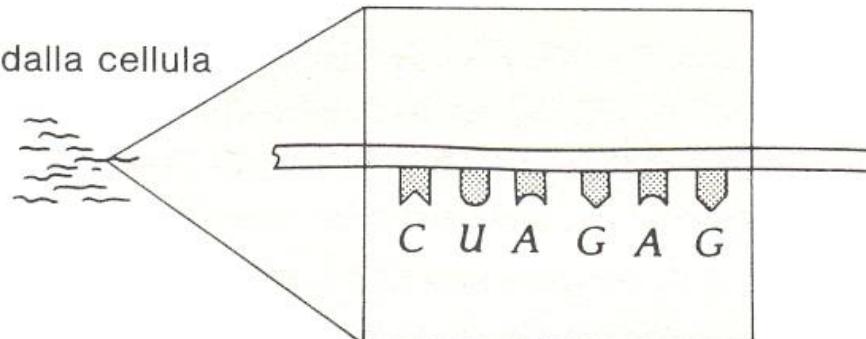


1. ottenere il gene per la sostanza desiderata

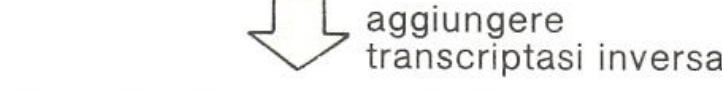
cellula
del pancreas



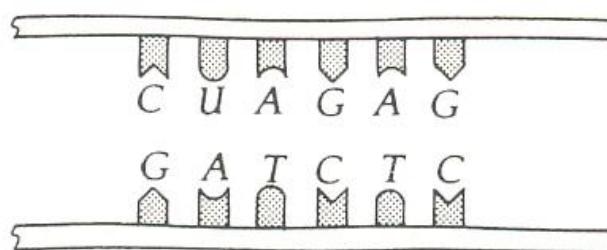
estratto di mRNA dalla cellula



catena di mRNA

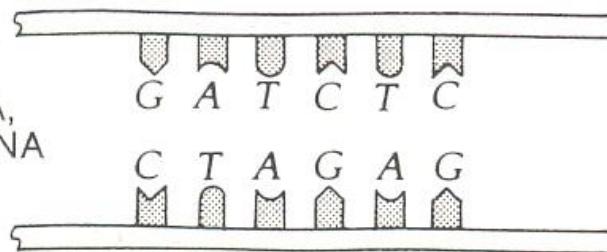


catena di DNA

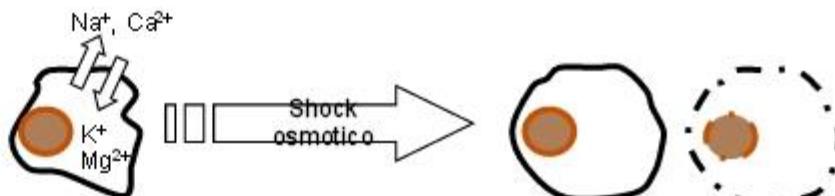


separare la catena di DNA
da quella di mRNA
e aggiungere DNA polimerasi

catena doppia di DNA,
copia di quella di mRNA



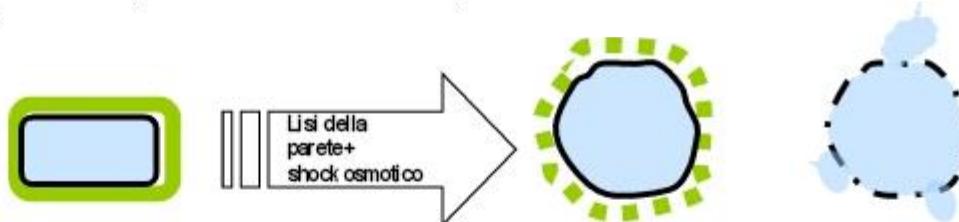
Lisi per osmosi



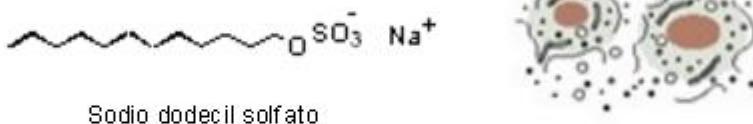
Le cellule animali riescono a mantenere costante la concentrazione intracellulare di soluti scambiando attivamente (consumo di ATP) ioni con l'esterno.

Un abbassamento drastico della pressione osmotica esterna (immersione in acqua distillata) provoca un rigonfiamento delle cellule ed una 'esplosione' delle membrane.

Digestione enzimatica



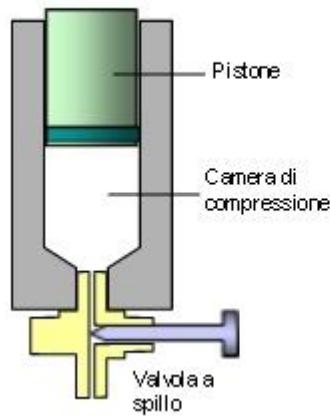
Solubilizzazione chimica



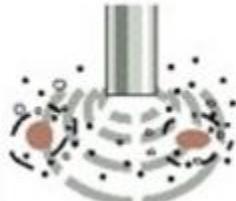
Omogeneizzazione con potter



French press



SONICAZIONE (ultrasuoni)



Estrazione di RNA con metodi tradizionali



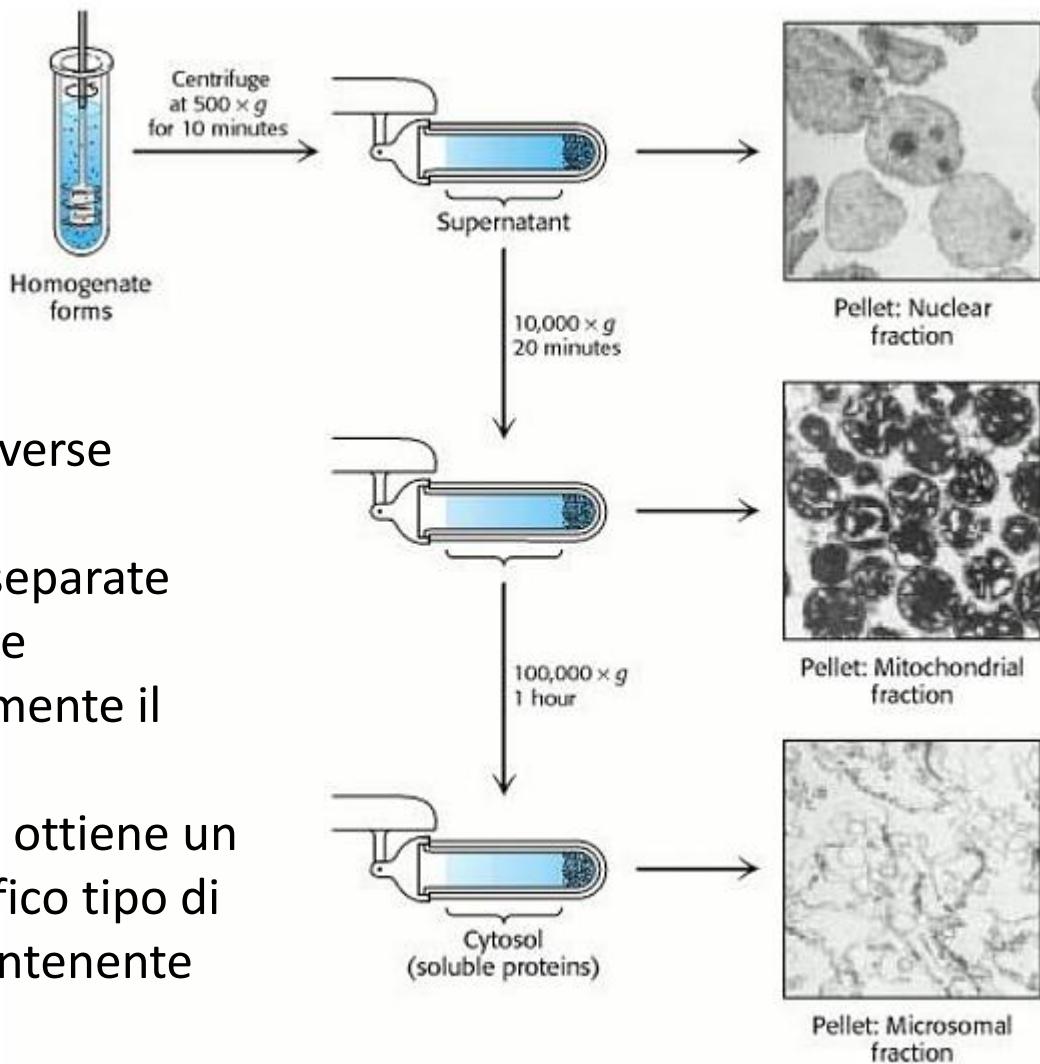
centrifugazione differenziale

sfrutta la differente velocità di sedimentazione di particelle di diverse dimensioni e densità.

Le diverse componenti vengono separate mediante tappe di centrifugazione successive, aumentando gradualmente il campo centrifugo applicato.

In questo modo, ad ogni tappa, si ottiene un sedimento contenente uno specifico tipo di particelle, ed un soprannatante contenente quelle non ancora sedimentate.

In questo modo vengono separate le varie componenti cellulari.

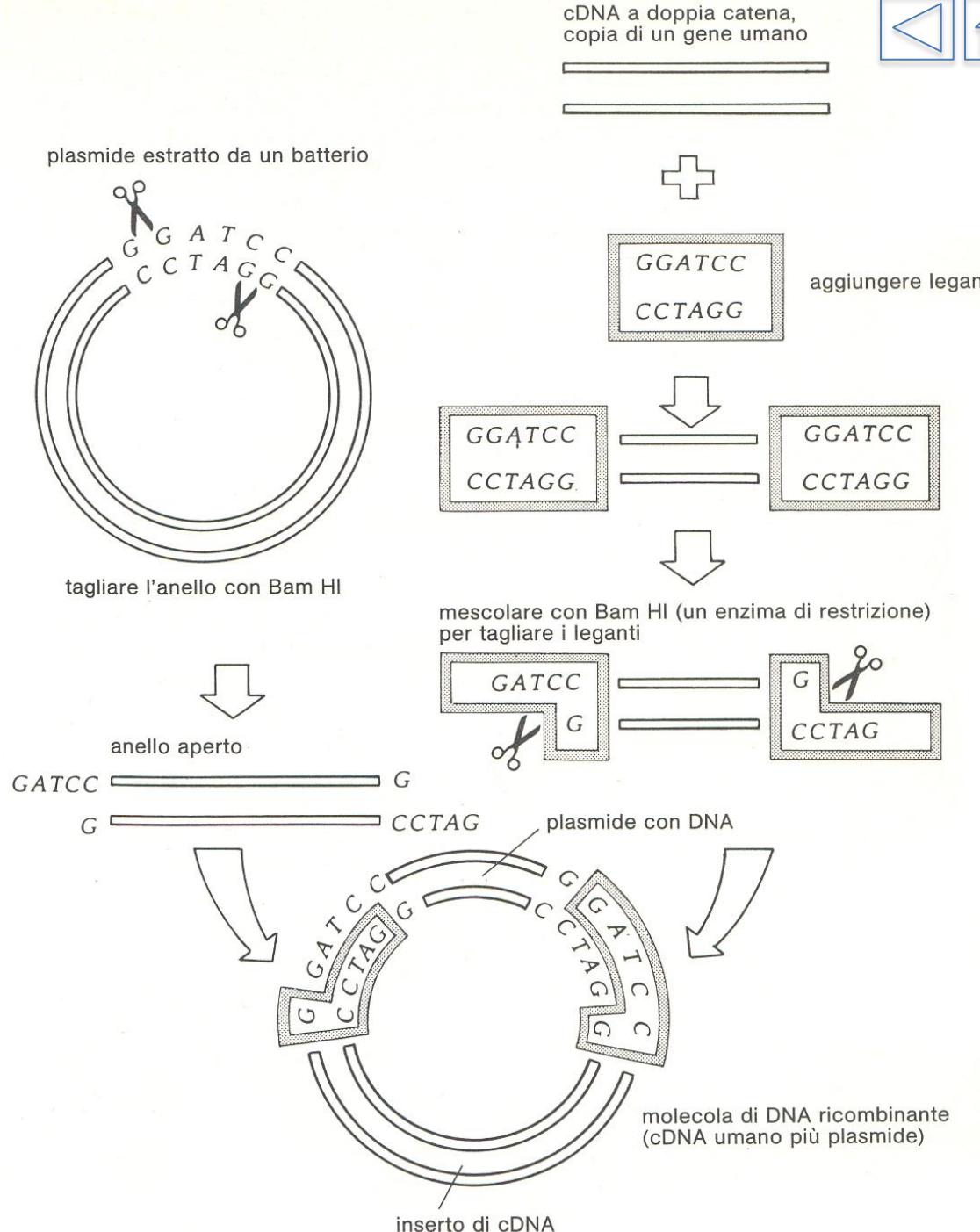


2. inserire il gene nel microrganismo



Bam HI riconosce la sequenza
GGATCC/CCTAGG

Alla molecola di cDNA si aggiungono due serie di basi leganti
GGATCC/CCTAGG



BamHI da *Bacillus amyloliquefaciens* H

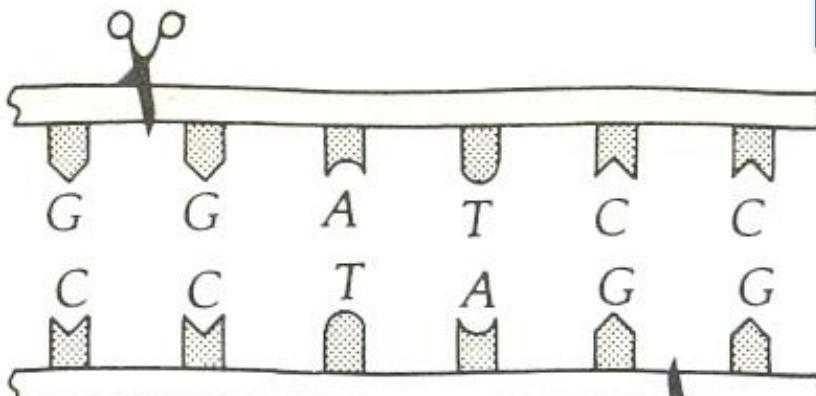


Enzimi di restrizione

Bam HI

Bam HI

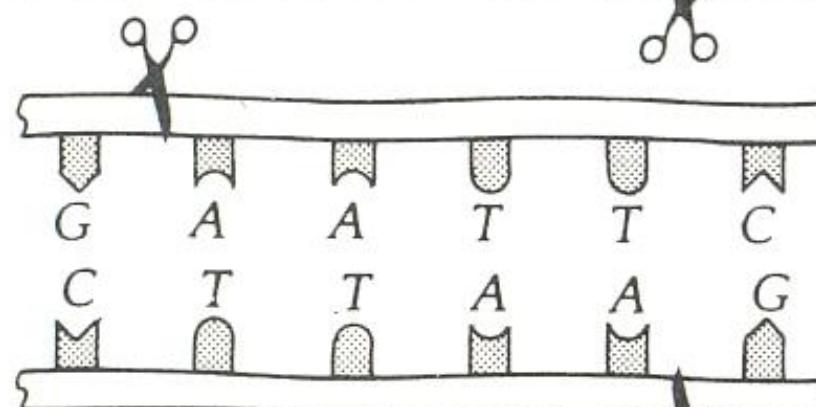
(*Bacillus amyloliquefaciens H*)



EcoRI

Eco RI

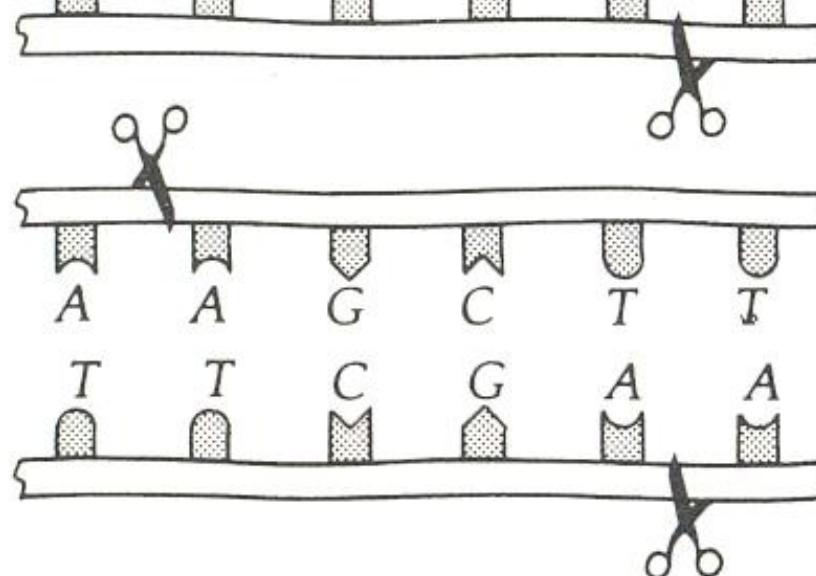
(*E.coli RY13*)



HindIII

Hind III

(*Haemophilus influenza Rd*)



Il “cloning” del gene

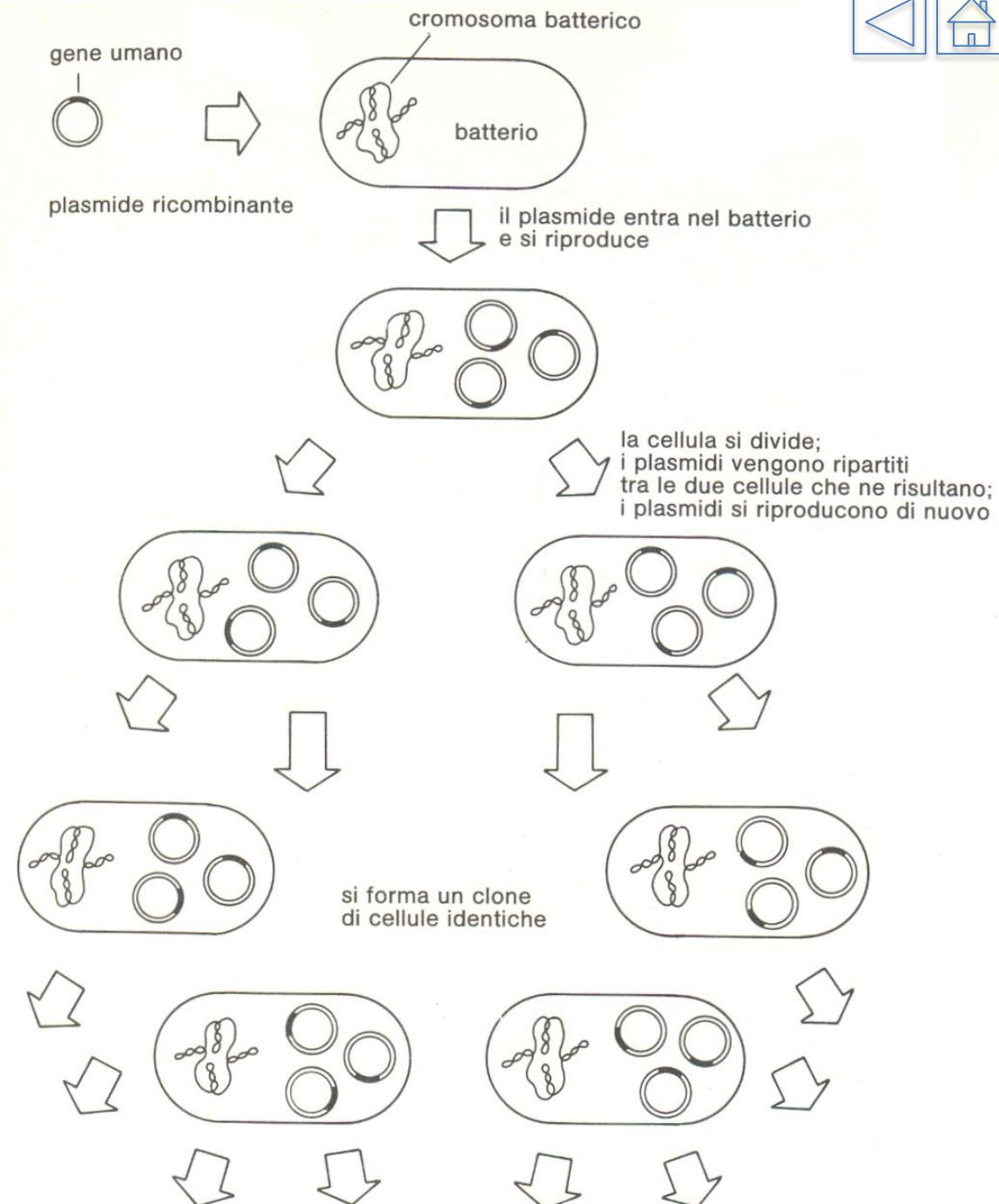
Il DNA ricombinante può essere inserito in un batterio scelto per la produzione della proteina.

La naturale tendenza del plasmide a entrare nell’ospite può essere aumentata mediante varie sostanze.

Il plasmide può duplicarsi e dare molte copie identiche.

Inoltre la cellula ospite si divide anche ogni 20 minuti.

In breve si ottengono **milioni di copie del gene**.

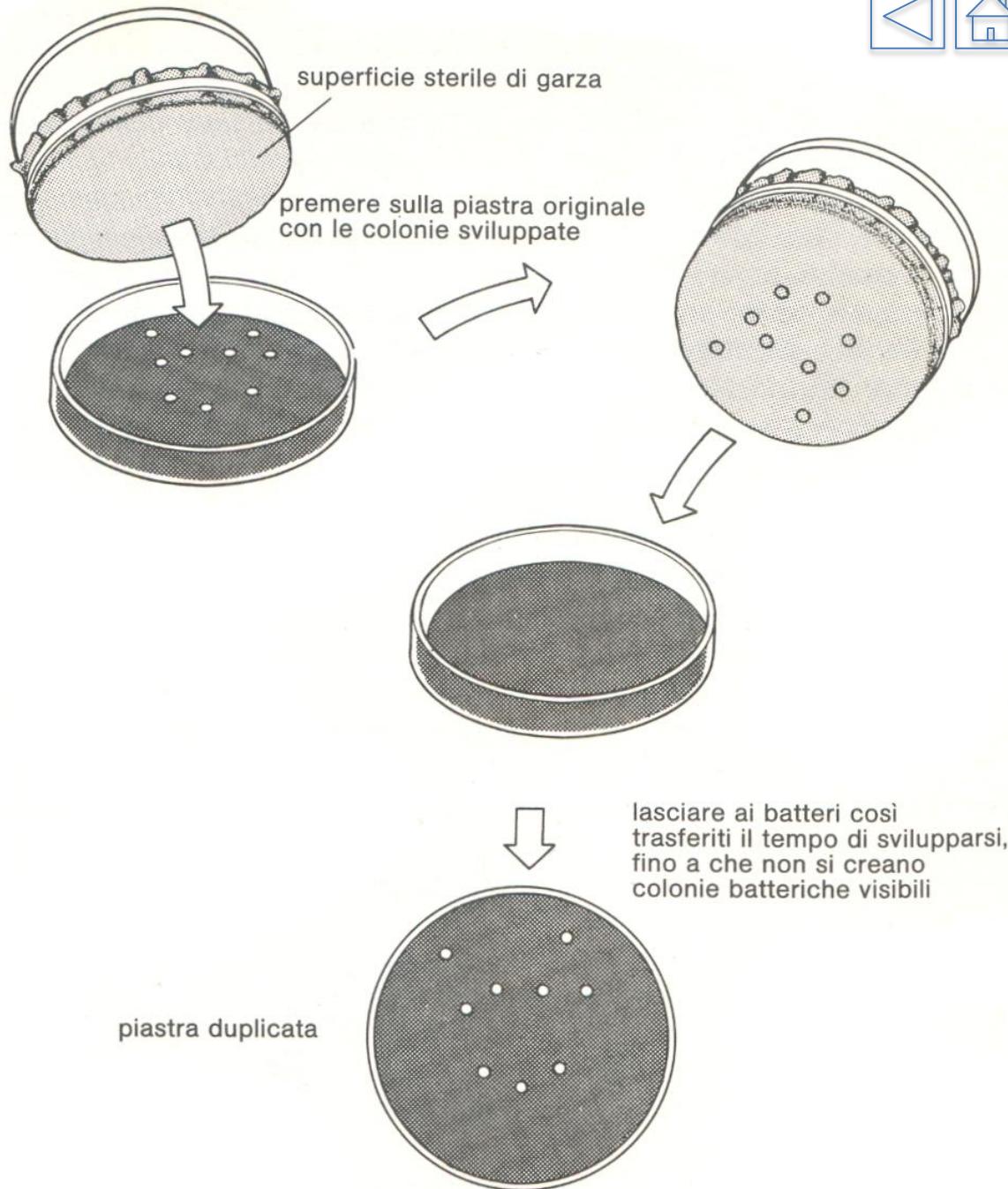


Alla ricerca del batterio giusto: la replica delle capsule di Petri

Nel terreno di coltura sono presenti batteri:

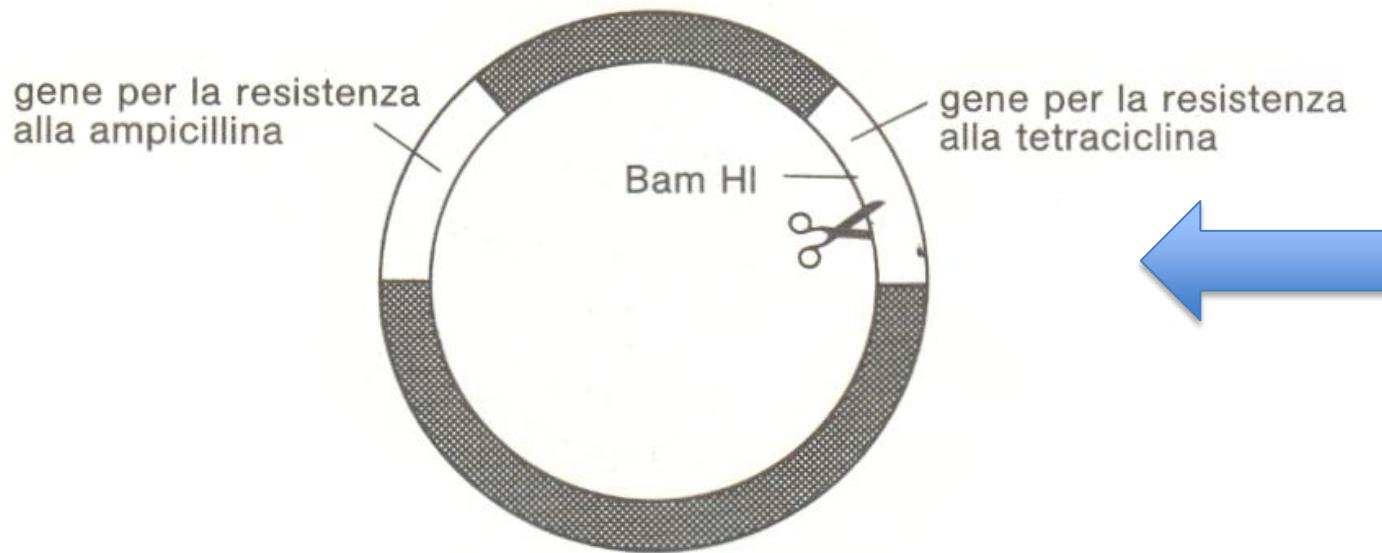
- 1. con plasmide con gene umano**
- 2. con plasmide senza gene umano**
- 3. senza plasmide**

Le repliche permettono di effettuare varie esperienze dopo aver messo al sicuro i batteri di partenza.



Eliminare i batteri che:

- non hanno plasmidi
- hanno plasmidi senza gene umano



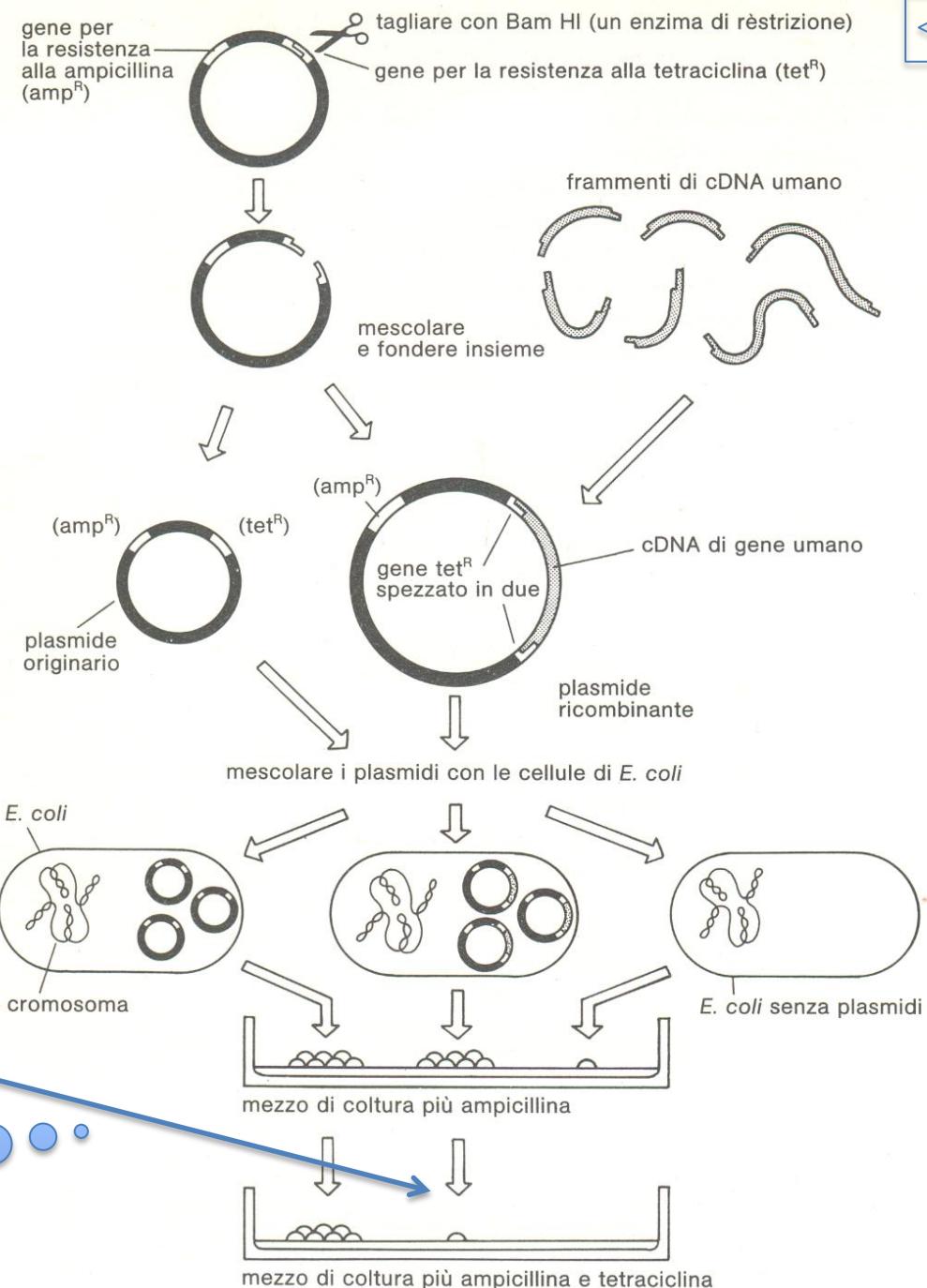
Il plasmide BR322 contiene **geni per la resistenza a ampicillina e tetraciclina**.

- Batteri con plasmidi normali sono immuni ai due antibiotici
- Batteri senza plasmidi sono uccisi dai due antibiotici
- Batteri con plasmidi ricombinanti saranno uccisi dalla tetraciclina

Identificazione di batteri con plasmide ricombinante con gene umano

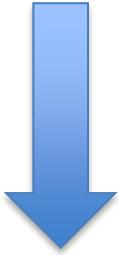


Come isolare i batteri con il plasmide ricombinante con il gene umano dell'insulina?

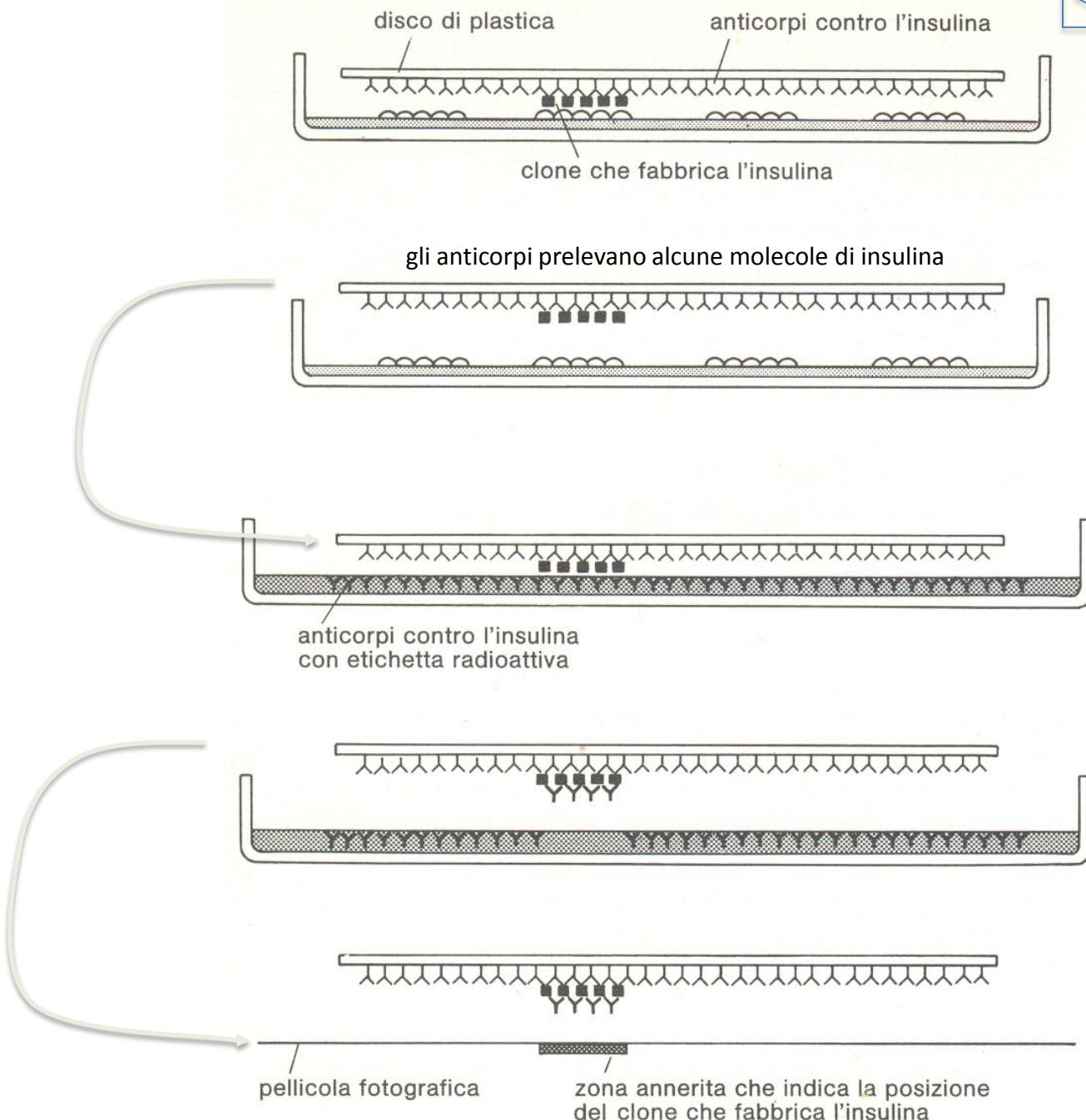


Il gene umano presente è quello dell'insulina?

Utilizzo di anticorpi radioattivi



Anticorpi anti-insulina marcati

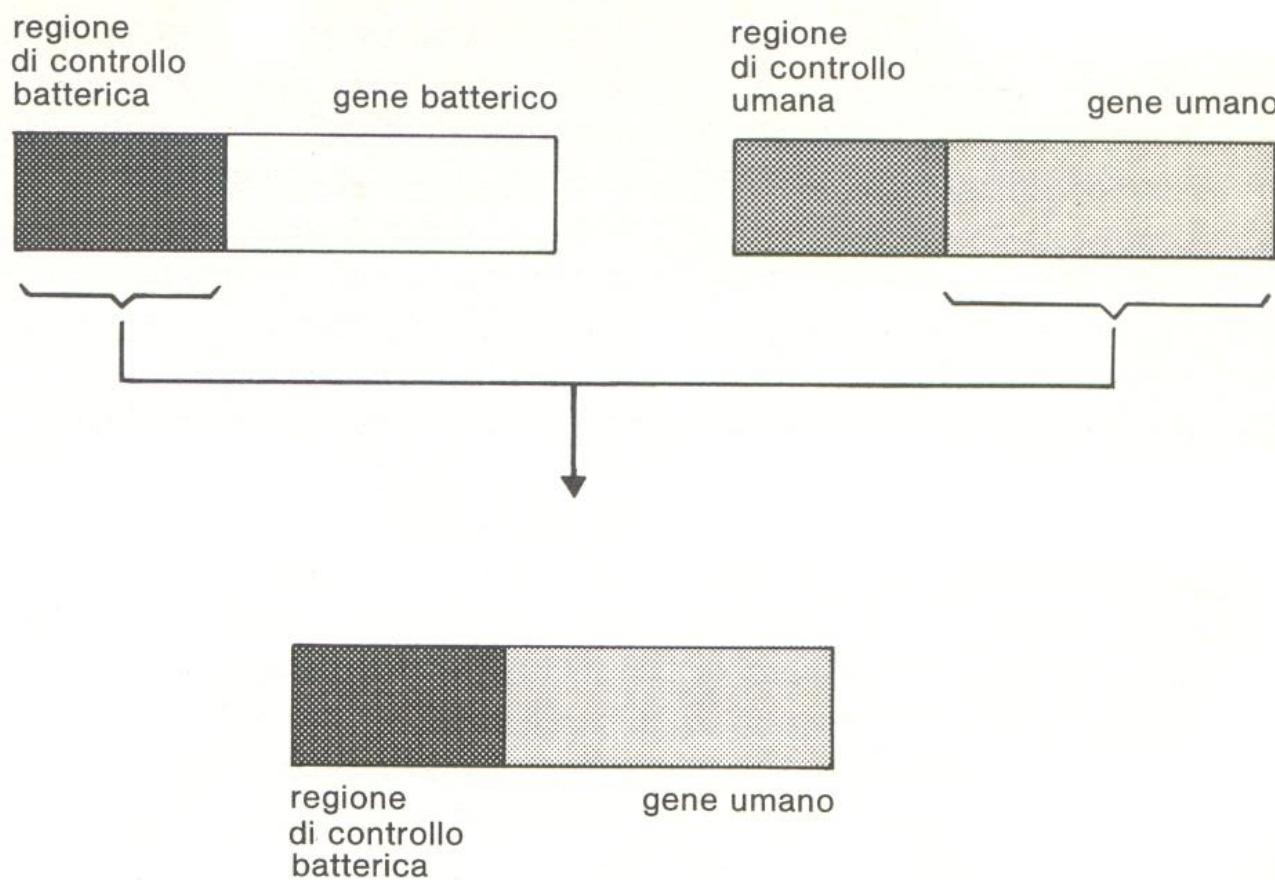


3. indurre il microrganismo a sintetizzare la sostanza estranea



Le **regioni di controllo di un gene umano** non hanno significato per un batterio. Rimane ignorata e il gene resta inespresso.

Vanno inserite quindi nel gene umano **regioni di controllo batterico** prima di inserirlo nel plasmide. Sono gli **enzimi di restrizione** a svolgere questo compito.



4. raccogliere il prodotto della sintesi

Se le proteine sono secrete nel terreno di coltura possono essere rimosse dal materiale insolubile per semplice centrifugazione.

Le proteine intracellulari possono essere recuperate dopo rottura delle cellule.

Le proteine sono **purificate con procedure di frazionamento** con eliminazione selettiva di tutti gli altri componenti della miscela alla fine resta soltanto la sostanza di interesse

Le caratteristiche delle proteine utilizzate

nelle varie tappe di purificazione :

solubilità (precipitazione frazionata)

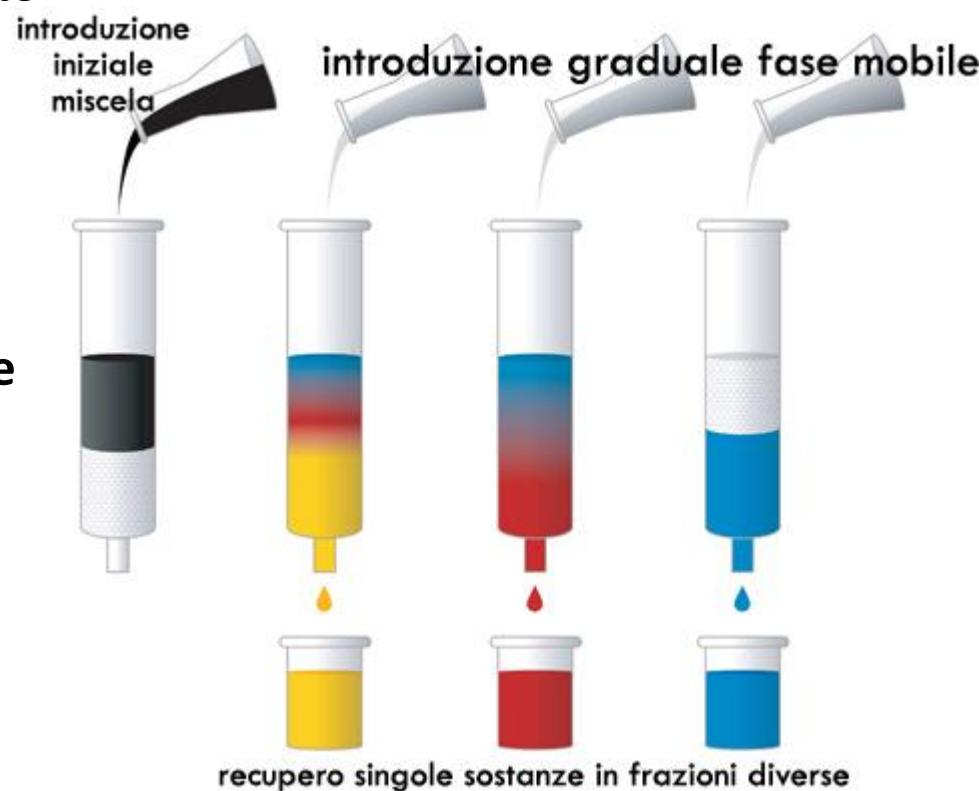
carica ionica (elettroforesi)

dimensioni molecolari

(dialisi, cromatografia)

specificità di legame con altre molecole

(cromatografia per affinità)



Clonaggio del DNA



Clonaggio del DNA

Viene generata una **molecola di DNA ricombinante**, cioè una sequenza di DNA (generata da un enzima di restrizione) introdotta in un **vettore** (una unità di DNA capace di replicarsi)

Questa molecola di DNA ricombinante viene introdotta in un **sistema cellulare appropriato** (in genere batteri derivati dall'Escherichia coli)

Tutti i discendenti di questa singola cellula, detta clone, conterranno la medesima molecola di DNA ricombinante, permettendone produzioni praticamente illimitate oppure grandi quantità della **proteina** prodotta dalla sequenza genica presa in considerazione

A COSA SERVE il CLONAGGIO del DNA??

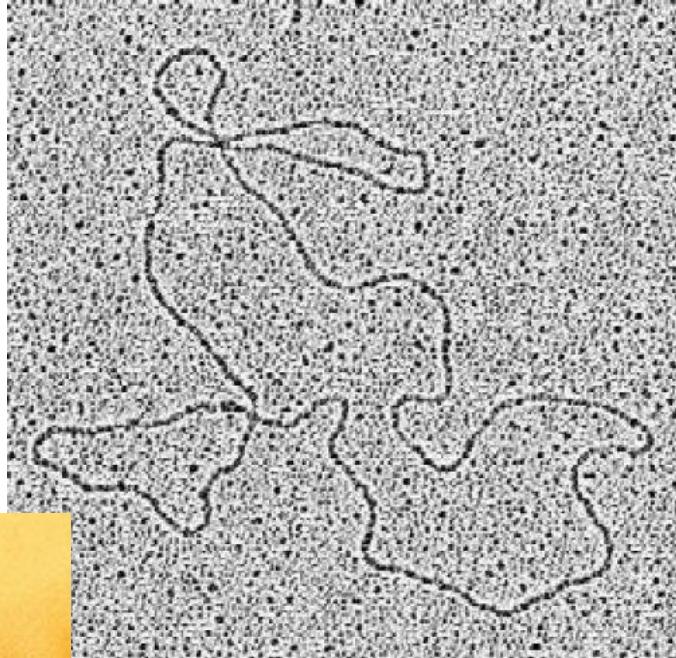
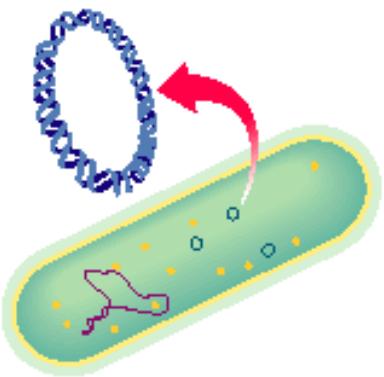
→ a creare '**copie identiche**' (= **CLONI**) di un
frammento di DNA

DIFFERENZE con la PCR:

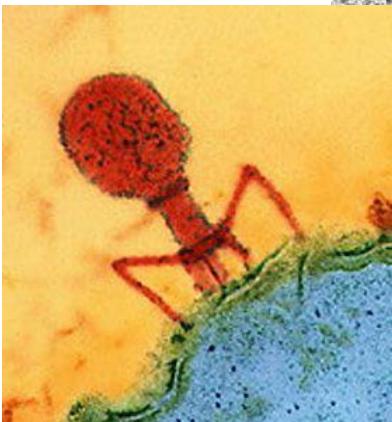
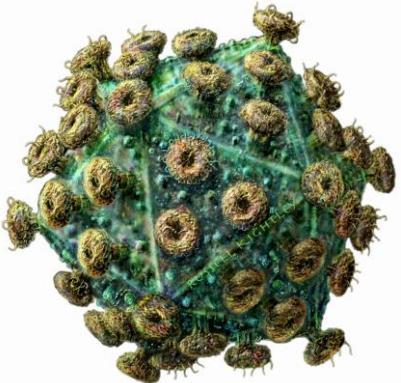
- è una **reazione *in vivo***
 - sfrutta l'apparato di replicazione del DNA delle cellule batteriche
 - si fanno duplicare le cellule
- non necessita **nessuna conoscenza a priori della sequenza** del frammento di DNA da clonare
 - non si usano primers
- è un **processo più accurato**
 - le copie di DNA ottenute sono esattamente identiche l'una all'altra
 - sistemi di 'correzione degli errori' cellulari

Vettori di clonaggio

Plasmidi

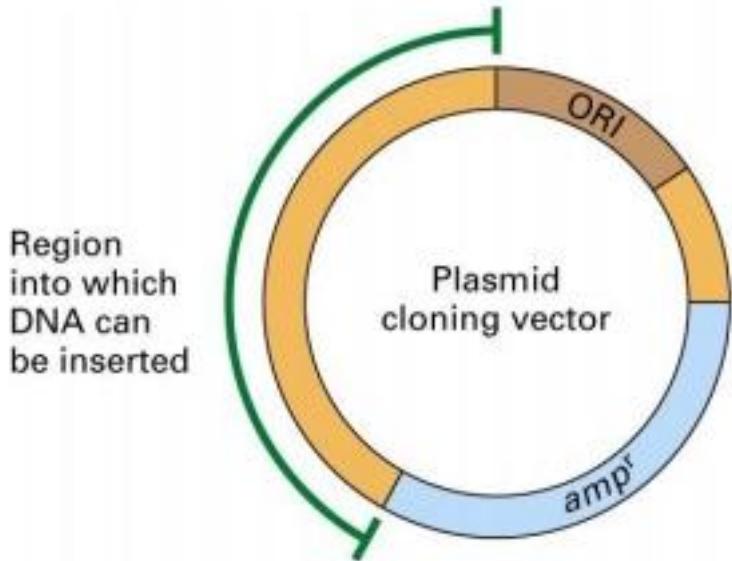


Virus



Cromosomi artificiali

- (*BAC – Bacteria Artificial Chromosome*
- *YAC – Yeast Artificial Chromosome*)



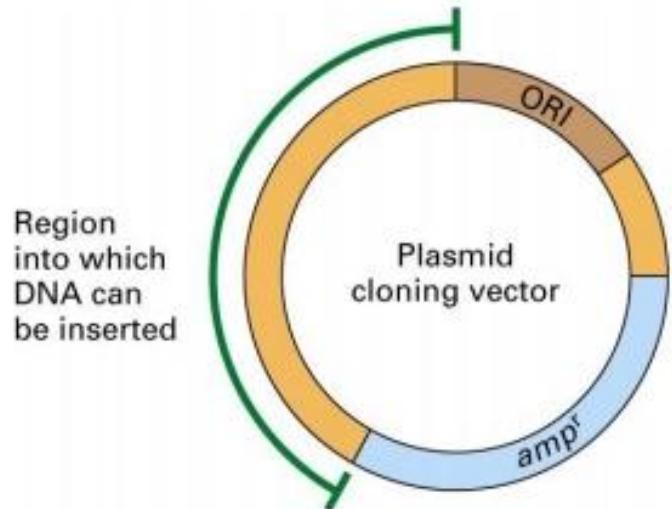
PLASMIDI

Sono i **vettori più comuni**:

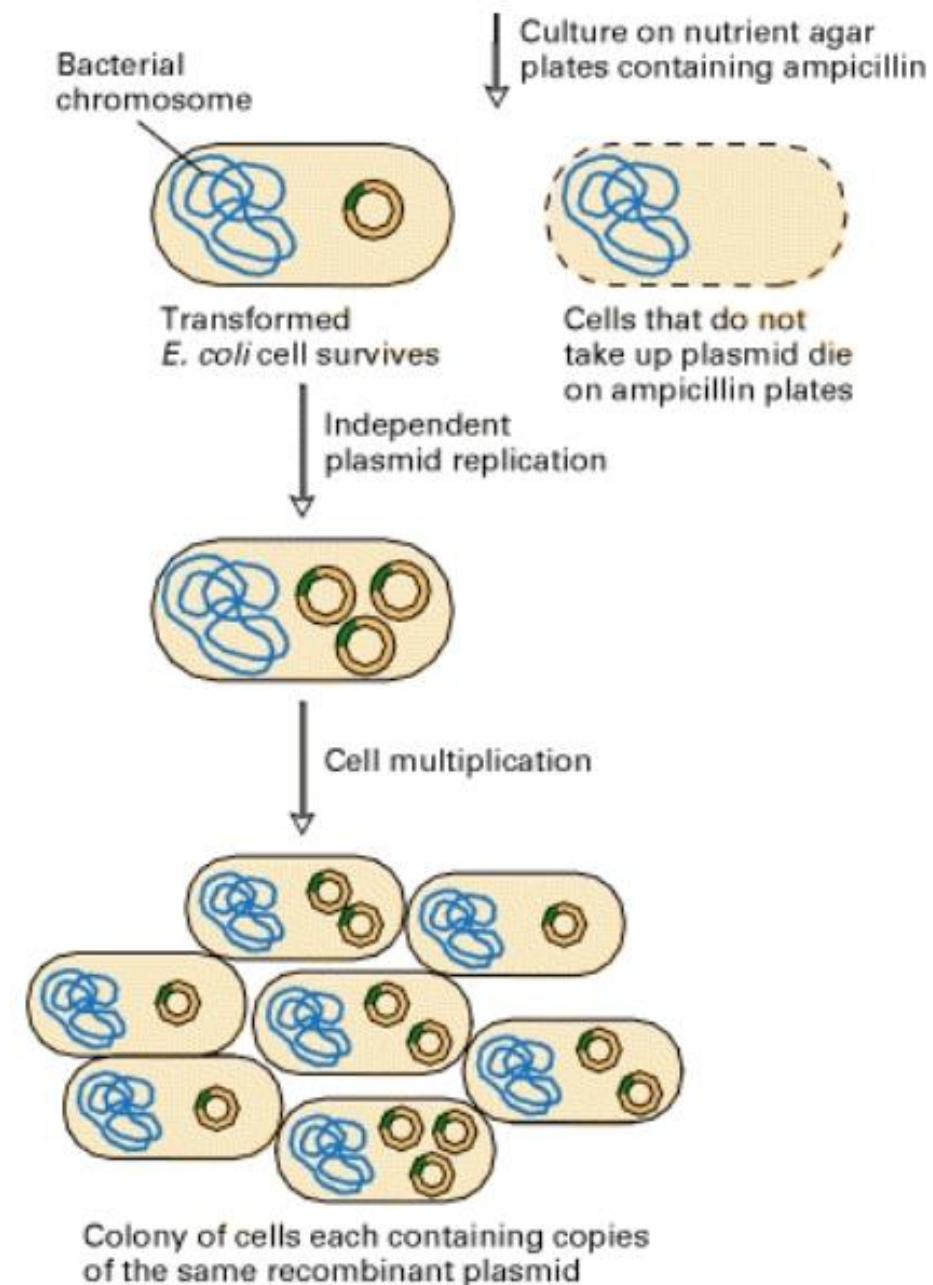
molecole di DNA circolare capaci di replicarsi e di segregare autonomamente rispetto al DNA cromosomale batterico.

- **Presenti in natura** (batteri, lieviti, alcuni eucarioti superiori)
- Portatori di geni che arrecano un **vantaggio selettivo** alla cellula ospite (es. resistenza a un antibiotico)
- **Possono ospitare DNA estraneo** (con limiti di grandezza)
- Possono essere facilmente purificati dal DNA cromosomale del batterio.

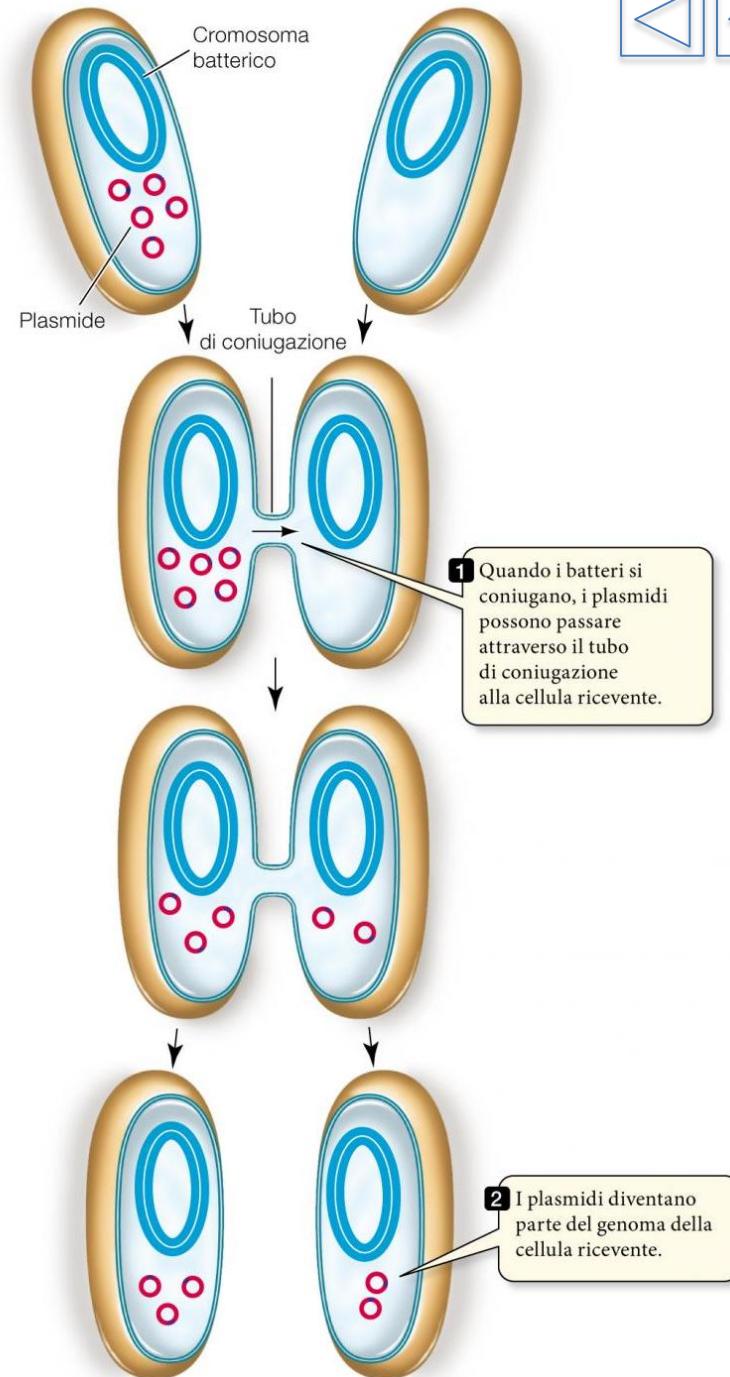
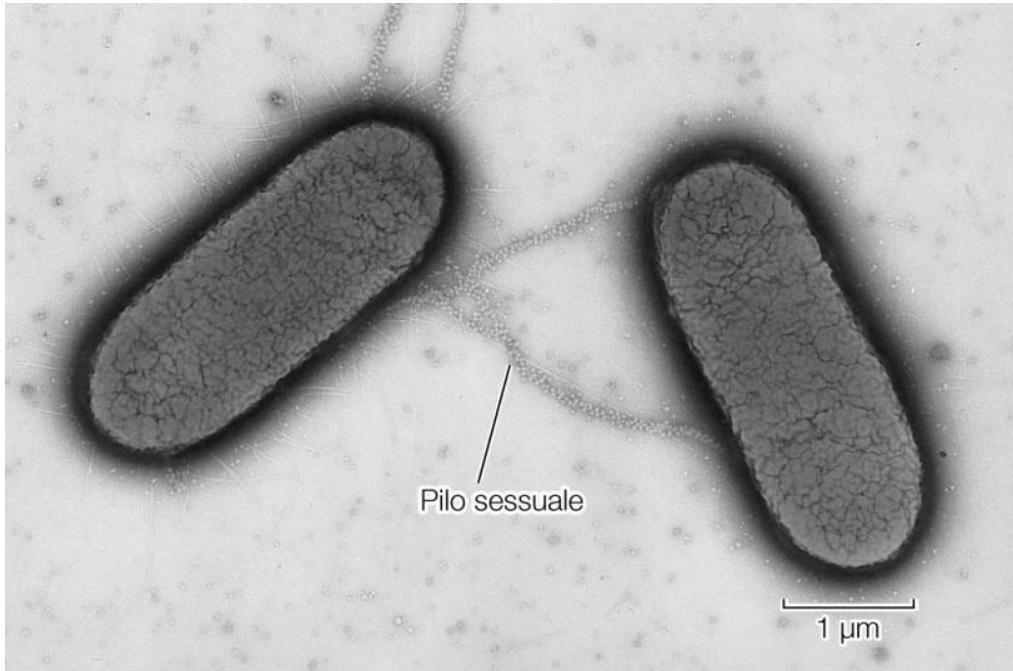
Caratteristiche essenziali dei vettori **PLASMIDICI**



- 1) Origine di replicazione
- 2) Marcatore di selezione che permette ai batteri trasformati di crescere su terreno selettivo
- 3) Regione adatta ad inserire il DNA da clonare



coniugazione

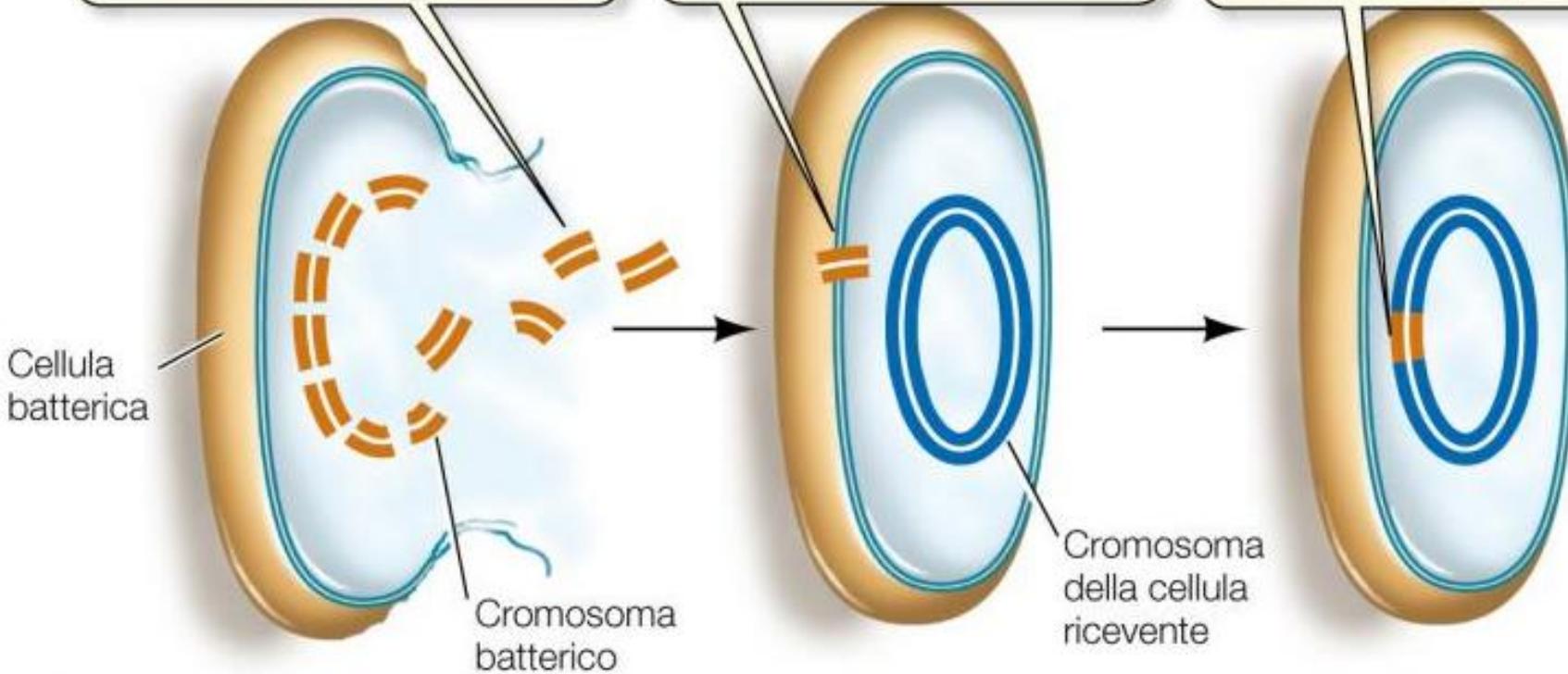


trasformazione

1 Da un batterio lisato si liberano frammenti di DNA...

2 ... alcuni dei quali possono penetrare in una cellula viva.

3 Si verifica un evento di ricombinazione tra il frammento di DNA e il cromosoma ospite.

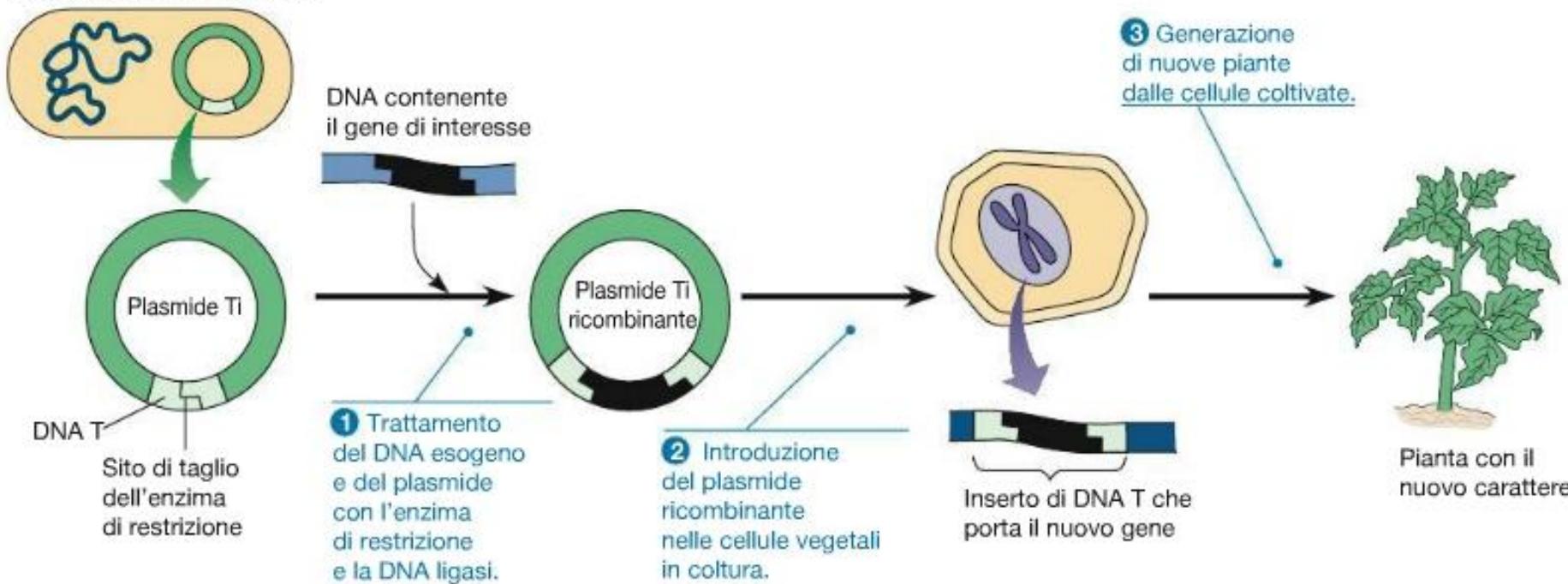


Solo alcune specie batteriche possono acquisire DNA estraneo dall'ambiente, che deve essere a doppia elica, e vengono dette "naturalmente competenti". Le altre specie divengono competenti solo in particolari condizioni fisiologiche, che in laboratorio coincidono con la fase di crescita esponenziale.

Molte specie batteriche non naturalmente competenti possono essere trasformate artificialmente in laboratorio.

La possibilità di inserire nuovi geni nelle piante è garantita dal plasmide Ti di ***Agrobacterium tumefaciens***, che infetta i vegetali producendo tumori benigni detti galle del colletto (una regione del plasmide, il **DNA T**, si inserisce nel DNA vegetale e induce il tumore)

Agrobacterium tumefaciens



Utilizzo del plasmide Ti per il trasferimento genico nelle piante. La maggior parte dell'ingegneria genetica delle piante utilizza come vettore il plasmide Ti.

Un frammento di DNA contenente il gene di interesse viene inserito in un sito di restrizione situato nella regione del DNA T del plasmide. Quando il plasmide ricombinante

è introdotto nelle cellule vegetali, esse rigenerano una nuova pianta contenente il DNA T ricombinante stabilmente integrato nel genoma di tutte le sue cellule.



Forsythia intermedia

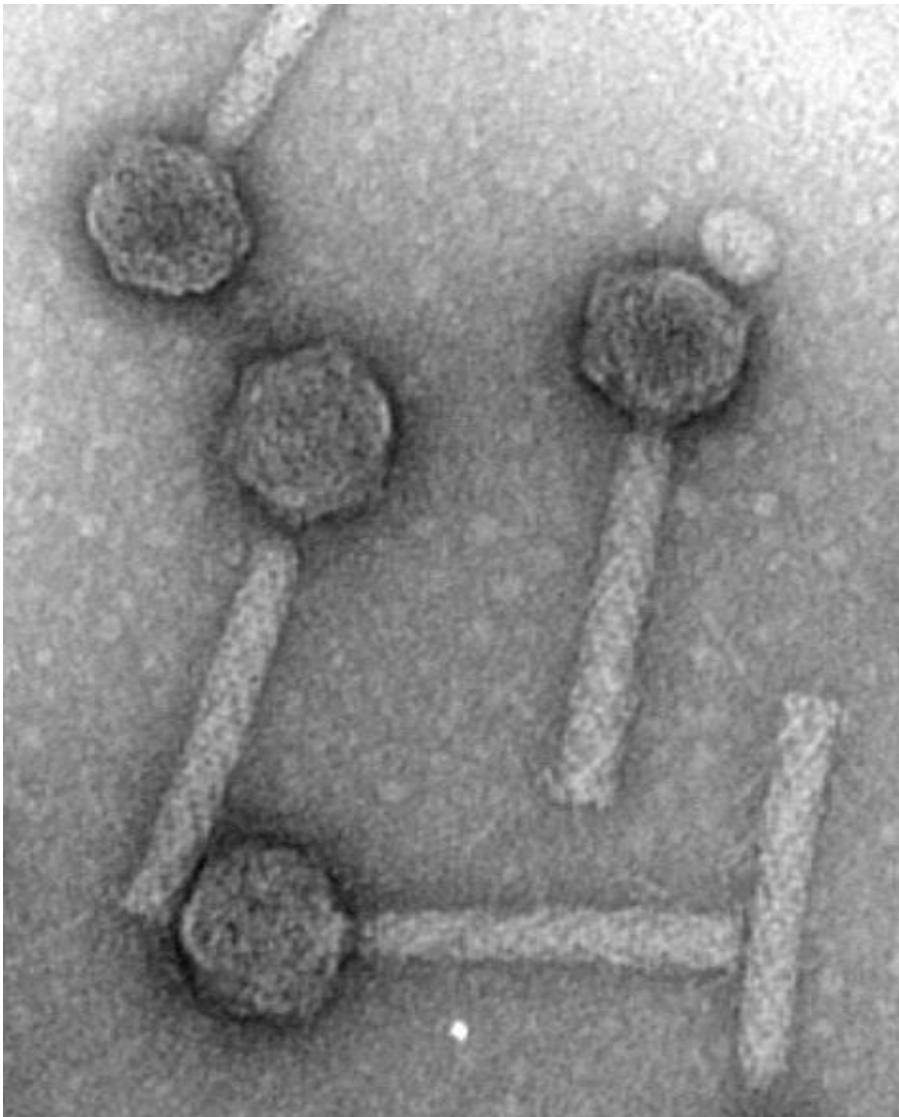
Vettori virali

In alcuni casi, come ad esempio nella costruzione di librerie di DNA, occorre clonare pezzi di DNA di dimensioni notevoli (fino a circa 20Kb).

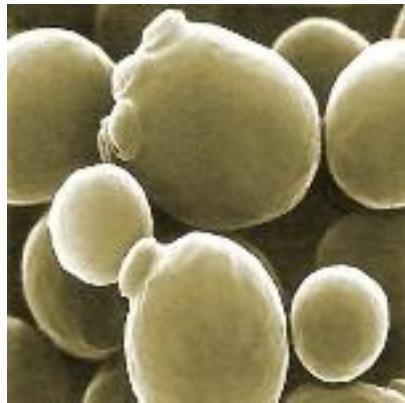
Tali inserti aumentano la dimensione del plasmide a tal punto che la trasformazione non avviene più efficacemente.

In questi casi si può far uso del DNA dei batteriofagi (virus batterici) poiché una grossa molecola di DNA può essere introdotta nell'ospite batterico da una particella virale infettiva.

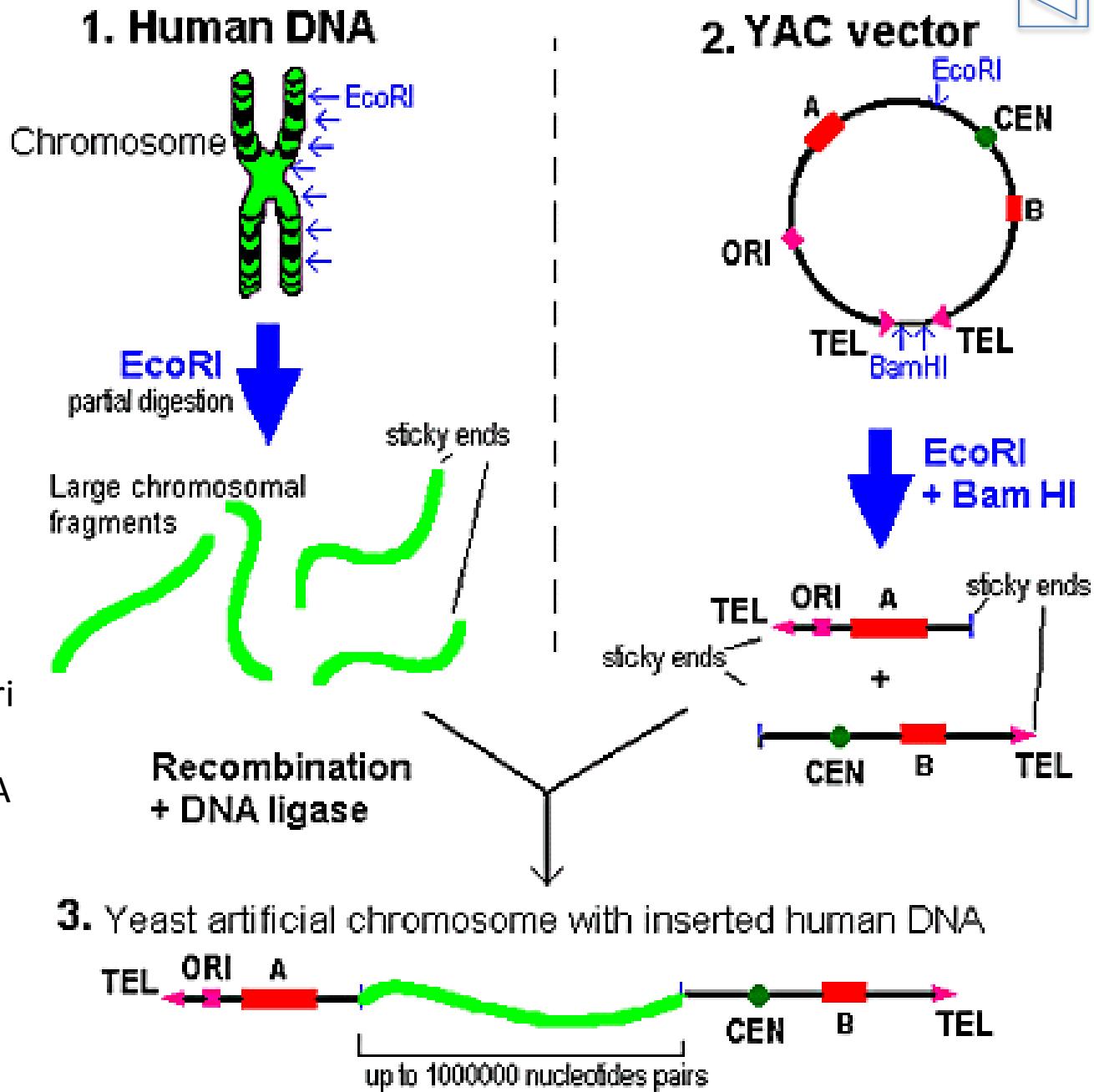
Un vettore molto usato è il batteriofago λ , gran parte del DNA del batteriofago λ viene rimosso e sostituito con l'inserto.

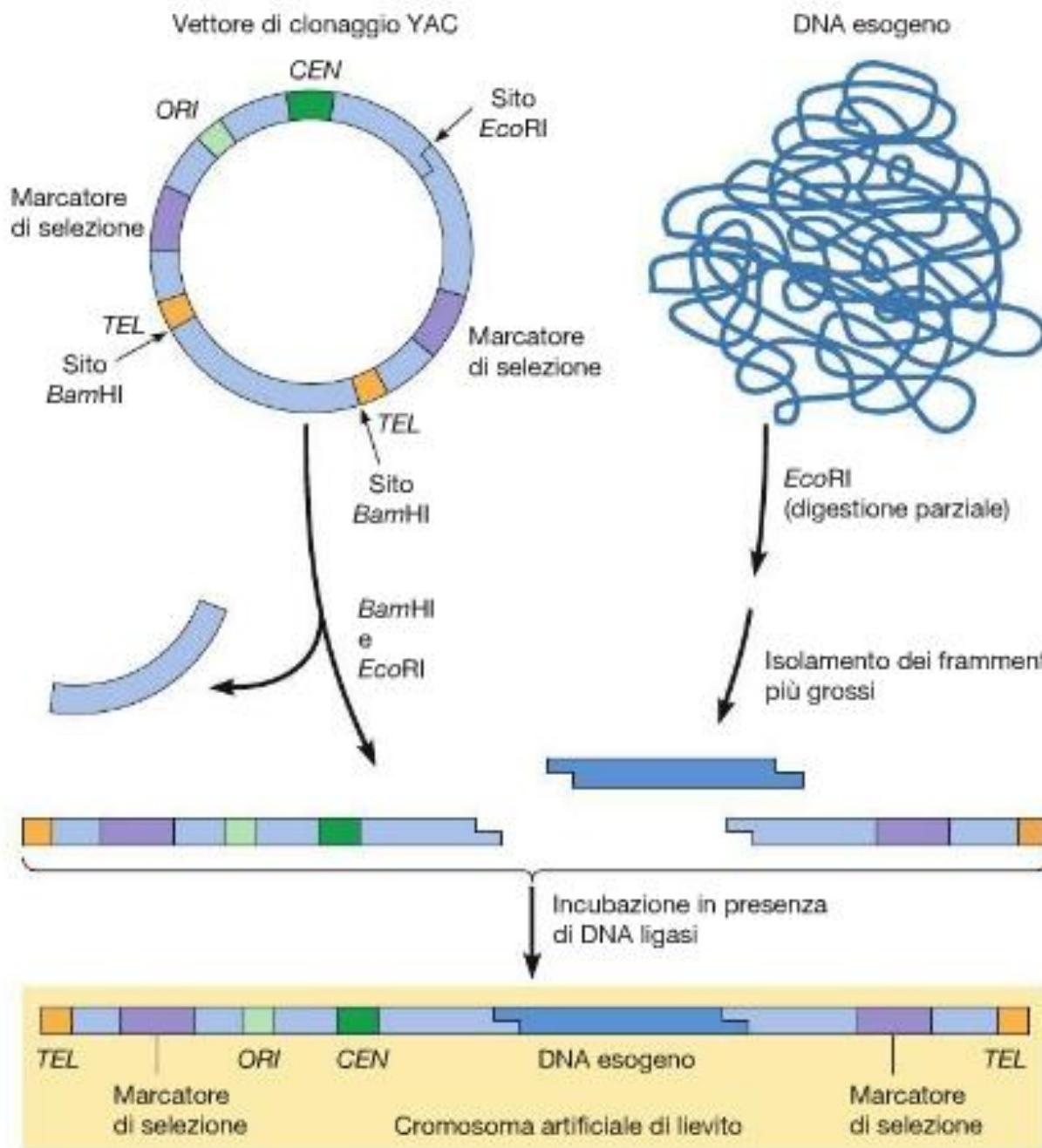


Yeast Artificial Chromosome



Essendo cromosomi eucariotici, sono i vettori che hanno la capacità di contenere inserti di DNA più grandi rispetto a qualsiasi altro vettore





Costruzione di un cromosoma artificiale di lievito (YAC).

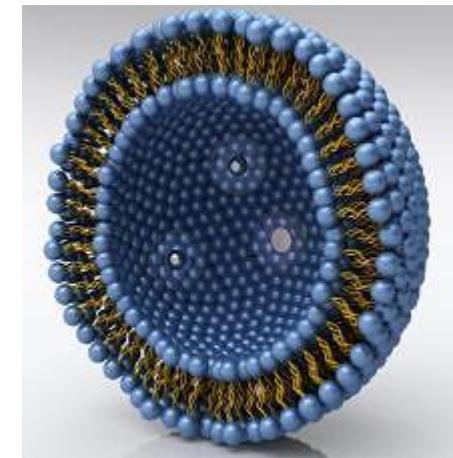
Il vettore di clonaggio YAC è una molecola di DNA circolare dotata delle seguenti sequenze nucleotidiche: un'origine di replicazione del DNA (ORI), una sequenza centromerica (CEN), due telomeri (TEL) e due marcatori di selezione. Ha inoltre due siti di restrizione per *BamHI* e uno per *EcoRI*. Digerendo il vettore YAC con entrambi gli enzimi di restrizione, si producono due frammenti lineari di DNA che, insieme, contengono tutte le sequenze essenziali più il frammento tra i due siti *BamHI* che non ha più alcuna utilità. La miscela di frammenti è incubata con i frammenti derivanti dalla digestione parziale del DNA esogeno con *EcoRI* (nella digestione parziale, dato che non tutti i siti di restrizione sono tagliati, si generano frammenti di DNA lunghi) e le molecole ricombinanti vengono saldate a opera della DNA ligasi. Tra i prodotti ottenuti, ci sono diversi cromosomi artificiali di lievito (YAC) contenenti frammenti del DNA esogeno, come si può vedere in basso nella figura. Con i prodotti ottenuti si trasformano le cellule di lievito, e le colonie di cellule che hanno ricevuto degli YAC completi possono essere identificate utilizzando i due marcatori di selezione.



Modalità di introduzione del vettore di DNA nelle cellule ospiti



metodi fisici



metodi chimici

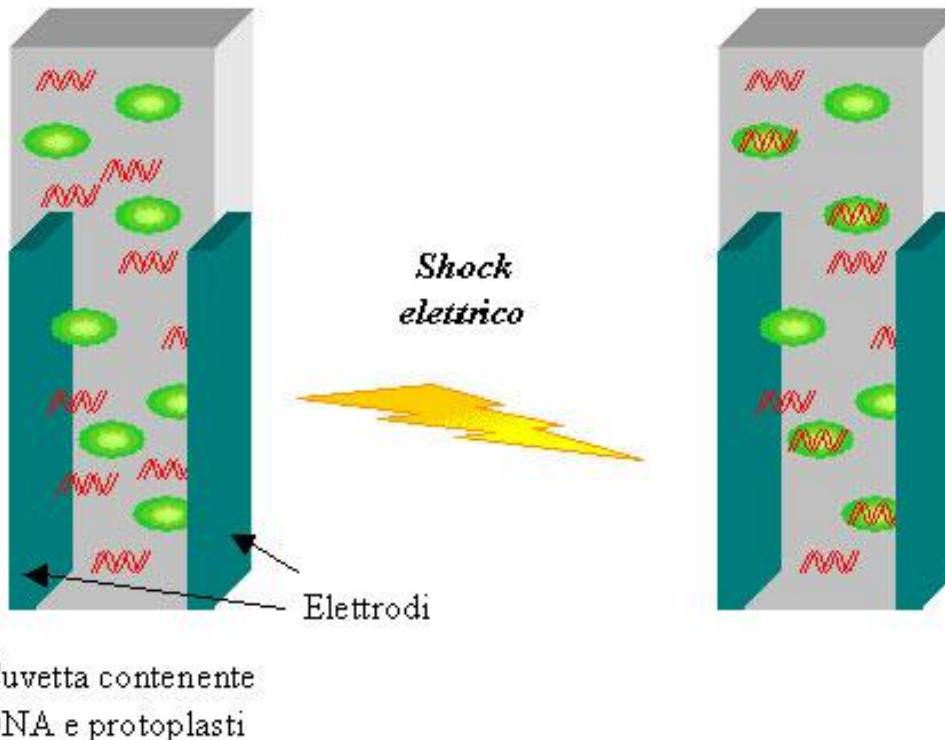
metodi tramite virus



Metodi fisici: elettroporazione

si applica una differenza di potenziale ai lati della cuvetta che contiene la soluzione con le cellule e il DNA da inserire:

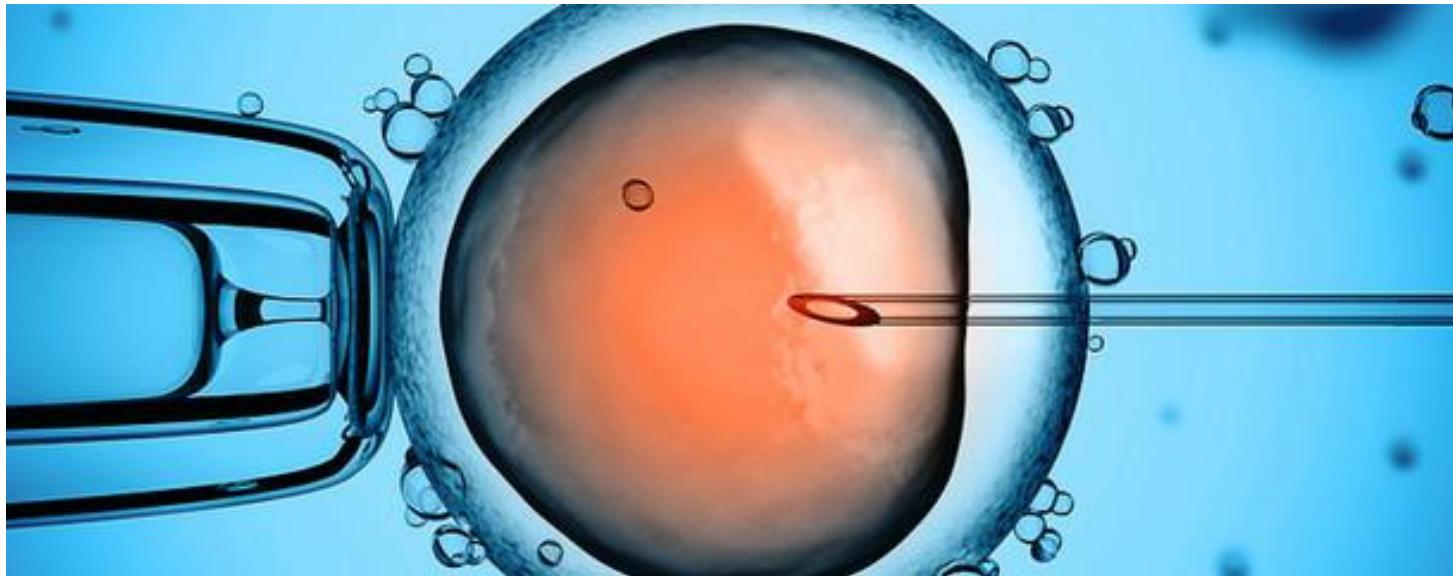
lo *shock elettrico* provoca la formazione di pori nella membrana che permettono l'ingresso del materiale genetico.



ha come difetto l'alta percentuale di cellule che non sopravvivono in seguito al trattamento

Metodi fisici: microiniezione

inserimento del materiale tramite un sottile ago
direttamente nella cellula



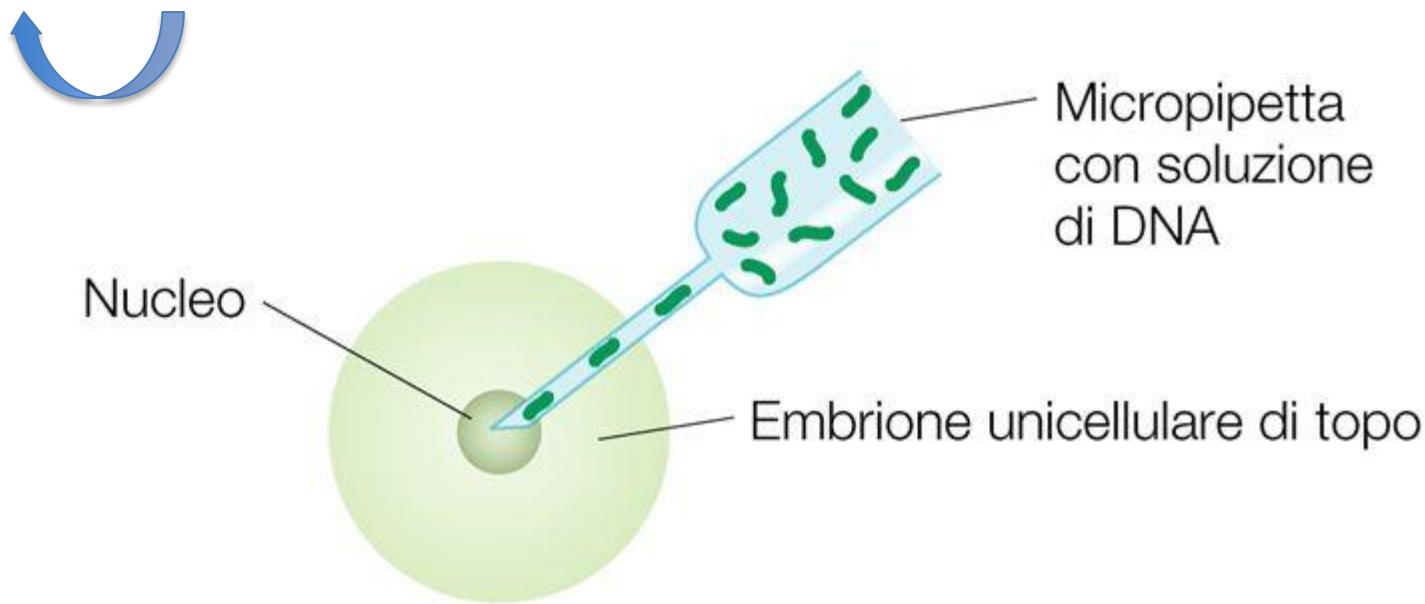
è più frequentemente usato in clinica, in tecniche come la fecondazione artificiale, che non in laboratorio dove si lavora con un alto numero di cellule

La **trasfezione** è il processo di introduzione di materiale biologico esogeno in cellule eucariotiche

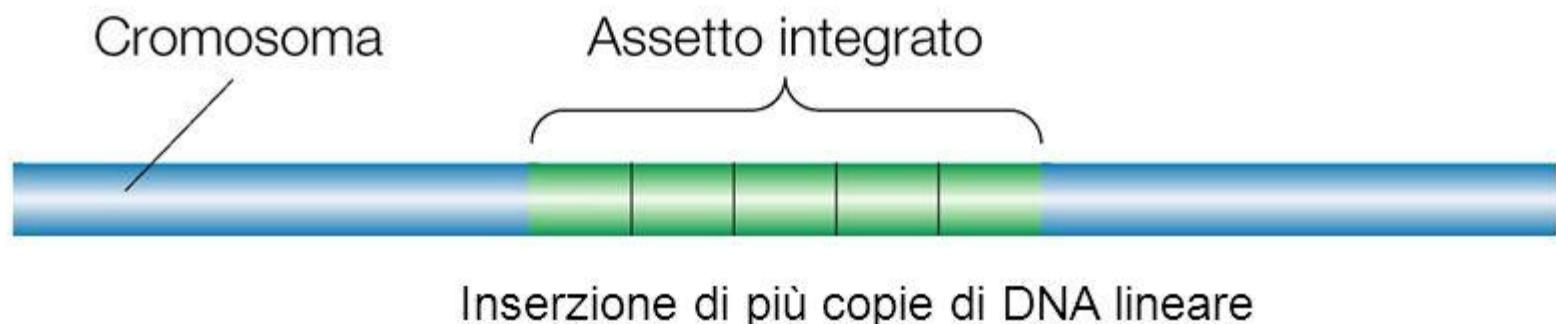
Trasferimento genico diretto

Trasfezione DNA libero con microiniezione

(a)

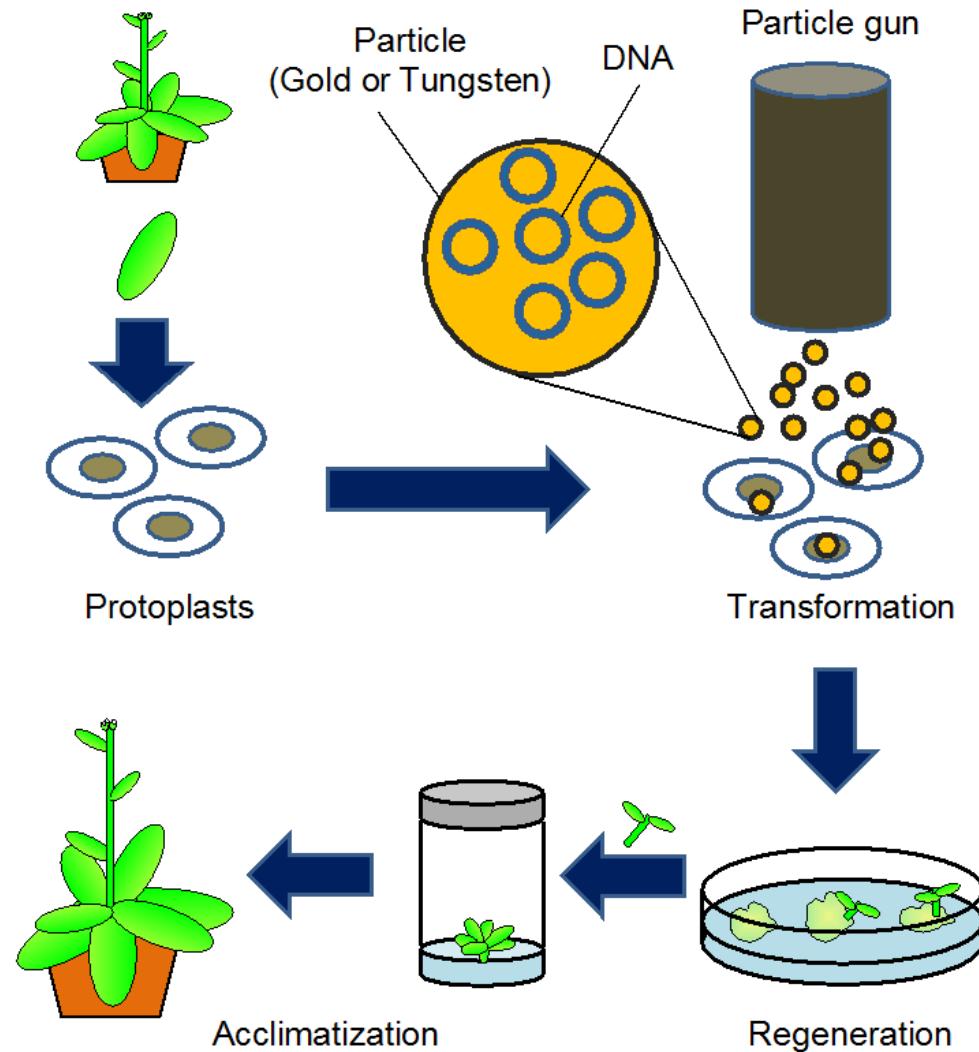


(b)



Metodi fisici: cannone genico

il DNA è accoppiato a un solido inerte (di solito di oro o tungsteno) che è "sparato" direttamente nella cellula



Metodi chimici: metodo del fosfato di calcio

La procedura prevede il mescolamento di una soluzione tampone contenente **ioni fosfato** insieme a una soluzione di **cloruro di calcio** (CaCl_2) e il **DNA da trasfettare**.

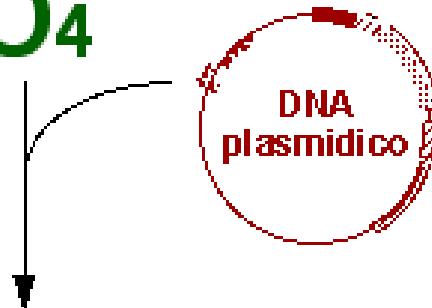
Il mescolamento delle due soluzioni produce un **precipitato di calcio fosfato**, che andrà a **legare la molecola di DNA**.

Il precipitato viene aggiunto al terreno di coltura.

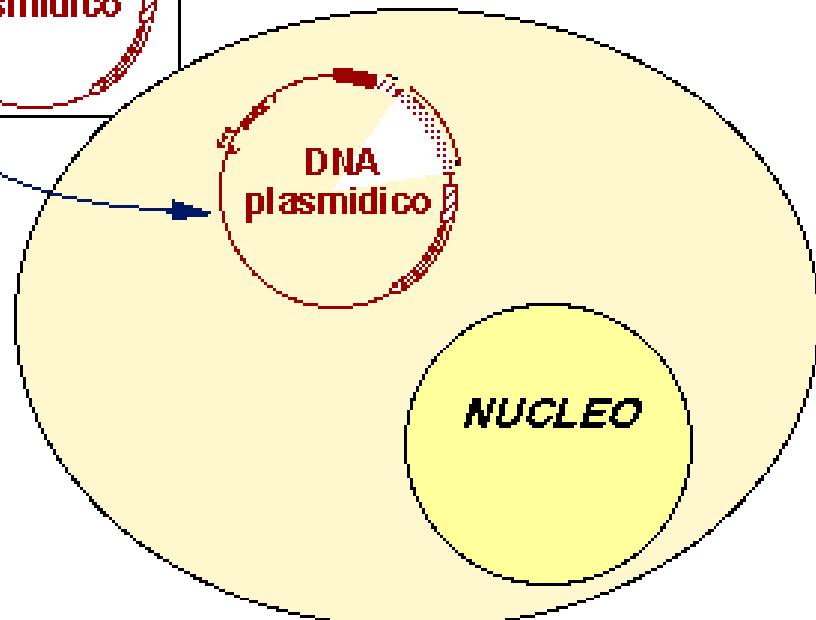
Con un processo ancora non ben noto le cellule legano il precipitato e permettono l'ingresso del DNA.



soluzione 3- $\text{CaCl}_2 + \text{PO}_4^{3-}$



PRECIPITATO DI
 Ca_3PO_4 CHE
INGLOBA



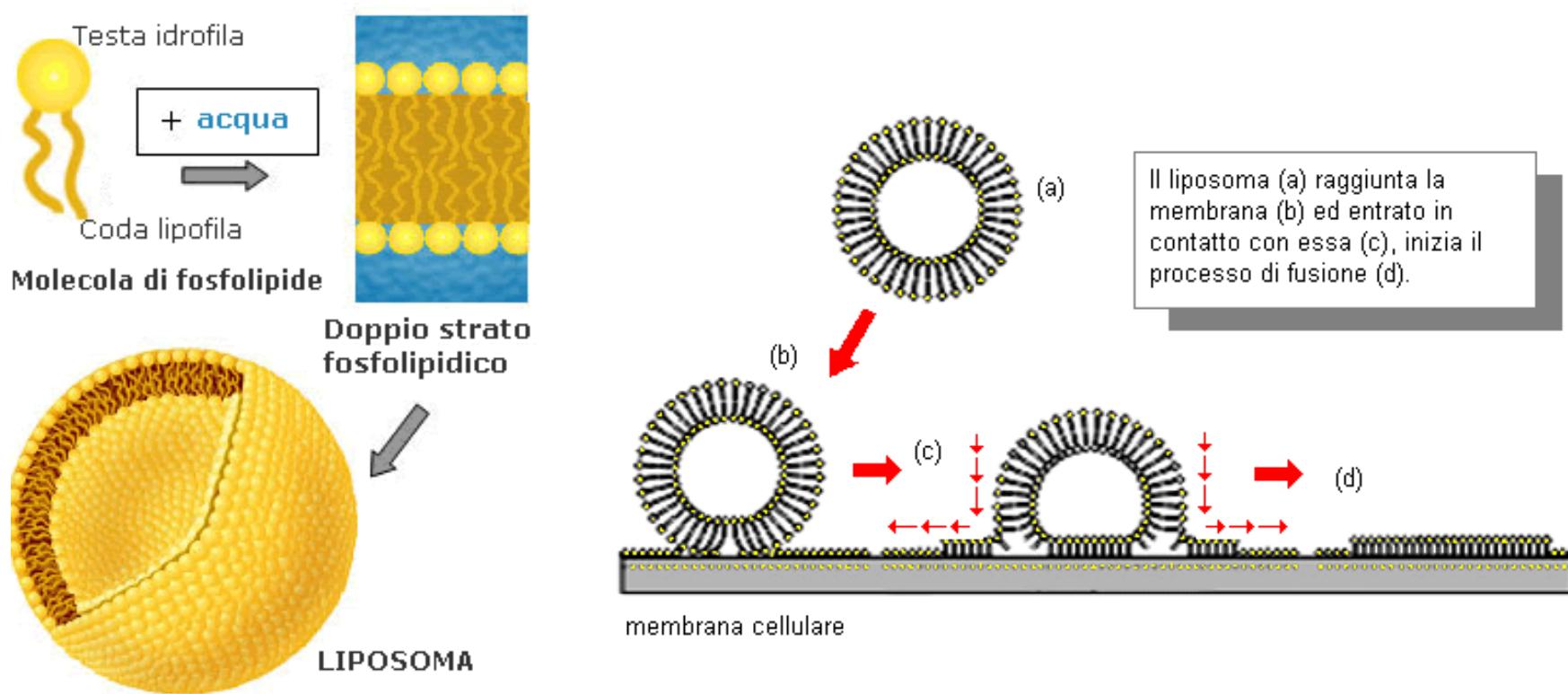
INCORPORAZIONE
NELLA CELLULA

DISTRUZIONE
DEL PRECIPITATO

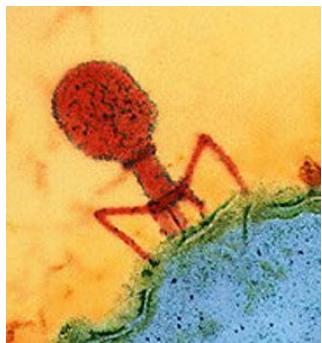
RILASCIO DEL PLASMIDE

Metodi chimici: metodo dei liposomi

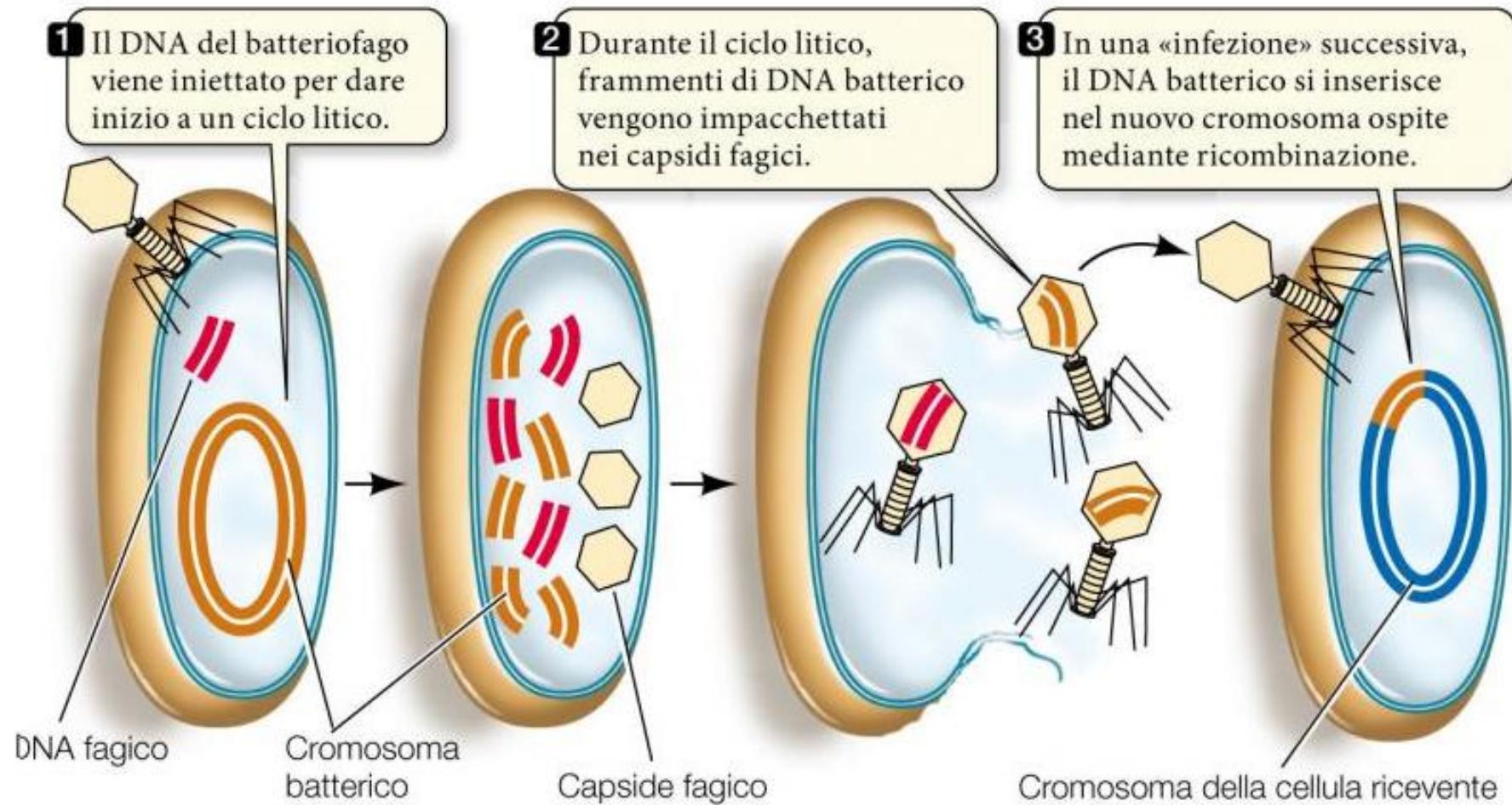
i liposomi sono piccole vescicole lipidiche che inglobano il DNA e sono indotte ad entrare con esso nella cellula simulando i processi di endocitosi cellulare.



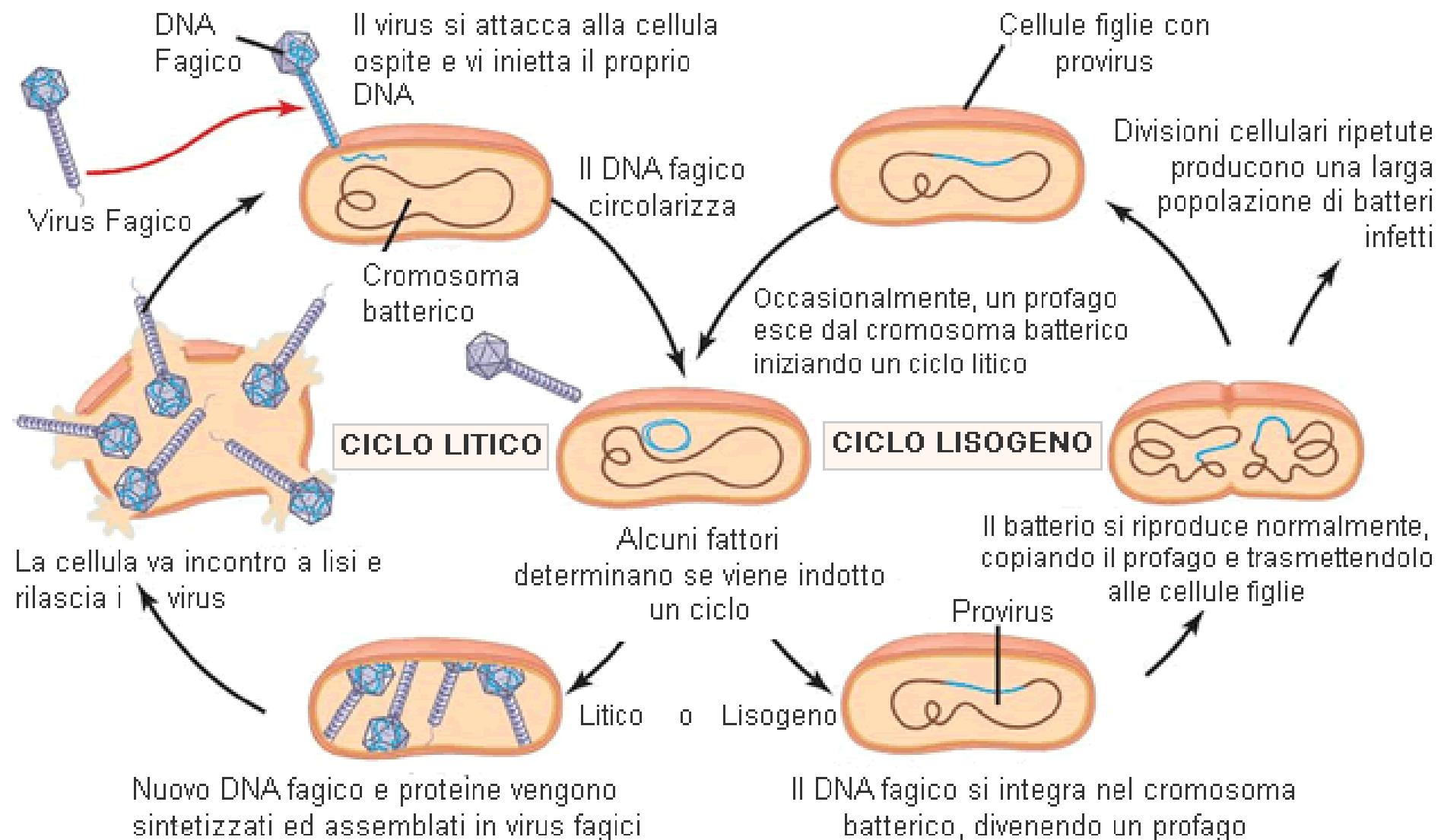
Metodi tramite virus



Il DNA può infine essere inserito tramite trasduzione, trasportato quindi da un virus.



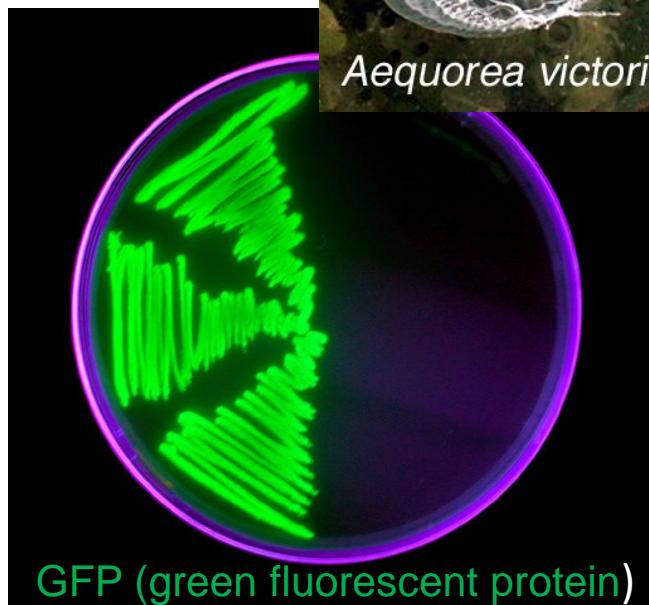
Virus: ciclo litico e ciclo lisogeno



Geni marcatori

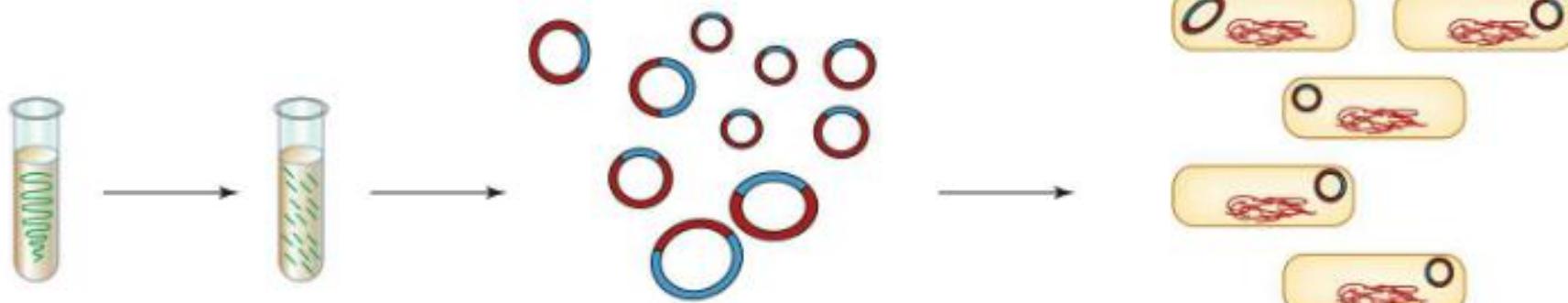
servono per identificare le cellule trasformate
producono un fenotipo riconoscibile

- resistenza agli antibiotici
- sostanze che impartiscono particolari colorazioni



GFP (green fluorescent protein)

Biblioteche di DNA

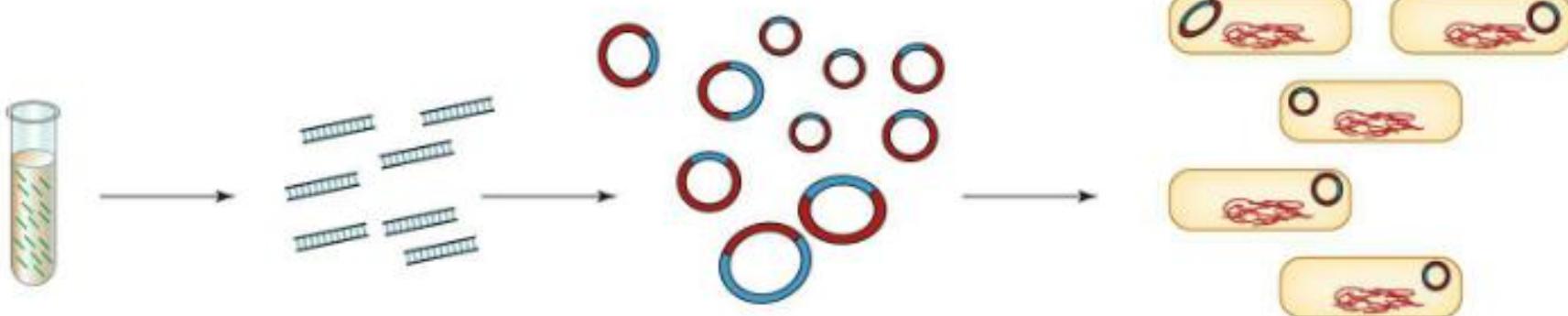


A
Preparazione
del DNA
da organismi
o tessuti

Taglio
in frammenti
con enzimi
di restrizione

Legatura
dei frammenti
con DNA plasmidico
tagliato

Trasformazione
dei plasmidi
in cellule ospiti



B
Preparazione
dell'mRNA
da organismi
o tessuti

Uso della trascrittasi
inversa per
sintetizzare cDNA

Legatura
di molecole
di cDNA
a plasmidi tagliati

Trasformazione
dei plasmidi
ricombinanti
in cellule ospiti

I colori delle biotecnologie

[rosse](#)

[verdi](#)

[bianche](#)

[grigie](#)

[blu](#)

[domande, risposte?](#)

Red Biotechnology



riferite a salute, medicina, diagnostica

Diagnostica

Prodotti naturali ad uso farmaceutico

Animali transgenici per la produzione di farmaci

Animali transgenici per sperimentare farmaci Topi knock out Tecnologia antisenso

Animali transgenici per realizzare xenotraiani

Terapia genica

Produzione di vaccini

Anticorpi monoclonali





Diagnostica molecolare

Per diagnostica molecolare si intende solitamente **la possibilità di identificare un organismo in base ad una o più sequenze geniche specifiche.**

La diagnostica molecolare si rivela spesso più sensibile e/o più specifica dei metodi tradizionali e si ricorre sempre più ad essa quando:

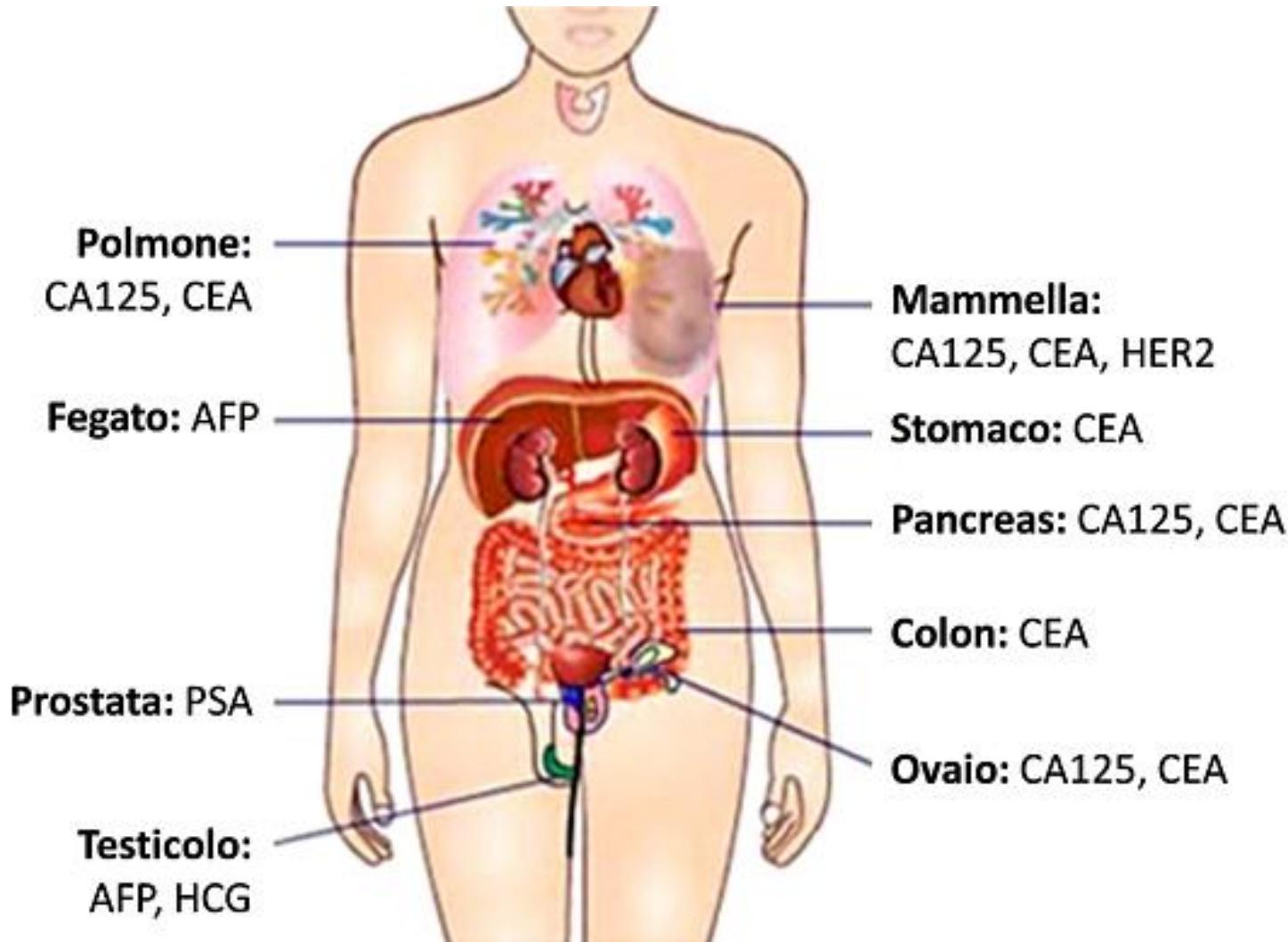
- **il microrganismo sia difficilmente od affatto coltivabile**
- quando **cresca molto lentamente in vitro (*M. tuberculosis*)**
- quando la sua **manipolazione possa essere troppo pericolosa**
(esempio *Bacillus anthracis*).

Molte delle tecniche correntemente usate in un laboratorio di diagnostica si basano sull'**amplificazione mediante PCR degli acidi nucleici**, sia di specifici frammenti di **DNA** che di **RNA** dopo trascrizione in cDNA attraverso l'uso di una trascrittasi inversa.

Una volta amplificati questi frammenti possono essere analizzati in vari modi: dimensione dei frammenti, analisi delle sequenze, ibridizzazione con sonde marcate.



La presenza di un tumore nell'organismo può essere rivelata attraverso il **dosaggio di particolari sostanze** presenti nel sangue.



Prodotti naturali a uso farmaceutico



Digitalis purpurea (cardiopatie)



Taxus baccata
(tumore dell'ovaia e
del seno)

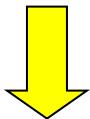
Le biotecnologie permettono di utilizzare industrialmente queste sostanze



Animali transgenici per la produzione di farmaci

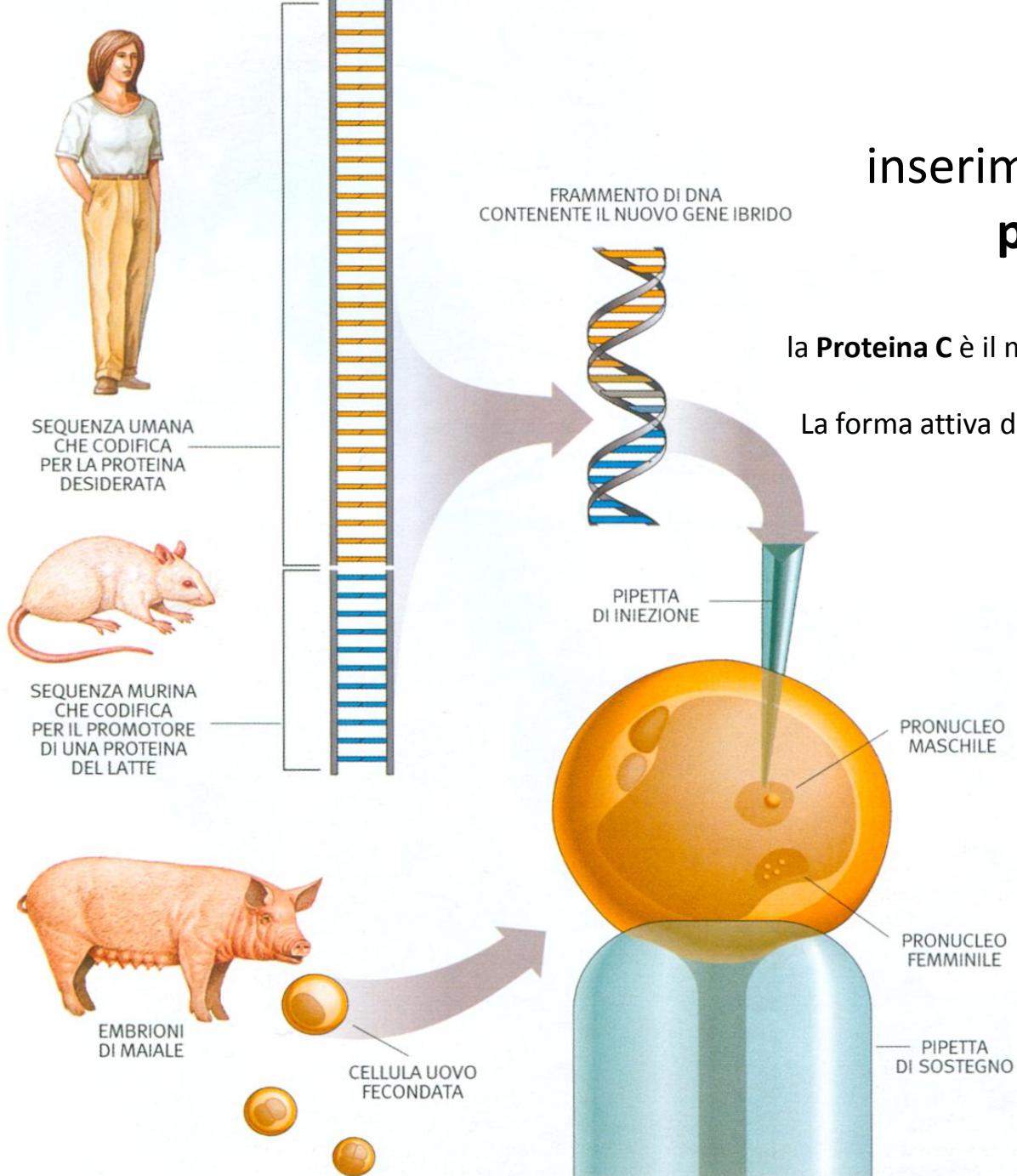
I metodi tradizionali per produrre farmaci contenenti proteine ematiche richiedono il trattamento di enormi quantità di sangue o coltura di cellule in enormi reattori

fattore VIII - fattore IX - proteina C - attivatore tissutale del plasminogeno - alfa-1-antitripsina



I'uso di animali transgenici abbatte i costi
risolve il problema della purificazione delle proteine
derivate dalle donazioni
elimina il rischio di contaminazione da agenti infettivi





inserimento del gene per la proteina C nel maiale

la **Proteina C** è il maggiore anticoagulante fisiologico.
La sua sintesi avviene nel fegato.
La forma attiva degrada il Fattore V ed il Fattore VIII.





Un bioreattore, cisterna in acciaio in cui crescono grandi quantità di cellule , con complessi meccanismi di controllo del brodo di coltura

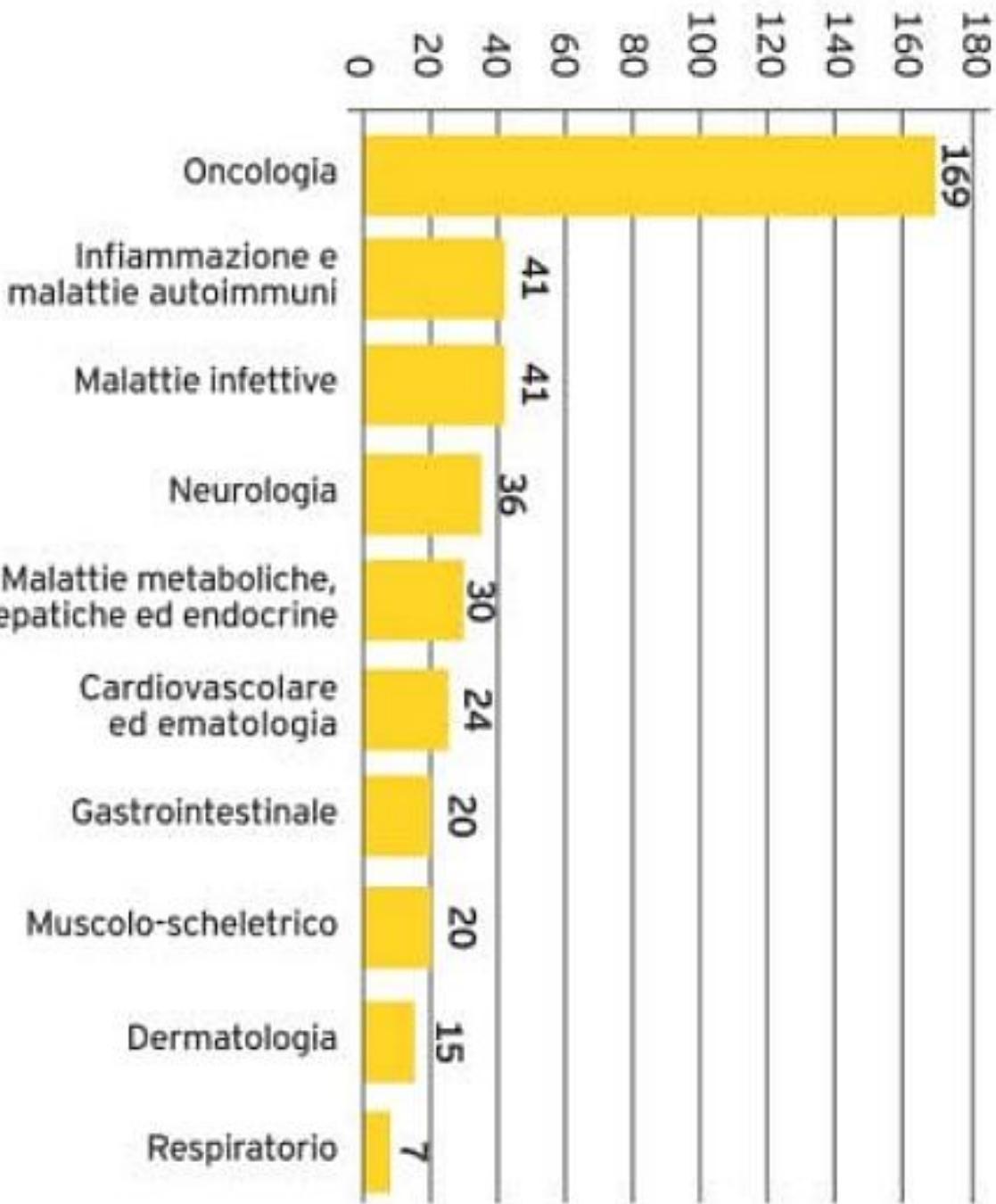


Biofarmaci per l'uomo già in produzione da parte di animali transgenici

Prodotto	Società produttrice	Applicazione
Latte di pecora		
α_1 -antitripsina umana	PPL (Pharmaceutical Proteins Limited), UK	Terapia dell'enfisema
Proteina C umana	PPL, UK	Terapia della trombosi
Fattori VIII e IX della coagulazione del sangue umano	PPL, UK	Terapia dell'emofilia
Latte di bovina		
Lattoferrina umana	Genzyme, MA, USA	Trasporto sierico del ferro e attività antibatterica
Latte di capra		
Attivatore tissutale del plasminogeno umano	Genzyme, MA, USA	Dissoluzione dei trombi di fibrina
Plasma di suino		
Emoglobina umana	DNX, NJ, USA	Sostituto del plasma umano nelle trasfusioni



Numero di prodotti in sviluppo per area terapeutica

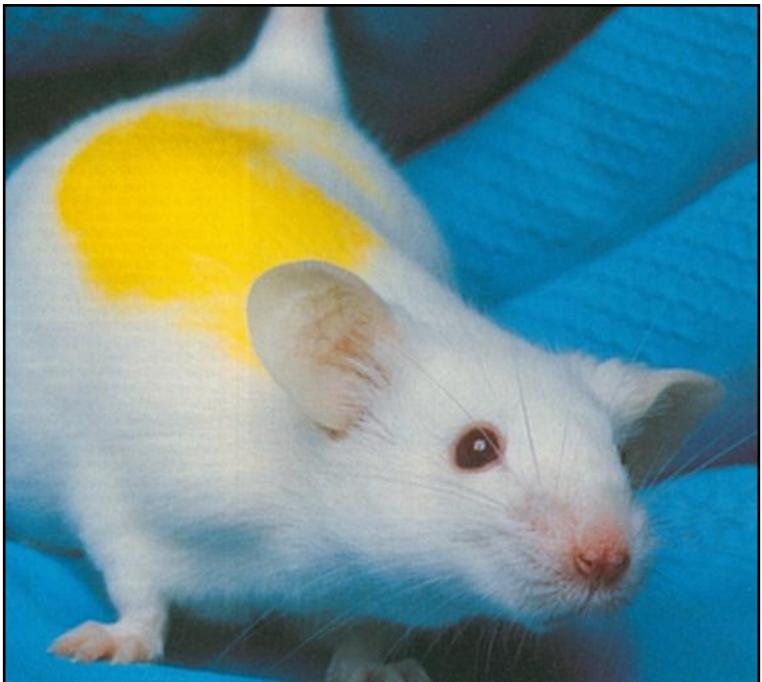


Farmaci Biotecnologici in Italia (dati 2014)

(fonte: elaborazioni Assobiotech)

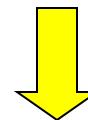


Animali transgenici per studiare e sperimentare farmaci



Oncotopo, portatore di un oncogéne umano.
E' stato il primo animale protetto da brevetto negli USA.

Cavie di laboratorio sono state geneticamente modificate per essere utilizzate quali modelli sperimentali «umanizzati» per farmaci e studio di malattie
il più manipolato è il topo



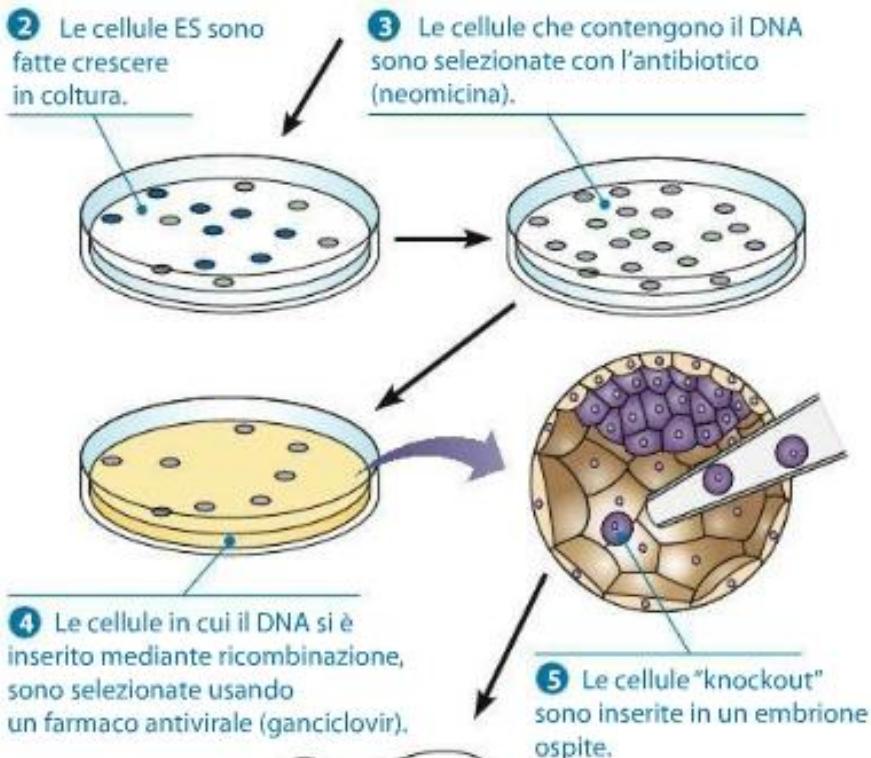
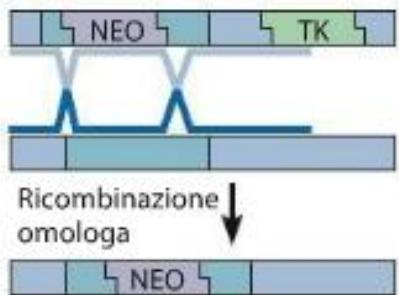
1. viene indotto a esprimere patologie umane come tumori, Aids, artriti, diabete, malattie genetiche
2. viene impiegato nella sperimentazione di farmaci



Topi knock out

studiare le conseguenze della distruzione di un singolo gene

- 1** Il DNA è introdotto nelle cellule staminali embrionali (ES). Il DNA contiene una copia non-funzionale del gene d'interesse, un gene per la resistenza all'antibiotico (Neo) e un gene che codifica per un enzima virale (TK).



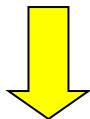
Ottenimento di topi "knockout" mediante ricombinazione omologa.

- 1** la costruzione di un vettore di DNA contenente una copia non-funzionale del gene d'interesse, che **2** è inserito in cellule staminali embrionali (*cellule ES*). Le cellule ES sono selezionate mediante l'uso di due differenti sostanze che consentono la sopravvivenza delle rare cellule in cui è avvenuto l'evento di ricombinazione (**3**, **4**). Queste cellule "knockout" sono (**5**) inserite in un embrione ospite e, (**6**) successivamente, l'allevamento produce topi che portano la mutazione desiderata.



Animali umanizzati per realizzare xenotraiani

Allevare animali in cui sono stati inseriti geni umani che dovrebbero diminuire la reazione di rigetto dell'ospite ricevente di specie diversa, da utilizzare come **depositi di organi** o di **tessuti** (si è lavorato prevalentemente sui maiali, da utilizzare in modo temporaneo, nei pazienti in attesa di trapianto)



Attualmente le ricerche utilizzano come “donatore” di materiale organico la specie suina e come “ricevente” il primate non umano.

Una **applicazione attuale**: tessuti epidermici suini applicati su pazienti umani ustionati.

Un **possibile rischio**: con gli organi possono essere trasmessi all'uomo anche virus o retrovirus animali.

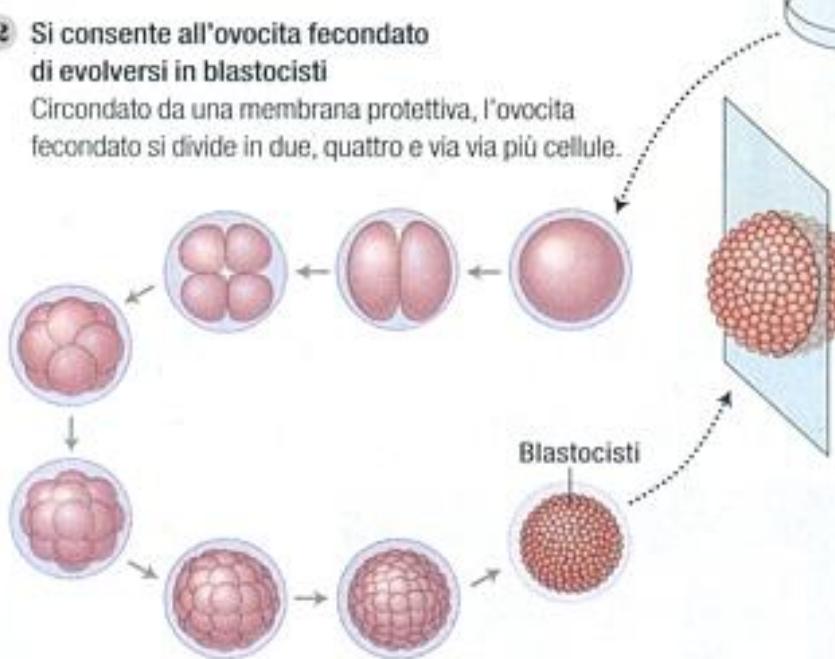


Il progetto di ricerca

Recenti progressi nelle tecnologie delle cellule staminali potrebbero consentire di far crescere organi umani come il pancreas o i reni all'interno di maiali o di altri animali. L'idea è iniettare certi tipi di cellule staminali umane in embrioni suini trattati in modo particolare. Questi embrioni «chimerici» proseguirebbero la gestazione in madri surrogate fino al momento in cui fosse possibile recuperare gli organi. Anche se per ora gli scienziati stanno lavorando appena alle fasi iniziali (1,2,3 e 4) hanno già abbozzato in che modo dovrebbe funzionare il resto del processo.

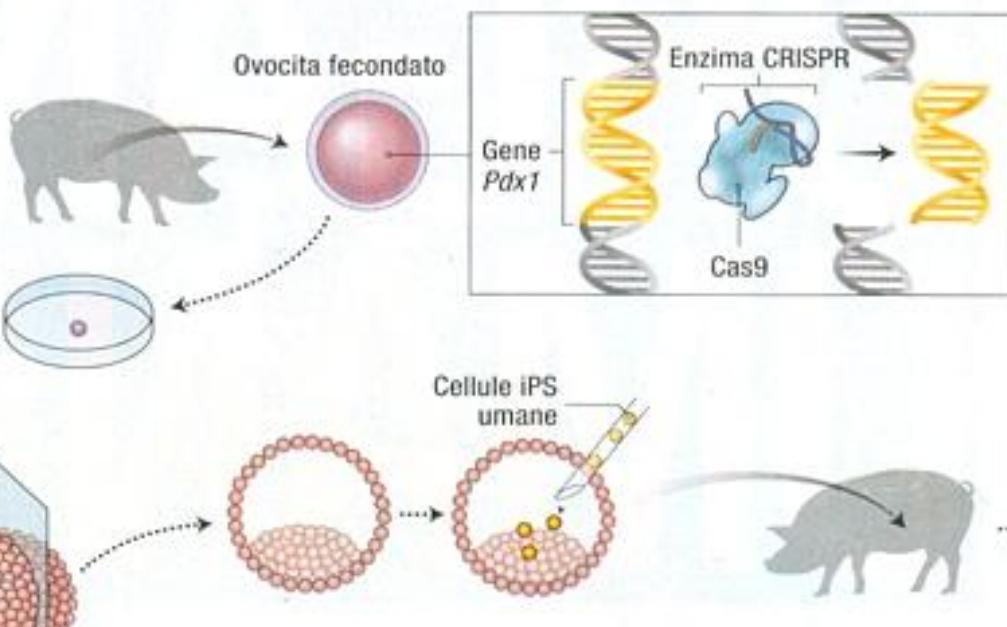
2 Si consente all'ovocita fecondato di evolversi in blastocisti

Circondato da una membrana protettiva, l'ovocita fecondato si divide in due, quattro e via via più cellule.



1 Si cambia l'assetto genetico dell'ovocita fecondato

I ricercatori interferiscono con la capacità di un embrione suino di produrre un pancreas sopprimendo il gene *Pdx1* mediante l'uso dell'enzima CRISPR/Cas9 come forbice genetica.



3 Si inocula la blastocisti con cellule staminali umane

Gli scienziati aggiungono cellule staminali pluripotenti indotte, o iPS, nell'embrione in via di sviluppo. Un aspetto fondamentale è che le cellule iPS umane contengono geni *Pdx1*: ciò significa che l'embrione chimerico può sviluppare comunque un pancreas, ma l'organo sarà formato da cellule umane.

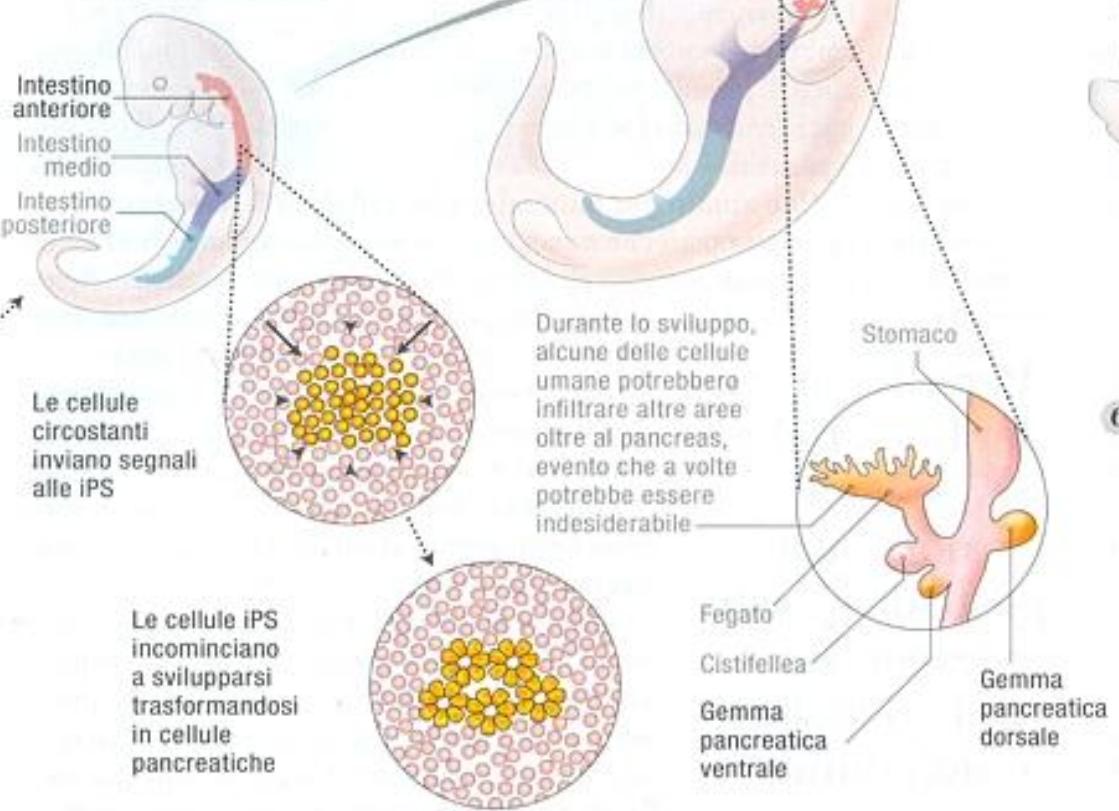
4 Si impianta la blastocisti chimerica in una scrofa

La maggior parte dello sviluppo dell'embrione prosegue in un animale surrogato.



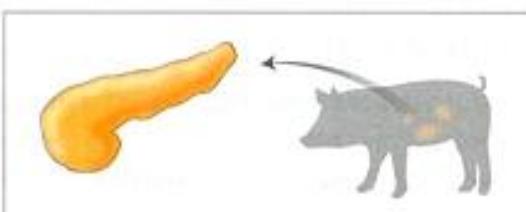
5 Si consente all'embrione chimerico di svilupparsi ulteriormente

Finora i ricercatori hanno ottenuto l'autorizzazione a consentire che il processo di crescita continui per sei settimane. Normalmente la gestazione nei suini dura circa quattro mesi.



6 Si recupera il pancreas umano completamente formato

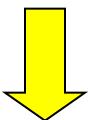
Se sarà possibile perfezionare il procedimento, i ricercatori recupereranno un organo umano trapiantabile dopo la nascita del maialino chimerico.



Vaccini che si mangiano

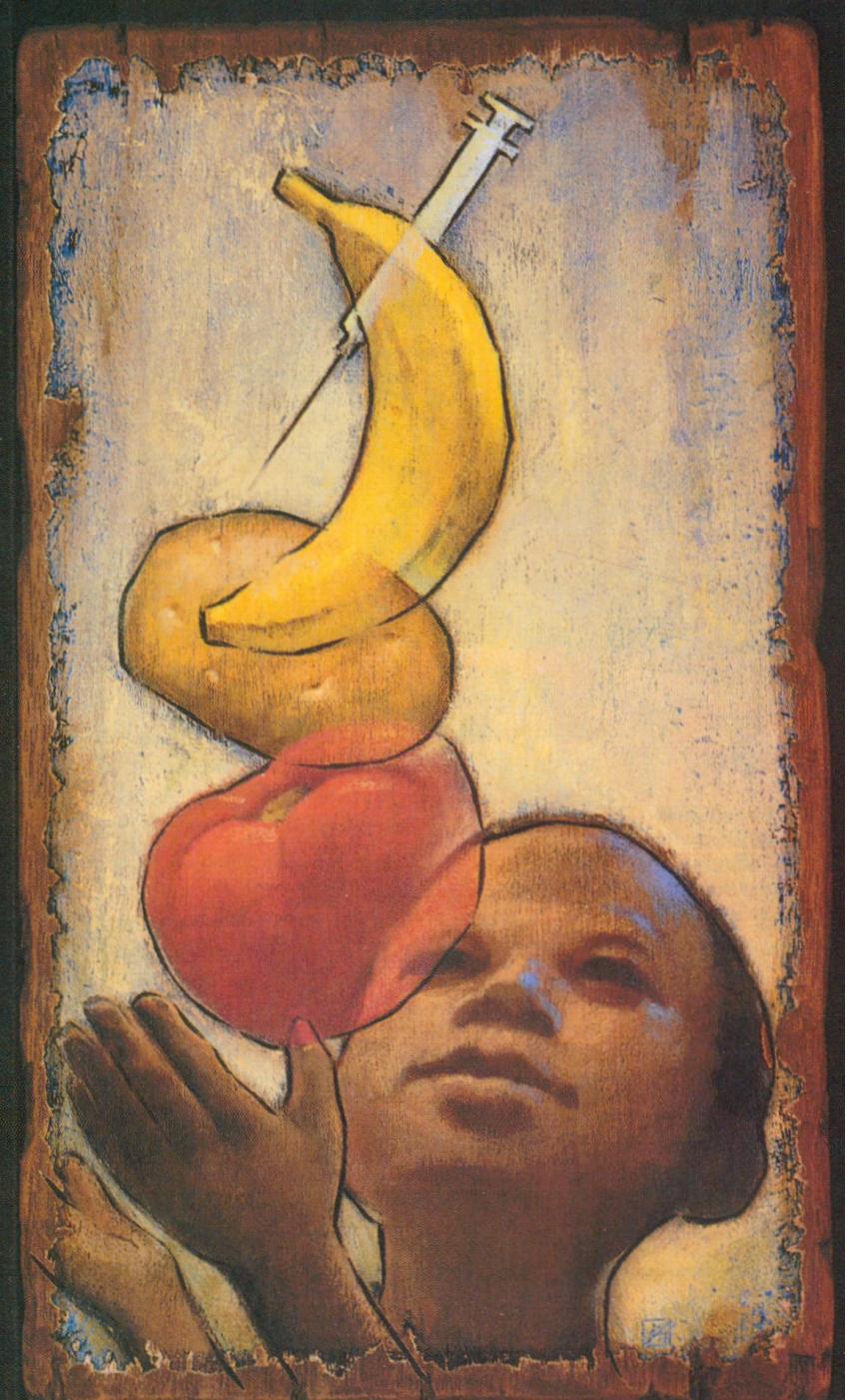
I vaccini contengono antigeni instabili che necessitano di essere conservati congelati

Questo crea gravi problemi dove la catena del freddo per la conservazione del prodotto non può essere assicurata per mancanza di frigoriferi o di energia elettrica.



PRODURRE VACCINI NELLE PIANTE:
è possibile inserire all'interno della pianta i geni per la produzione di antigeni, allo scopo di creare vaccini che possano essere somministrati oralmente.





Le prime sperimentazioni sono iniziate alla fine degli anni Novanta e riguardano vaccini contro il colera, l'enterocolite, l'epatite B, la malaria, l'influenza, la carie dentaria, ma anche contro la rabbia e l'afta epizootica.

Il vaccino contro l'enterocolite è stato prodotto nella banana: l'antigene si accumula nel frutto ed è così possibile conservarlo.



Come preparare un vaccino commestibile

Uno dei metodi per preparare un vaccino commestibile si basa sull'uso del batterio *Agrobacterium tumefaciens* come vettore - ossia, per introdurre nelle cellule vegetali l'informazione ge-

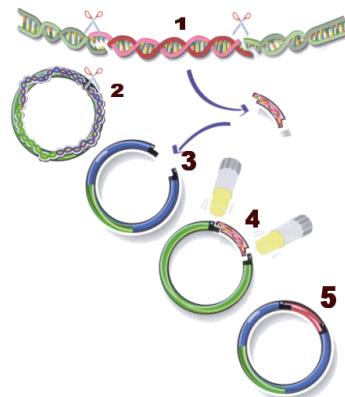
netica di antìgeni virali o batterici - di proteine che provocano una risposta immunitaria mirata nell'organismo ricevente. Lo schema illustra la produzione di patate-vaccino.



Vaccini ricombinanti

A partire da un agente patogeno, i vaccini si possono preparare in vari modi:

- I **vaccini attenuati** sono costituiti da patogeni vivi trattati per mezzo del calore o di sostanze chimiche in modo da limitare la loro virulenza e la capacità di completare il proprio ciclo riproduttivo; in genere questi vaccini provocano solo qualche lieve sintomo, ma esiste il rischio che il **virus** possa subire una reversione al tipo naturale recuperando la capacità di causare la malattia.
- I **vaccini uccisi** sono basati su agenti patogeni o tossine morti o trattati in modo da mantenere le proprietà antigeniche perdendo la capacità di provocare la malattia e la propria tossicità.
- I **vaccini a subunità** non contengono microrganismi interi, ma sono preparati a partire dai loro componenti isolati. Questi vaccini sono i più adatti a fornire protezione contro le malattie causate da agenti così pericolosi da rendere rischioso persino l'uso di vaccini uccisi.
- I **vaccini ricombinanti** si ottengono grazie alla tecnologia del **DNA ricombinante** che consente di rimuovere alcuni geni riducendo la virulenza e la capacità di riprodursi del virus oppure di inserire il gene per un singolo **determinante antigenico** (per esempio una proteina di superficie) all'interno di un microrganismo innocuo.



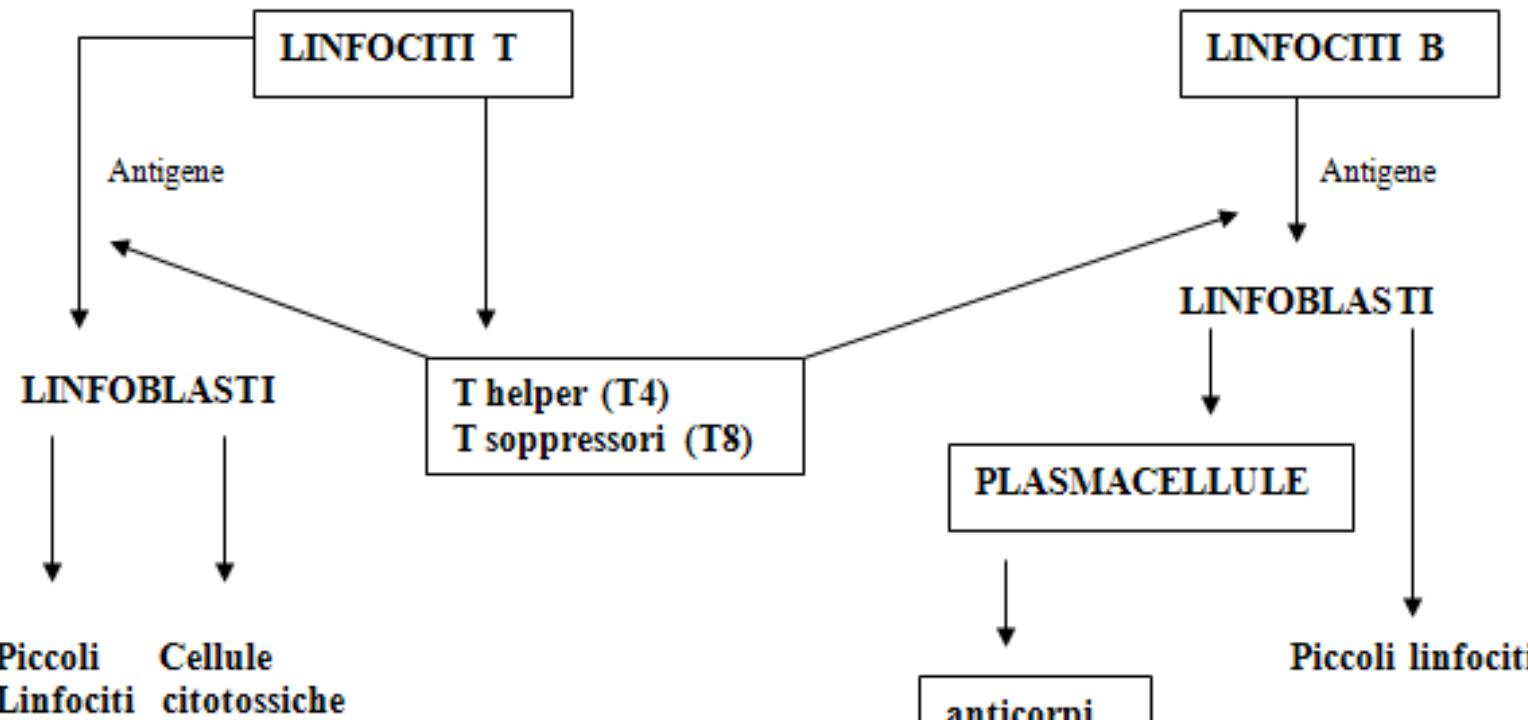


cellule staminali del midollo osseo

differenziazione timo dipendente

differenziazione midollo osseo - organi linfoidi dipendente

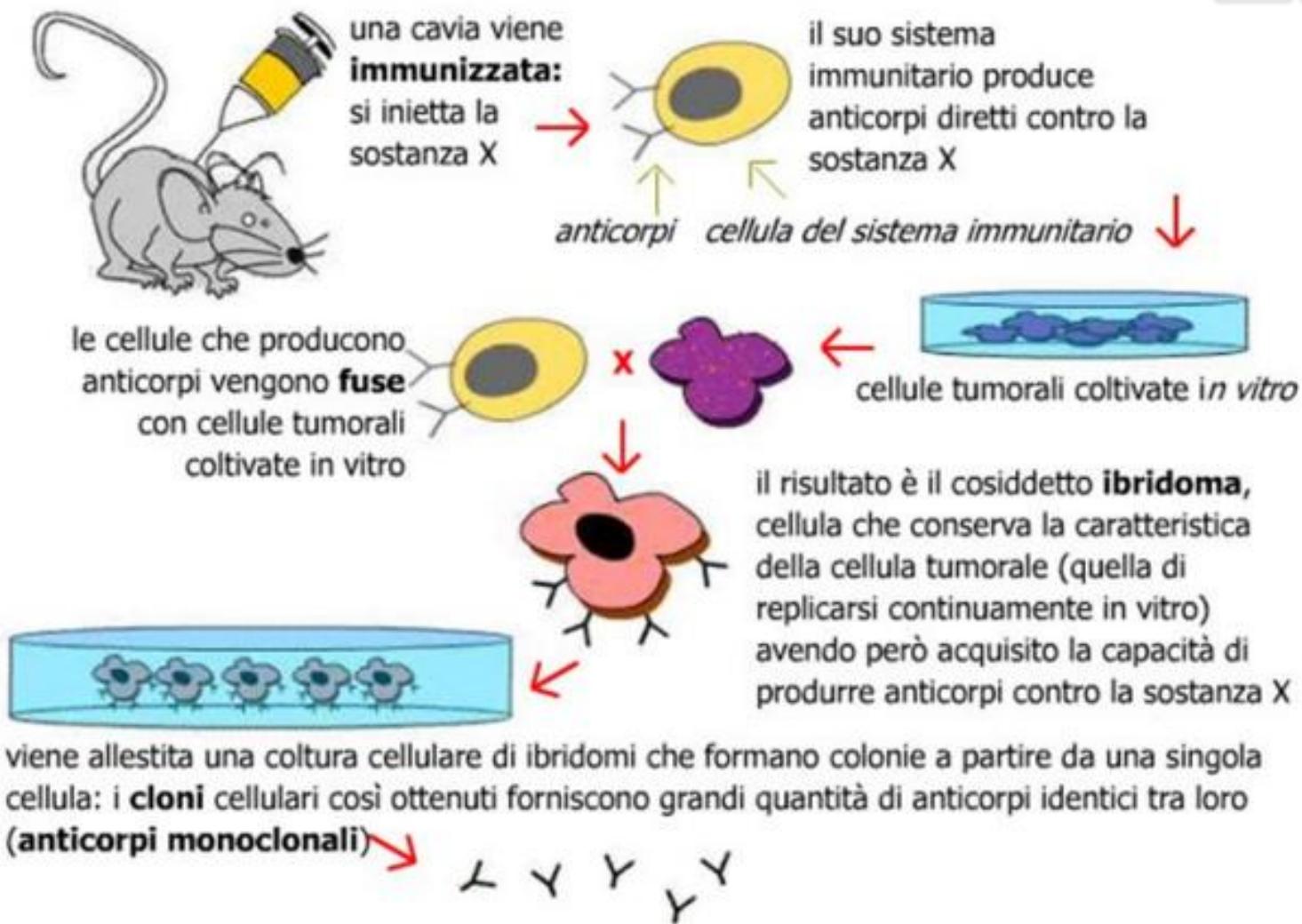
durante lo sviluppo embrionale
migrano negli organi linfoidi



- Attaccano e lisano la cellula infetta
- Rilasciano sostanze che attivano la fagocitosi



Produzione di anticorpi monoclonali



Possono essere usati in ambito terapeutico (es. per eliminare cellule tumorali, dotate di antigeni assenti sulle cellule sane) e diagnostico (es. test di gravidanza, infezioni batteriche)



Terapia genica

La terapia genica mira a contrastare o a ripristinare la funzione di un gene “difettoso” mediante il **trasferimento di una versione corretta e funzionale dello stesso gene o di un suo antagonista**.

Gli strumenti per il trasferimento genico spesso sono **virus modificati** e resi innocui in laboratorio.

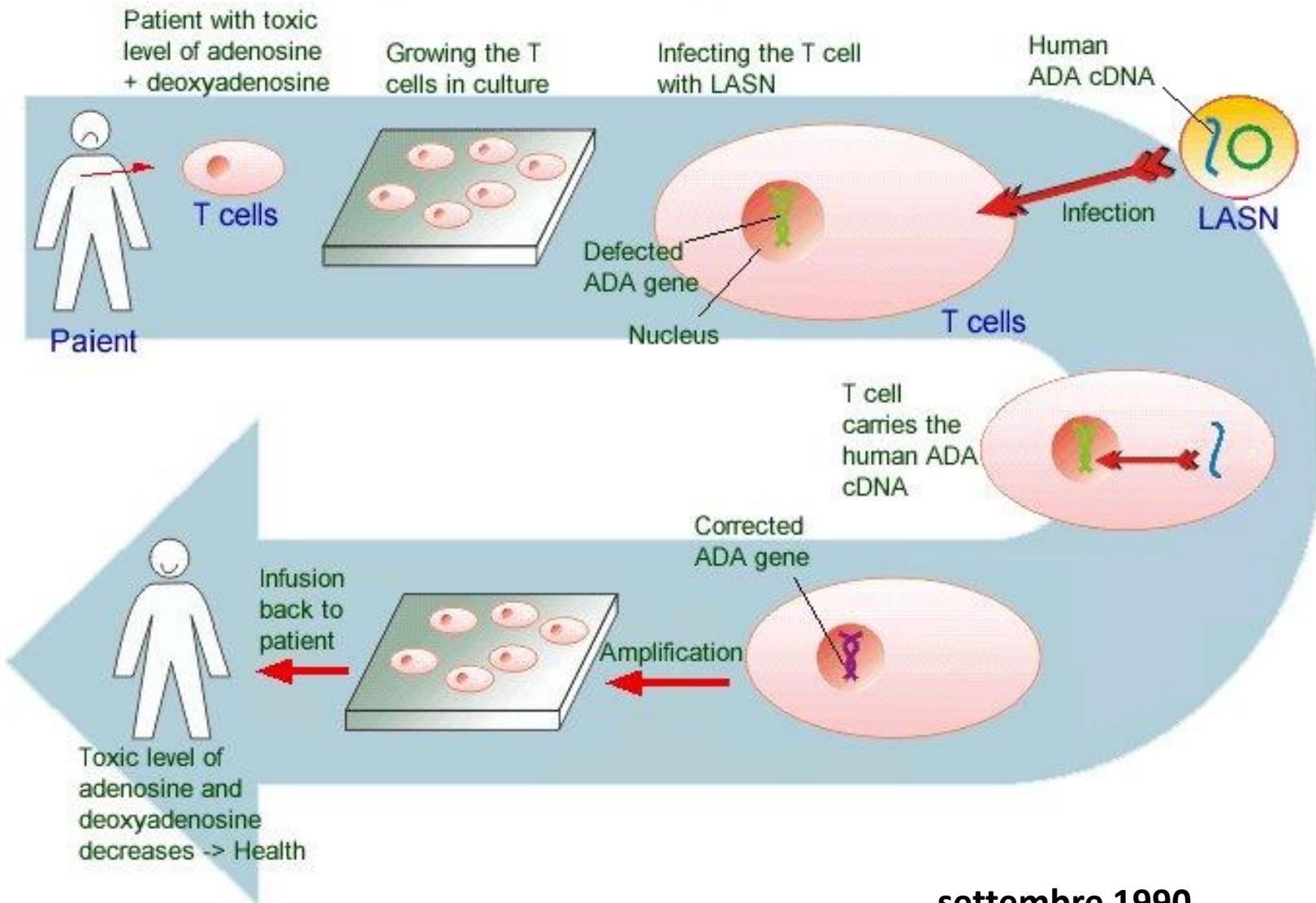
I vettori virali entrano nelle cellule bersaglio come se fossero virus naturali, introducendo il gene terapeutico.

Esistono **due tipologie di terapia genica:**
quella delle cellule germinali e quella delle cellule somatiche.

La prima si propone di trasfettare le **cellule della linea germinale**. Non viene messa in pratica soprattutto per i problemi etici che solleva. La seconda, invece, si propone di modificare solamente le **cellule somatiche**, senza intaccare, quindi, la linea germinale; è la via più studiata e tentata.



Gene Therapy for ADA-SCID



settembre 1990

Nei primi tentativi effettuati in Francia, purtroppo, su 8 soggetti trattati, due hanno sviluppato leucemia.



L'ADA-SCID è una rara patologia che appartiene al gruppo delle **immunodeficienze severe combinate** (SCID), malattie in cui il sistema immunitario è gravemente compromesso, al punto che l'organismo è incapace di difendersi dagli agenti infettivi. L'ADA-SCID si manifesta già a partire dai primi mesi di vita con infezioni ricorrenti, spesso sostenute da germi normalmente innocui per l'uomo e caratterizzate da un decorso particolarmente aggressivo. Il sistema immunitario di questi bambini è così gravemente compromesso che il loro organismo è incapace di difendersi persino da infezioni comuni come il raffreddore o la varicella. In passato questi bambini erano costretti a vivere isolati dal mondo e in ambienti con aria filtrata per sopravvivere. Generalmente, le prime manifestazioni sono di carattere infettivo, a cui si associano poi altri fenomeni quali rallentamento nella crescita, anomalie scheletriche, sordità, alterazioni neurologiche e comportamentali, fenomeni autoimmuni.

In assenza di un trattamento efficace, la malattia può risultare fatale entro i primi anni di vita.

La malattia è causata dall'alterazione del **gene ADA**, che permette la produzione di un enzima chiamato **adenosina deaminasi (ADA)**, importante per la **maturazione e la funzionalità dei linfociti**, cellule del sistema immunitario fondamentali per la difesa dell'organismo dalle infezioni. La malattia si trasmette come carattere recessivo: se in una coppia entrambi i genitori sono portatori sani, a ogni gravidanza si ha un rischio del 25 per cento di generare figli affetti.



Fino a poco tempo fa, l'unico trattamento curativo era il trapianto di midollo osseo, effettuabile tuttavia soltanto in presenza di un donatore compatibile.

In alternativa, si può fornire al bambino l'enzima ADA purificato, di origine bovina (terapia enzimatica sostitutiva), somministrato con iniezioni intramuscolari periodiche (tale modalità terapeutica perdeva efficacia col passar del tempo a causa del prodursi di anticorpi contro l'ADA d'origine bovina)

Nel 2002 i ricercatori dell'Istituto Telethon di Milano hanno dimostrato l'efficacia della terapia genica: oggi sono **16 bambini trattati con successo con questo metodo**.

Il protocollo terapeutico prevede :

- **prelievo delle cellule staminali dal midollo osseo** dei pazienti,
- **loro correzione in laboratorio** tramite l'introduzione del vettore contenente il gene terapeutico
- **reinfusione** nell'organismo del paziente

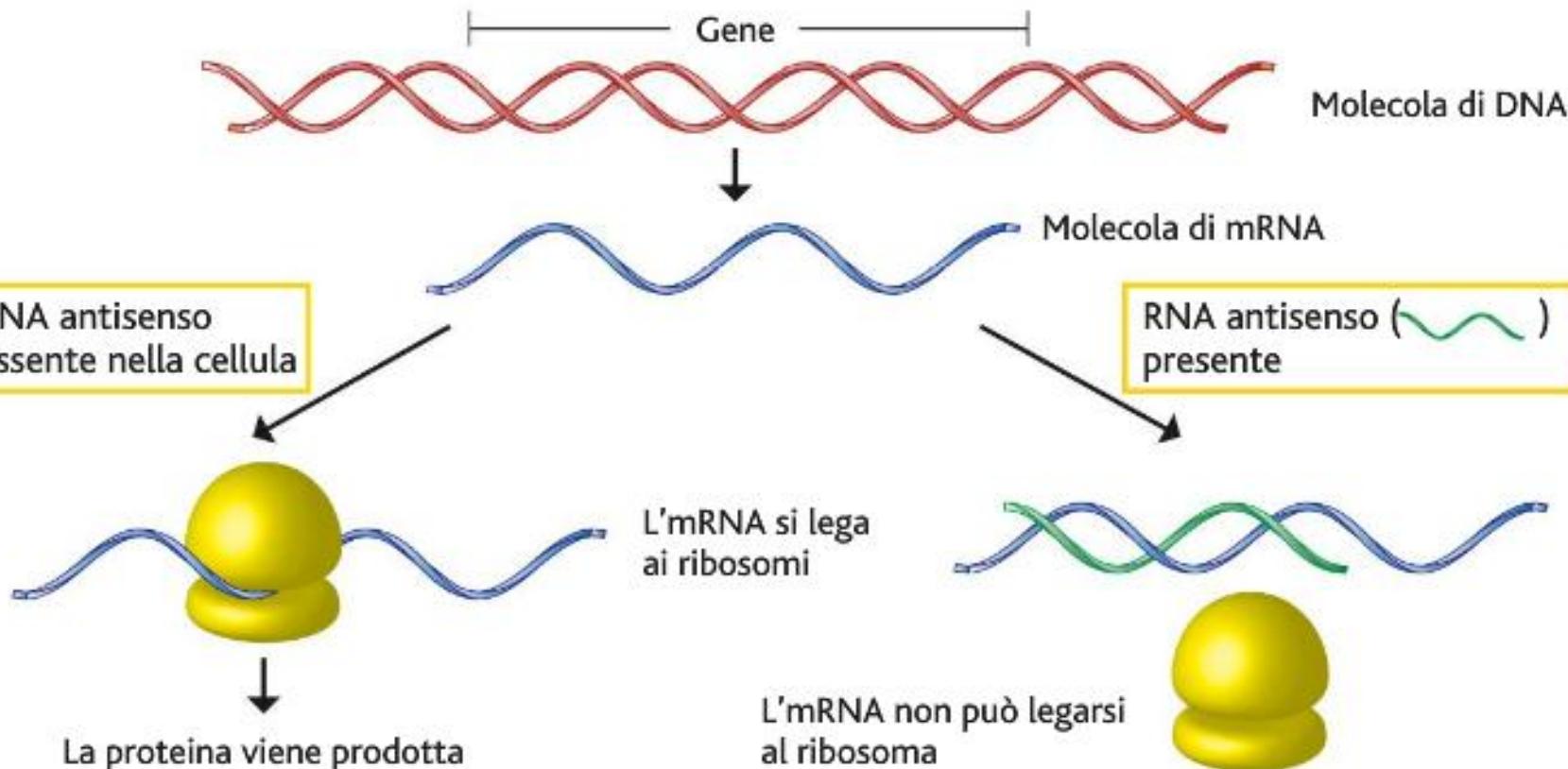
Oggi è riconosciuto a livello internazionale come modello per la messa a punto di una cura per altre malattie genetiche.



La tecnologia antiseno

Usa oligonucleotidi (di DNA o RNA) a filamento singolo che bloccano la trascrizione (con DNA) o la traduzione (con RNA) di un mRNA

E' usata per il **silenziamento dell'espressione di alcuni geni.**



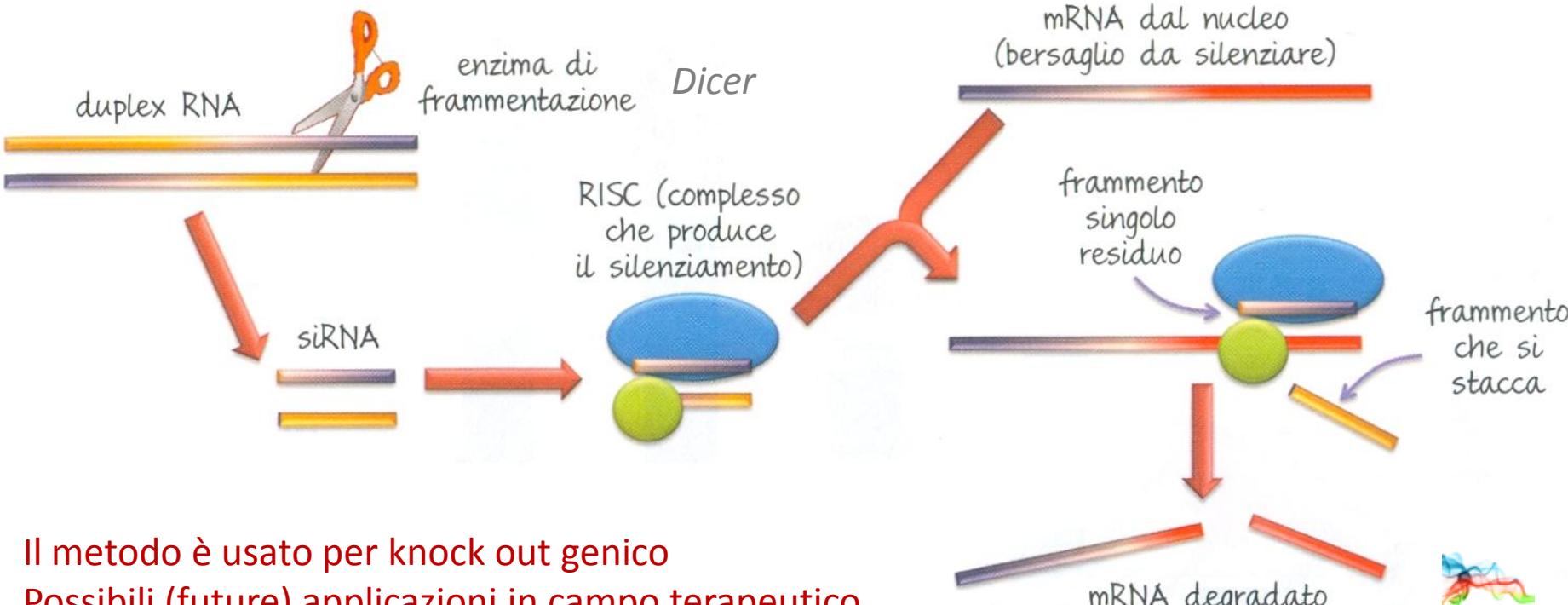
- La molecola antiseno ha **sequenze complementari** al mRNA trascritto dal gene bersaglio
- Forma un **ibrido** a doppia elica che **non viene tradotto**
- L'ibrido viene **degradato** da specifici enzimi



Interferenza dell'RNA - RNAi (*RNA interference*)

E' un processo naturale (ancora poco compreso)

1. Inizia con un **riconoscimento antisenso** che porta a una **molecola a doppia elica di RNA**
2. La molecola a doppia elica di RNA è tagliata da un enzima detto **Dicer**
3. Si ottengono oligonucleotidi detti **siRNA** (small interfering RNA)
4. Gli siRNA attivano un complesso di silenziamento indotto dall'RNA detto **RISC**
(RNA induced silencing complex)
5. Una proteina riduce i siRNA a **frammenti singoli**
6. I frammenti **si appaiano con gli mRNA bersaglio**, impedendone la traduzione e inducendone la degradazione



Il metodo è usato per knock out genico

Possibili (future) applicazioni in campo terapeutico

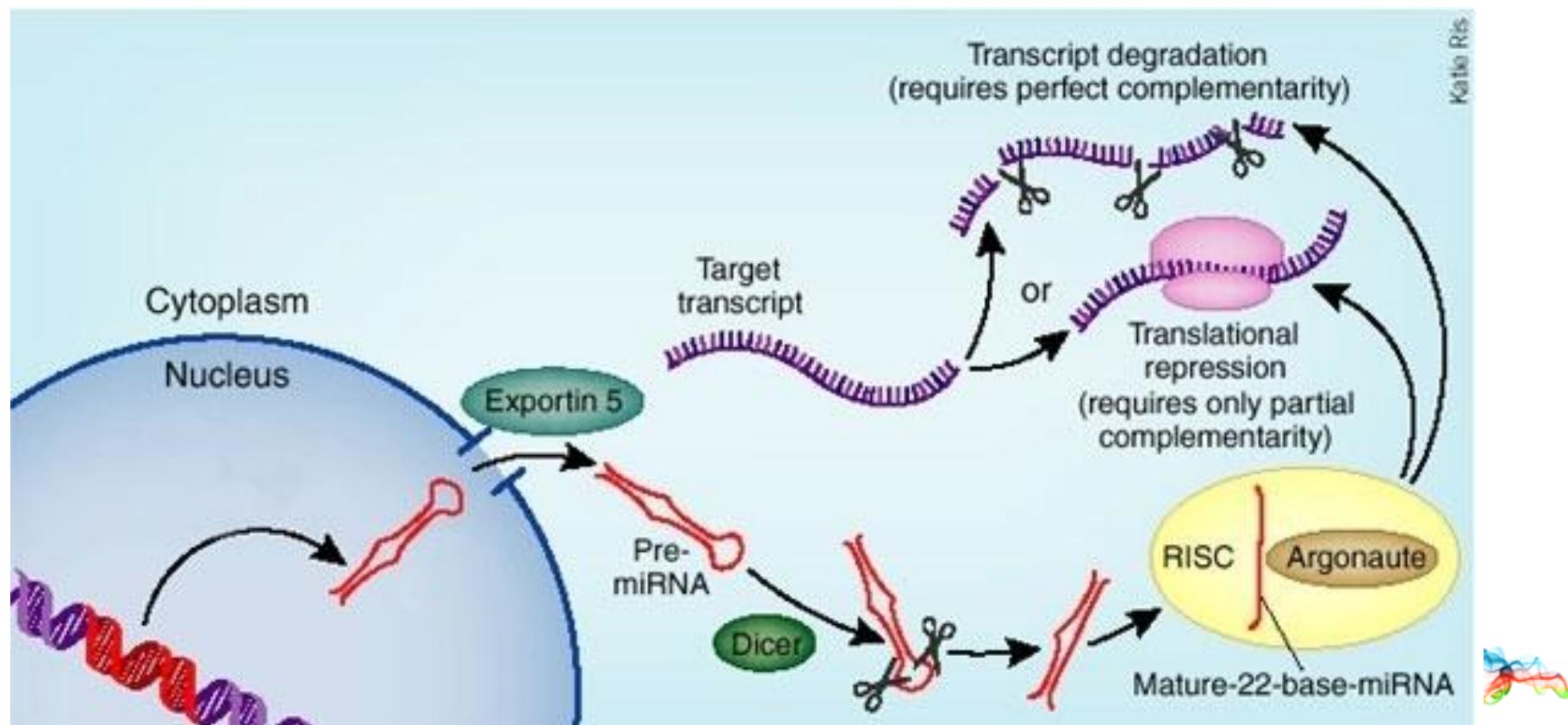
micro RNA - miRNA (20-22 nucleotidi)

Svolgono funzioni di regolazione genica

Si trovano normalmente negli eucarioti

Funzionano come RNA antisenso, riconoscono **in parte o completamente** l'RNAm del gene che deve essere silenziato

Due alternative: con appaiamento completo, l'RNAm viene degradato, con appaiamento parziale, il complesso mRNA-miRNA viene impedita la traduzione, ma il messaggero resta nel citoplasma potenzialmente attivo





White Biotechnology biotecnologie industriali

Biocarburanti

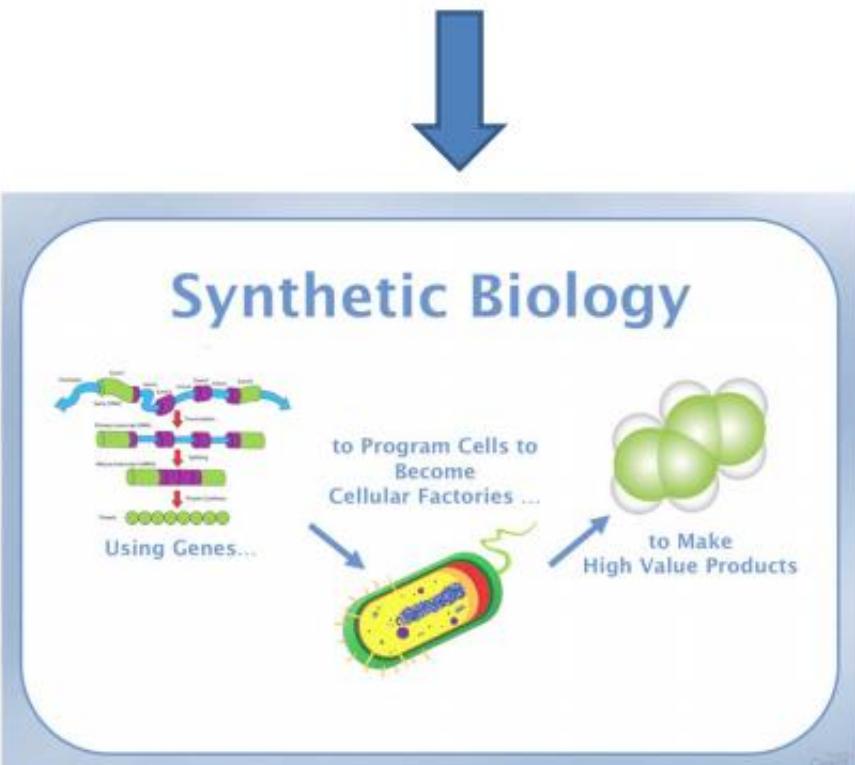
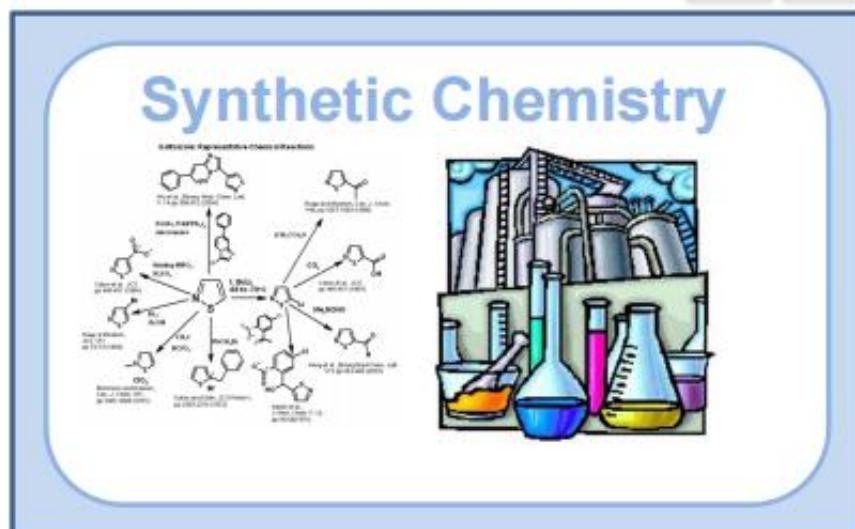


Sono fondate sul progresso delle conoscenze, a livello molecolare, della biologia degli organismi viventi e delle tecnologie (chimica, fisica, ingegneria, informatica)

Mirano a mettere a punto nuovi prodotti e nuovi processi produttivi che siano:

- A basso impatto ambientale,
- Sostitutivi degli attuali processi (modelli di sviluppo) che hanno portato/stanno portando a perdita della biodiversità, inquinamento, cambiamenti climatici, desertificazione, esaurimento delle risorse energetiche fossili, insufficienza di cibo
- In grado di rimediare ai danni ambientali causati soprattutto dall'uomo per una «chimica verde» sostituendo alla «sintesi chimica» di composti la loro «sintesi biologica»

La «Synthetic biology» mira a **sostituire gli attuali processi chimici di sintesi di composti utili con processi a basso impatto ambientale basati sull'uso (micro)organismi, piante ed enzimi**, per una «Chimica verde».

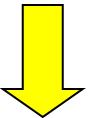


Piante come industrie chimiche di biocarburanti

Le piante possono essere usate per produrre carburanti, oli, lubrificanti, plastiche

Buoni risultati sono già raggiunti, per esempio con il biodiesel e il bioetanolo (da barbabietole o canna da zucchero)

Le attuali tecnologie utilizzano una porzione relativamente limitata della biomassa prodotta. Ci vuole circa un ettaro coltivato a soia o a colza per estrarre una tonnellata di biodiesel, per il bioetanolo da un ettaro coltivato a barbabietola, mais o altro cereale si ottengono 3-4 tonnellate



1. trovare soluzioni più efficienti, sfruttare integralmente le biomasse, compresa la componente ligneo-cellulosica, come per esempio i residui di paglia
2. migliorare le piante per ottenere una maggior produzione e, al contempo, un minor consumo di acqua e fertilizzanti



Green Biotechnology

riferite all'agricoltura, ai fertilizzanti naturali



Piante resistenti ai parassiti: il mais Bt

Piante resistenti agli erbicidi

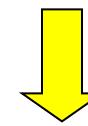
Il golden rice





Mais attaccato dalla piralide

1. l'insetto arreca danni alla pianta
2. nei semi danneggiati si sviluppa un fungo (*Aspergillus Flavus*), le cui tossine sono cancerogene
3. l'aflatossina si ritrova non solo nella farina, ma anche nel latte di mucche allevate con mais contaminato

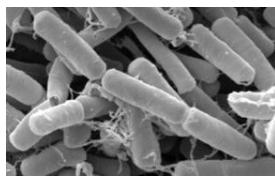
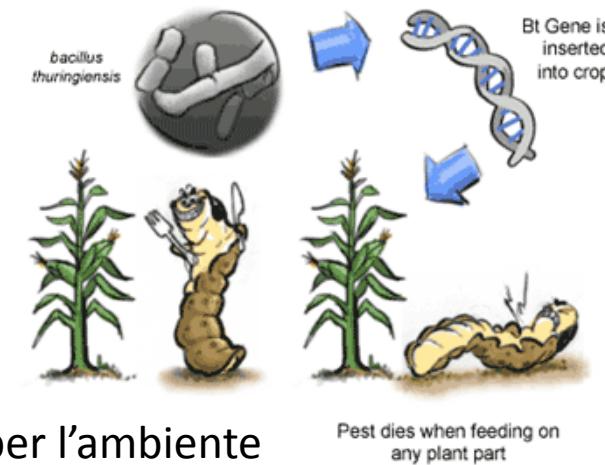


inserimento del biopesticida del
Bacillus thuringiensis:
il mais Bt



Vantaggi nell'uso del *Bacillus thuringiensis*

- 1) Pericoli trascurabili per l'uomo
- 2) Il batterio può essere usato fino al momento del raccolto
- 3) Gli insetti "utili" e insetti non-target non sono colpiti
- 4) Gli insetti (morti)che hanno ingerito il batterio
non sono considerati pericolosi per gli uccelli o altri animali
5. Non sono conosciuti effetti tossici del batterio sulle piante
su cui è applicato; il batterio non è considerato pericoloso per l'ambiente



PIANTE TRANSGENICHE CON LA TOSSINA BT



Impatto di queste strategie

- Riduzione della applicazione di pesticidi
- L'efficacia del trattamento è indipendente dalle condizioni climatiche. La proteina transgenica non può essere lavata via dalla pioggia
- Questo sistema di controllo è attivo per tutta la vita della pianta. Inoltre, se la tossina è espressa in tutte le parti della pianta sarà ingerita dall'insetto ogni volta che mangerà la pianta
- I soli insetti che vengono colpiti sono quelli che attaccano la pianta, perché la pianta è l'unica fonte di insetticida. Altri insetti presenti sul campo "benefici e non" non mangiando la pianta coltivata non sono colpiti dalla tossina.

Colza
Noce
Pioppo
Abete rosso
Mirtillo nero
Cotone
Pomodoro
Tabacco
Patata
Riso
Mais
Mela
Melanzana



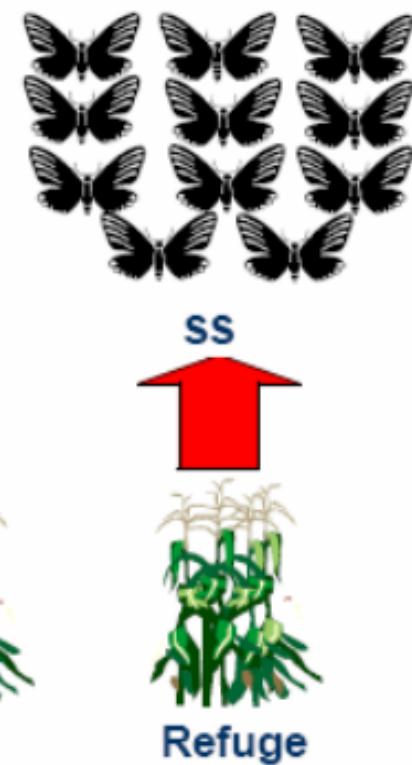
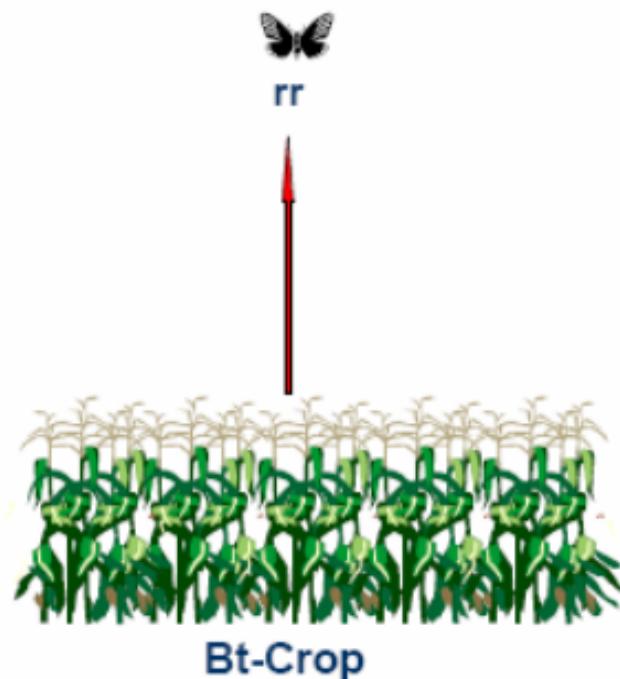
Per eliminare la possibilità che si sviluppino insetti resistenti ...

Strategia HIGH-DOSE REFUGE

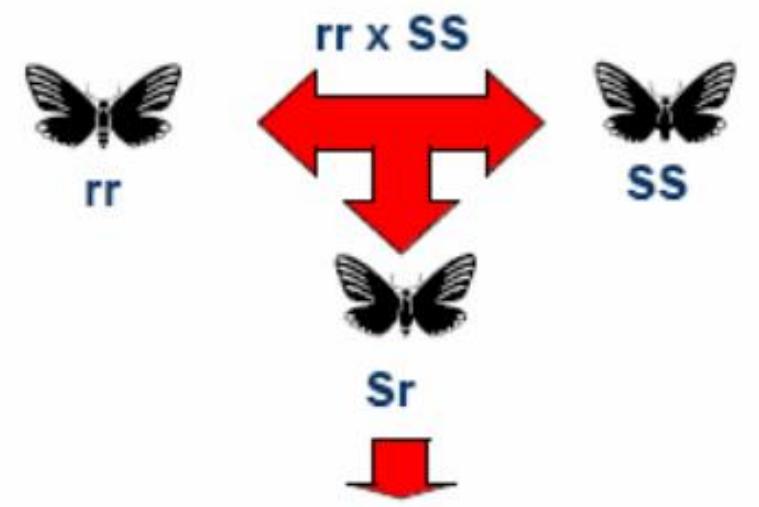
Accanto all'area coltivata con la varietà transgenica che produce un'alta dose di proteina Bt, vengono create "aree rifugio" coltivate con varietà non transgeniche.

Solo insetti rr resistenti omozigoti (molto rari) possono tollerare elevati livelli di Bt.

Nelle zone rifugio si sviluppano insetti suscettibili



Gli insetti resistenti (rr) incrociandosi con insetti suscettibili nelle zone rifugio daranno una progenie rS suscettibile che non può sopravvivere nelle aree coltivate a mais Bt

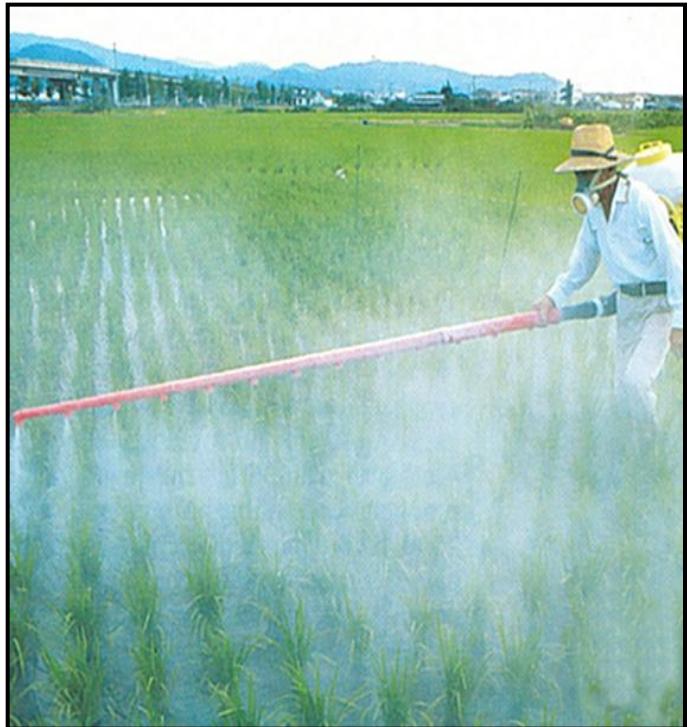


Campo sperimentale dove di coltiva mais Bt e mais normale

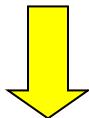
il mais normale è gravemente danneggiato dalla piralide



Piante resistenti agli erbicidi



1. Le piante infestanti competono con quelle utili per acqua, nutrienti e luce solare.
2. Possono ridurre del 70 per cento la resa potenziale di un campo.
3. Mescolate con il raccolto ne riducono il valore commerciale in misura significativa.
4. Possono costituire un accogliente habitat per gli agenti patogeni.
5. Erbicidi e coltivazione accurata controllano le piante infestanti. Ma un erbicida ha uno spettro di azione limitato: durante la stagione di crescita è necessario ricorrere a parecchi tipi di prodotti chimici.



LA BIOTECNOLOGIA permette di PRODURRE PIANTE CHE SIANO IN GRADO DI TOLLERARE L'ESPOSIZIONE A UN UNICO ERBICIDA AD AMPIO RAGGIO, SICURO PER L'AMBIENTE





Pianta di cotone
resistente agli
erbicidi

Pianta di cotone
“normale”





STOP!



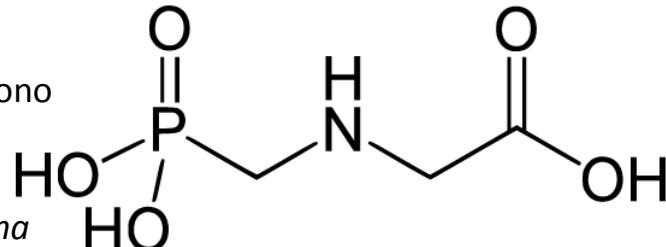
GLIFOSATO

Il glifosato è un erbicida sistematico ad ampio spettro, non selettivo
E' l'erbicida più diffuso al mondo (25% del mercato mondiale) ed attualmente il prodotto più venduto in Italia

- E' letale per tutti i tipi di piante, incluse annuali, perenni e alberi
- L'erbicida è assorbito attraverso le foglie e i tessuti giovani del fusto e trasportato in tutta la pianta
- Non è assorbito dalle radici e viene degradato nel terreno
- Ha una scarsa penetrazione verticale nel terreno, cioè non "affonda", fermandosi in genere intorno ai venti centimetri di profondità. Questo limita, anche se non elimina, la possibilità che raggiunga le falde acquifere.

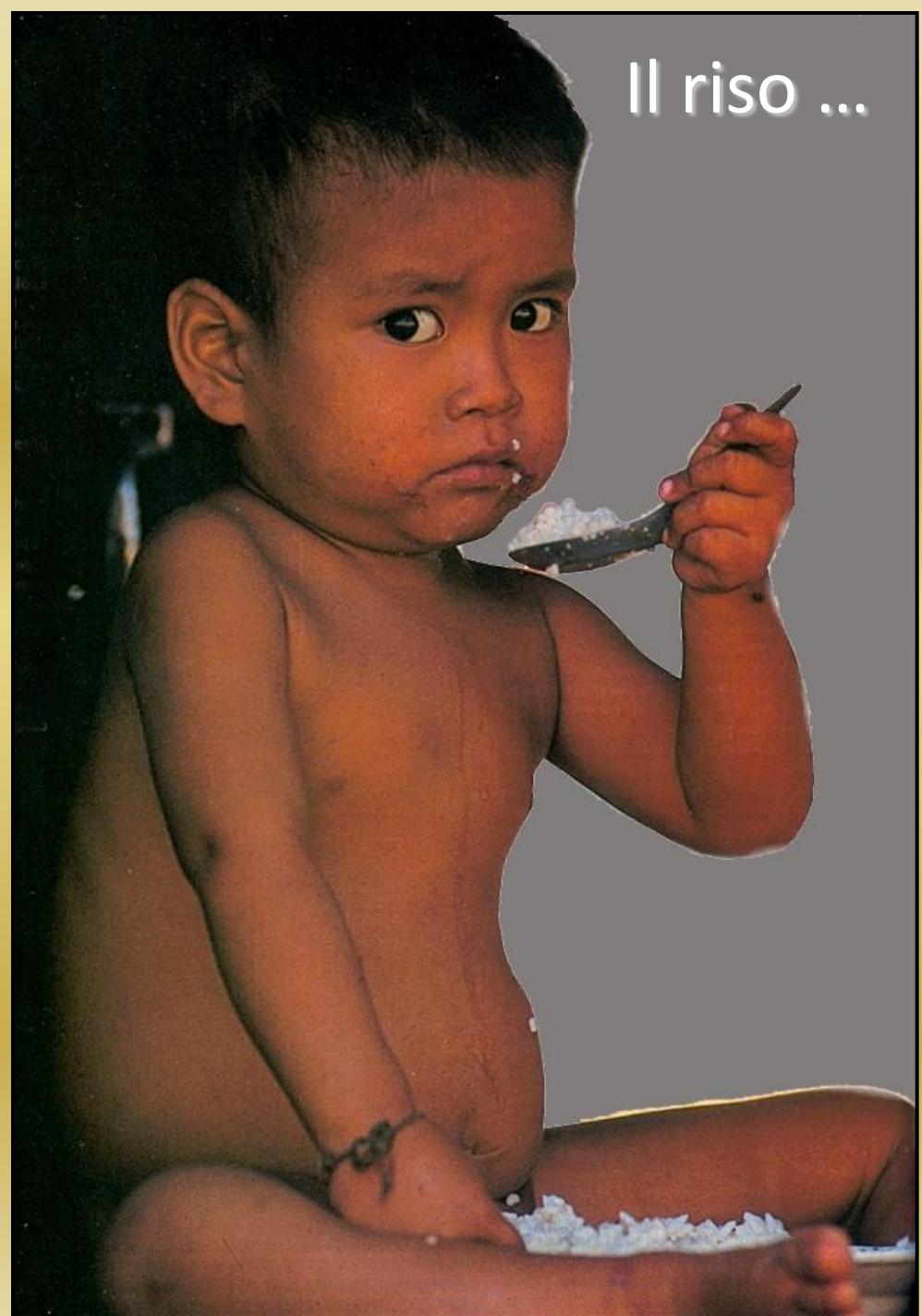
*probabilmente perché "è più che possibile che sia cancerogeno, ma non ci sono abbastanza prove per sostenere che lo sia"

Il glifosato è un analogo aminofosforico della glicina

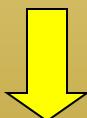


Il glifosato è l'erbicida più diffuso al mondo, considerato «probabilmente * cancerogeno» dall'Agenzia internazionale per la ricerca sul cancro dell'Oms «probabilmente non cancerogeno» dall'Agenzia europea per la sicurezza alimentare .

Il riso ...



base dell'alimentazione di tre miliardi di persone
sfrutta più dell'11 per cento del suolo produttivo sulla Terra
incide sulle risorse idriche mondiali
è coinvolto nel riscaldamento globale
è responsabile dell'uso eccessivo di pesticidi



golden rice
green super rice



Il *golden rice*, il riso dorato geneticamente modificato, produce beta-carotene (il precursore della vitamina A) e ferro.

Ogni anno la carenza di vitamina A causa, secondo l'Unicef, almeno 500.000 casi di cecità infantile e, sempre fra i bambini, 1-2 milioni di decessi per patologie correlate.

Inoltre, anche la carenza di ferro incide pesantemente sullo stato di salute di buona parte del mondo.

Attualmente, i cultivar producono in media 0,16 milligrammi di beta-carotene per 100 grammi di riso
Ci sono le premesse per sperare che 200 grammi di riso modificato possano fornire la dose giornaliera raccomandata.



Golden rice (destra) a confronto con riso bianco



Le ricerche attuali puntano a individuare i geni chiave per poter migliorare il riso.

Il loro obiettivo è produrre il *green super rice*, una varietà che presenta i seguenti vantaggi:

- aumento di produzione
- miglioramento qualitativo da un punto di vista nutrizionale
- tolleranze multiple a insetti e malattie
- maggior efficienza nell'utilizzo di nutrienti in modo da diminuire l'uso di fertilizzanti quali azoto e fosforo
- resistenza alla siccità e minor consumo di acqua per la coltivazione



Blue Biotechnology

Riguarda l'utilizzo delle risorse marine allo scopo di: migliorare le conoscenze in ambito produttivo ed ecologico, potenziando la produzione di alimenti derivati e la loro salubrità; proporre nuove soluzioni per il controllo della proliferazione di organismi acquatici dannosi per l'uomo e l'ambiente; ricercare nuove molecole con potenzialità farmaceutiche



Grey Biotechnology



Depurazione dagli inquinanti

Tutte le applicazioni direttamente correlate all'ambiente.

Suddivise in due gruppi: salvaguardia della biodiversità e protezione dai contaminanti.

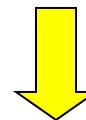
Il primo gruppo comprende le applicazioni della biologia molecolare alle analisi di genetica di quelle popolazioni e specie animali che fanno parte dell'ecosistema;

Nel secondo gruppo rientrano le biotecnologie ambientali che utilizzano microorganismi e piante in grado di isolare e rimuovere dall'ambiente le sostanze ritenute inquinanti come per esempio metalli pesanti e idrocarburi.



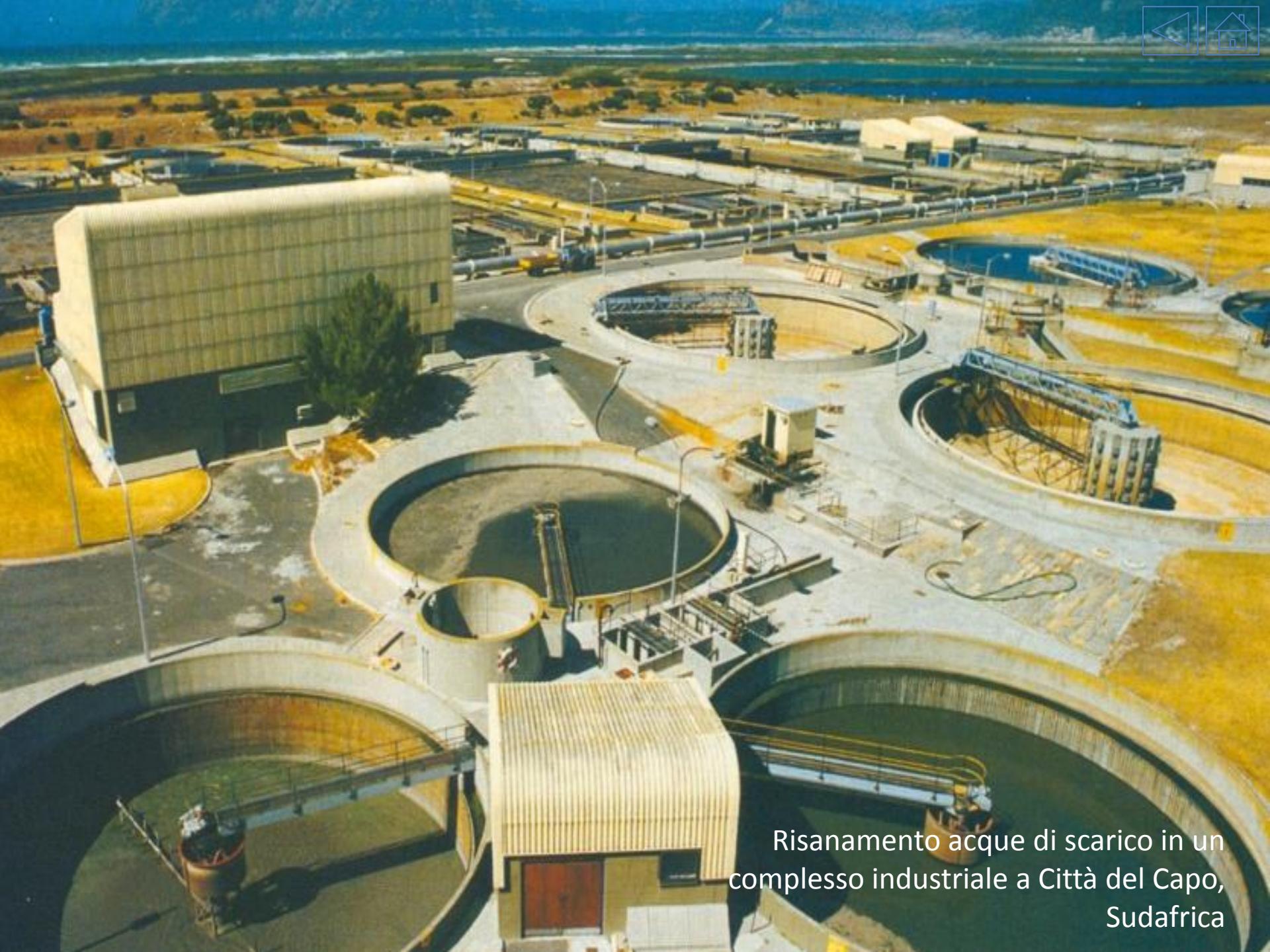
La Exxon Valdez: 200.000 barili di petrolio sversati al largo dell'Alaska, marzo 1989

Lo sviluppo della società umana ha prodotto il rilascio nell'ambiente di grandi quantità di solventi, fertilizzanti, pesticidi, materie plastiche, metalli pesanti, composti di sintesi ...



- I microrganismi hanno un'enorme capacità naturale di degradare una vasta gamma di composti organici**
- E' possibile inoltre costruire in laboratorio ceppi microbici ricombinanti con nuove capacità degradative ricorrendo alle tecniche dell'ingegneria genetica o alla donazione naturale di nuova informazione genetica in popolazioni microbiche miste mediante plasmidi**





Risanamento acque di scarico in un
complesso industriale a Città del Capo,
Sudafrica

Inghilterra: fiume contaminato da petrolio





Biotechnology

DNA called
disorders monoclonal hormones
used pests substances processes substance
substance soybeans hormones
organisms specially insert fields solution antibodies qualities
medicine inserted United
industrial technological Hybrids
processes States
also bacteria altered
created prolonged extract genes
inserting living process similarly animal
medically drugs includes common many nucleic treat
manufacture oil development
foods
genetic cells manipulation
normal technique waste material interferon
slicks experimental applications
increased manipulation plant
technique useful antibody-producing
waste material interferon applications
experimental antibody-producing
engineering break pharmacology
pharming splicing laboratory technology
mass plant problem
made Livestock techniques
exploitation example
category growth
desired shelf

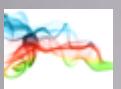
attempts quantities systems field
now corn large products
way acid agriculture grown general

diseases

ORGANISMI GENETICAMENTE MODIFICATI



una risorsa per il futuro





«Noi fisici nucleari abbiamo vissuto con sofferenza il contrasto tra la bellezza della scoperta e le preoccupazioni per le sue conseguenze. (...)»

I biologi dovrebbero approfittare della dolorosa esperienza dei fisici: da un lato l'uomo ha il diritto di conoscere, dall'altro deve tenere conto delle delicate questioni che il sapere solleva.»

Carlo Rubbia



- [▶] Da dove provengono i geni inseriti negli OGM?**
- [▶] Gli OGM sono dannosi per la salute?**
- [▶] Se una persona mangia OGM, il suo DNA muta?**
- [▶] Gli OGM possono provocare allergie?**
- [▶] Gli OGM possono diffondere resistenze agli antibiotici rendendo più difficile la cura delle malattie?**
- [▶] Gli OGM sono invasivi? Possono diventare piante superinfestanti?**
- [▶] Come si possono contenere i rischi legati alla contaminazione ambientale?**
- [▶] Le piante che si auto-proteggono dai parassiti possono creare nuovi insetti resistenti agli insetticidi?**





Da dove provengono i geni inseriti negli OGM?

Il codice genetico è un linguaggio universale, quindi si possono in teoria usare tutti i geni presenti in natura.

Sempre più spesso si usano geni che provengono dalla specie a cui appartengono. Il gene viene estratto, modificato in modo da migliorarne o ridurne la funzione, e poi reinserito.

Quando si introduce un gene preso, ad esempio, da un pesce, non ha senso dire che si inserisce un pezzo di animale in un vegetale: una volta portato fuori dall' organismo di origine, questo frammento di DNA è solo una sostanza in grado di esprimere o meno una proteina.



Numerosi studi sono stati condotti sul tema della salute umana e animale, ma non sono stati evidenziati rischi.

Ricerche che ne avevano rilevati sono state poi smentite.

Prima di ricevere l'autorizzazione alla coltivazione e alla commercializzazione, gli OGM devono superare un elevato numero di test di sicurezza.

I test richiesti partono dallo studio della nuova proteina prodotta dalla pianta transgenica.

Se la proteina non è tossica o allergenica, si passa a valutare la «sostanziale equivalenza» della pianta transgenica nei confronti di piante analoghe non transgeniche.

Tutte le analisi devono essere sostenute prima dell'approvazione della varietà OGM.



Se una persona mangia OGM, il suo DNA muta?

Ogni giorno ingeriamo una certa quantità di DNA contenuta negli alimenti (circa 1 grammo).

Durante la digestione, il DNA viene ridotto in piccoli frammenti, in genere minori di 400 paia di basi.

In alcuni esperimenti sui ratti si è osservato che una piccola parte del DNA così frammentato (inferiore allo 0,1 %) può essere assorbita dalle cellule dell'intestino, ma dopo qualche ora viene comunque degradata.

Nel caso di alimenti derivati da OGM, il processo di assimilazione segue lo stesso percorso e anche in una dieta a base di soli cibi geneticamente modificati rappresenterebbe meno di 1/200.000 del DNA totale ingerito.



Gli OGM possono provocare allergie?

Gli OGM sono molto sicuri perché, prima che ne venga autorizzata la vendita, sono sottoposti ad accurati controlli, tra i quali test per verificarne la potenziale allergenicità.

Questo controllo è obbligatorio anche se la proteina responsabile della reazione allergica rappresenta meno dell'1% delle proteine totali contenute nell'alimento (soglia sotto la quale l'allergene non viene avvertito come tale dall'organismo).

I prodotti autorizzati vengono monitorati per almeno tre anni negli Stati Uniti e per tutta la durata dell'autorizzazione in Europa.



Gli OGM possono diffondere resistenze agli antibiotici rendendo più difficile la cura delle malattie?

Alcuni OGM contengono un gene per la resistenza a un antibiotico (90% alla canamicina, 10% ampicillina e igromicina)

Sono geni sono molto diffusi tra i microrganismi presenti naturalmente nei suoli.

Canamicina e igromicina non sono utilizzati in medicina

L'ampicillina è ancora usata, sebbene il suo impiego sia in declino a causa delle diffuse resistenze naturali

La probabilità che un agente patogeno per l'uomo acquisisca il gene di resistenza dai batteri già presenti nell'intestino o nel suolo è di gran lunga superiore alla possibilità che lo acquisisca da alimenti ricavati da piante transgeniche.

Nel caso in cui ciò dovesse avvenire, non si tratterebbe di resistenze ad antibiotici utilizzati comunemente in terapia.





Gli OGM sono invasivi? Possono diventare piante superinfestanti?

Numerose ricerche sull'impatto ambientale dimostrano che gli OGM non sono di per sé invasivi.

Tutti i Paesi nei quali la ricerca è sviluppata esercitano un controllo su di essa e sulle sue applicazioni industriali.

Tutti i vegetali oggi in commercio sono stati modificati geneticamente dall'uomo in modo estensivo nel corso di una pratica agricola millenaria.

Nel miglioramento genetico classico si attua un incrocio in cui si mescolano migliaia di geni provenienti da varietà diverse, e si opera al buio, in quanto è impensabile conoscere nel dettaglio lo stato di tutti questi geni, al contrario di quando se ne inserisce uno solo (che è stato studiato in tutti i suoi particolari).

Il trasferimento a organismi viventi di uno o di alcuni geni conosciuti comporta fondamentalmente meno rischi biologici rispetto alla selezione genetica tradizionale.



Come si possono contenere i rischi legati alla contaminazione ambientale?

Quando si lavora con i microrganismi, tutto avviene in vitro e all'interno di laboratori a tenuta stagna.

Il rischio diventa più concreto quando a diventare bioreattori sono animali o piante che hanno bisogno dell'ambiente naturale per svilupparsi.

E' possibile farle crescere in **ambienti confinati** (come una serra) oppure utilizzare **piante che producono polline sterile**.

E' possibile **usare piante a sessi separati**, e utilizzare a questo scopo solo piante femmine, che quindi non producono polline.

La strategia più innovativa prevede **l'inserimento del transgene non nel DNA nucleare, ma in quello del cloroplasto**. I cloroplasti vengono ereditati per via materna, perché il granulo di polline non ne contiene. Pertanto, se il transgene è inserito nel cloroplasto, vi è la sicurezza che non possa diffondersi attraverso il polline.



Le piante che si auto-proteggono dai parassiti possono creare nuovi insetti resistenti agli insetticidi?

Si teme, per esempio, che la diffusione del mais Bt possa indurre fenomeni di resistenza nella piralide.

Questo insetto però non si nutre esclusivamente di mais, ma anche di specie molto diverse.

Si coltivano varietà tradizionali di mais accanto a quelle geneticamente modificate resistenti

La resistenza alla tossina è un carattere recessivo. Poiché gli insetti resistenti provenienti dai campi di mais geneticamente modificato si accoppiano con individui normali, i discendenti saranno ancora sensibili alla tossina.





Biotechnology

DNA called
disorders hormones
monoclonal hormones
used pests
substances processes
substance substance
product manipulate
use recombinant
manipulate recombine
Plants bacterial cultured
insulin insulin
involved see
life cloned
resistance chronic
cloned chronic
therapy therapy
hybridomas hybridomas
processed States treatment
increased modified
slicks normal manipulation
technique waste material
experimental interferon applications
antibody-producing plant
engineering break pharmacology
pharming splicing laboratory
problem technology mass
made Livestock techniques
example exploitation
category growth
desired shelf

organisms specially insert fields solution antibodies qualities medicine inserted industrial technological Hybrids United

bacteria created extract genes living inserting process similarly animal studied common many nucleic includes produces medically drugs oil development foods

also altered prolonged manufacture

genetic cells

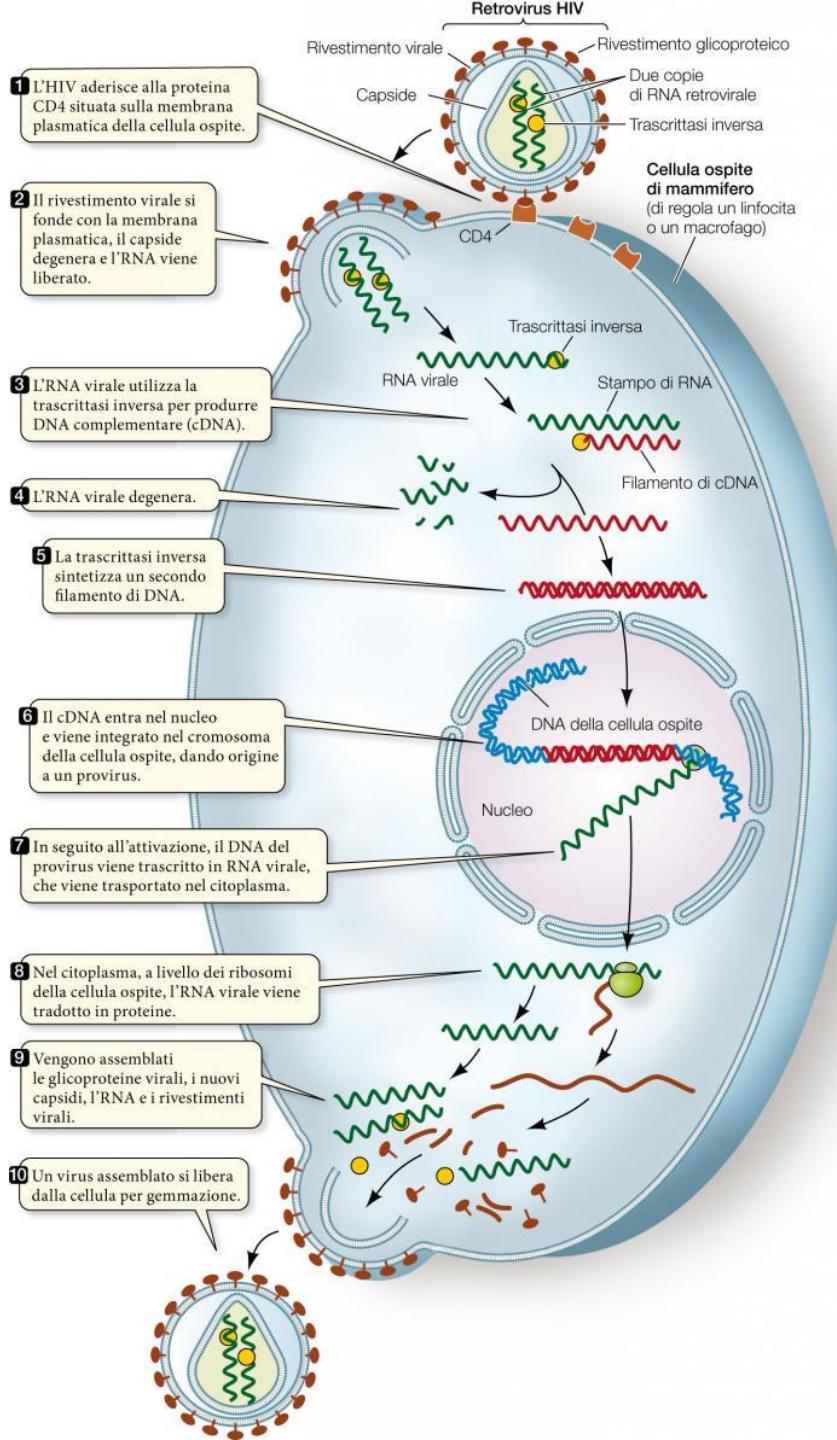
engineering gene cancer

biological attempts quantities systems field

large now corn products grown way acid agriculture

diseases

Virus HIV

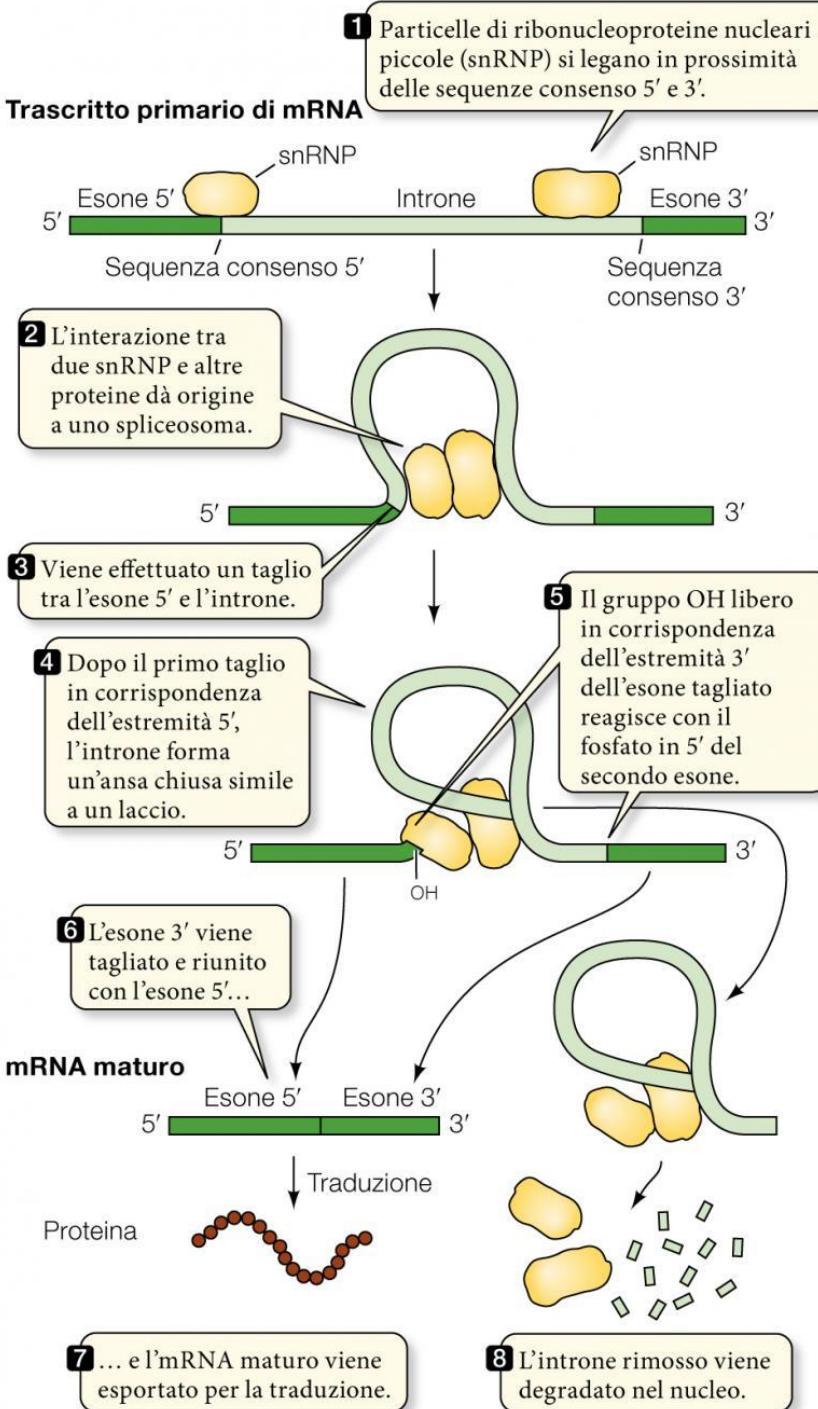




Splicing

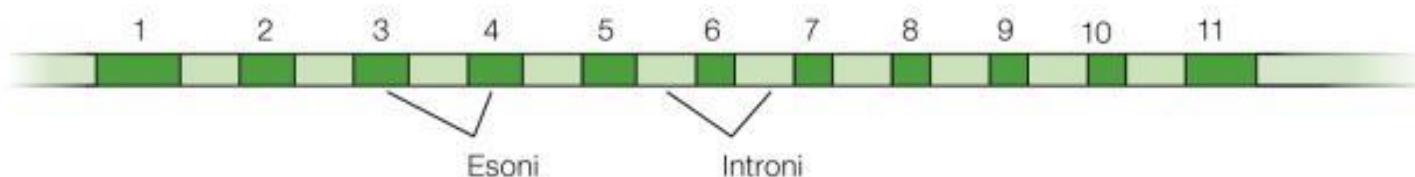
I geni degli eucarioti sono interrotti

INTRONI e ESONI



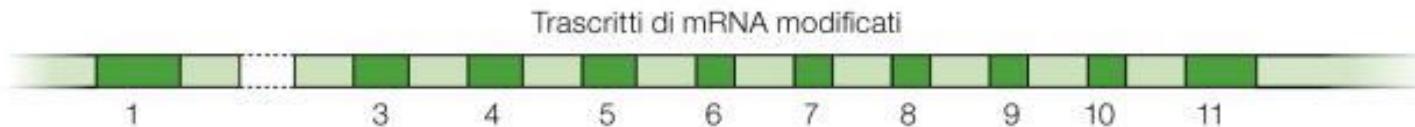
Splicing alternativo

Trascritto primario
di RNA per la
tropomiosina: 11 esoni

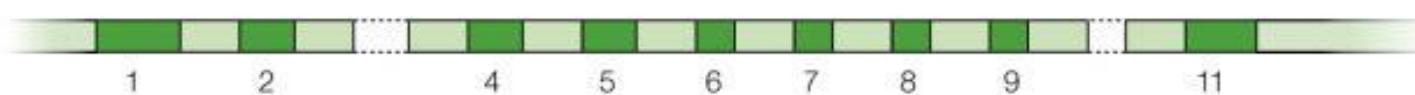


Diverse modalità di splicing nei vari tessuti danno origine
a una collezione esclusiva di esoni nell'mRNA di ciascun tessuto.

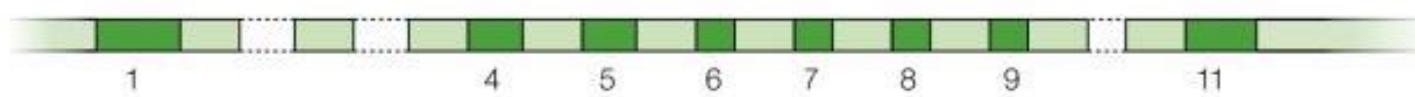
Muscolo scheletrico:
manca l'esone 2



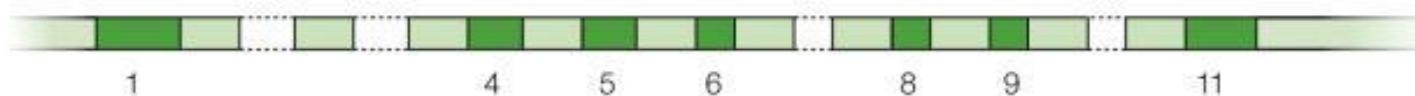
Muscolo liscio: mancano
gli esoni 3 e 10



Fibroblasti: mancano
gli esoni 2, 3 e 10



Fegato: mancano
gli esoni 2, 3, 7 e 10



Cervello: mancano
gli esoni 2, 3, 10 e 11

