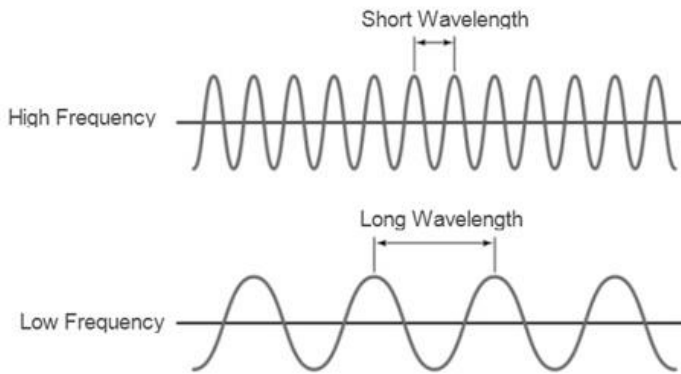
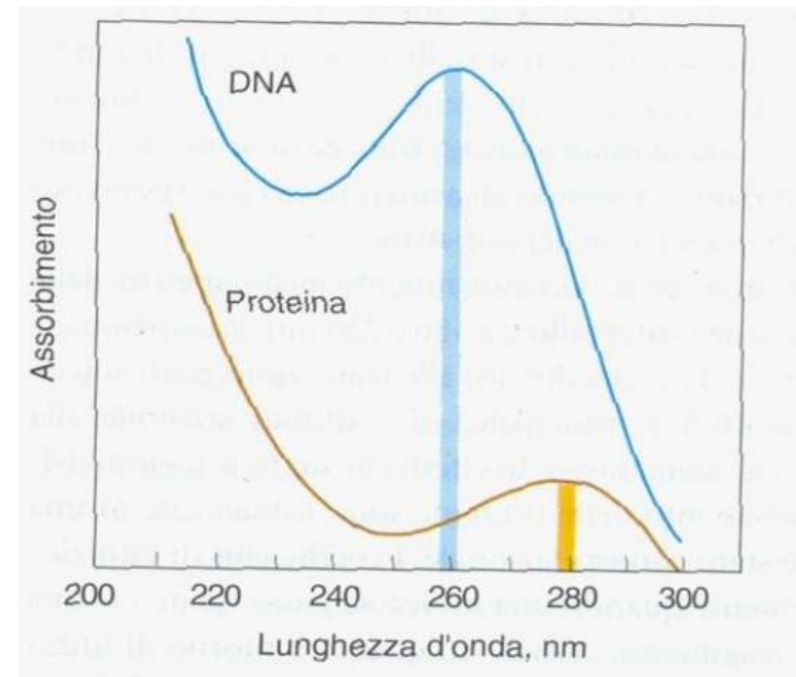


- La luce è una forma di radiazione elettromagnetica
- Le componenti dello spettro elettromagnetico sono caratterizzate da diverse **lunghezze d'onda (wavelength, si misura in nm)**.



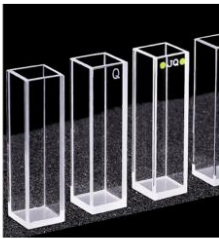
Le proteine e gli acidi nucleici assorbono la luce (280 e 260 nm).



Analisi di RNA e DNA: Assorbanza

Quantità di luce
assorbita (unità di misura OD-Densità
Ottica- dipende dalla **concentrazione**
dell'acido nucleico e dalla **lunghezza** del
percorso attraversato)

Quantità di luce
in entrata



Quantità di luce
in uscita



Cuvetta (contiene la soluzione di DNA)



spettrofotometro

- ❖ Concentrazione DNA doppio filamento (1 cm) (1 OD = 50 ug/ml a 260 nm)
- ❖ Concentrazione RNA (1 cm) (1 OD = 40 ug/ml a 260 nm)

Purezza (quantità di proteine contaminanti): Rapporto 260/280 dovrebbe essere circa 2 (se inferiore a 1,8 indica che la quantità di proteine contaminanti è troppo alta)

Assorbanza relativa a 260 nm

- DNA doppio filamento 1.00
- DNA singolo filamento 1.37
- Basi libere 1.67

Denaturazione del DNA

- È possibile seguire la denaturazione del DNA a 260 nm.
- Basi accoppiate ed impilate assorbono meno nell'UV di quelle "separate" - **effetto ipercromico**.
- La temperatura corrispondente a metà dell'aumento osservato nell' A_{260} è definita come "**temperatura di melting**", T_m o temperatura di fusione del DNA.
- **Il valore di T_m varia con il rapporto GC/AT** - un maggior contenuto di GC conduce ad una T_m più alta.
- Una maggior forza ionica fa aumentare T_m , limitando la repulsione elettrostatica tra fosfati

- DNA doppio filamento 1.00
- DNA singolo filamento 1.37
- Basi libere 1.67

Analisi del DNA: denaturazione e rinaturazione

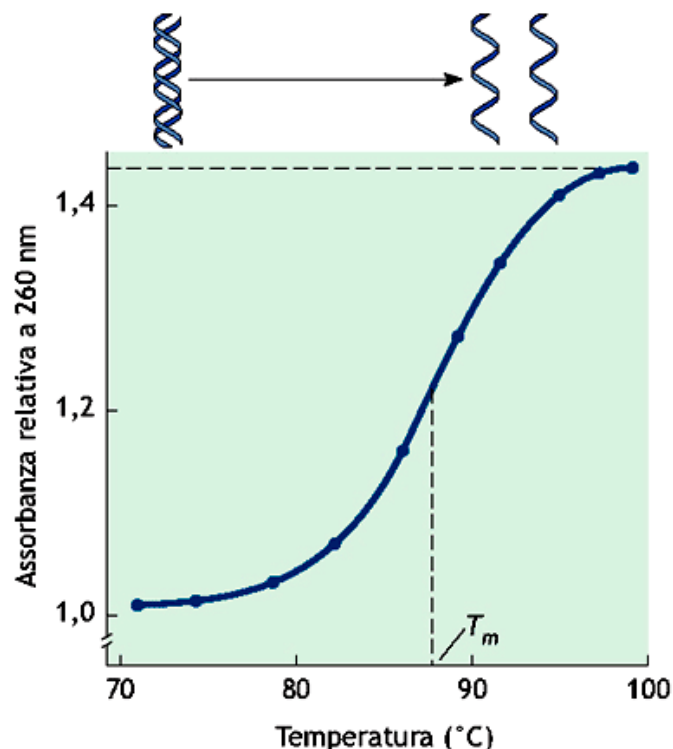


Figura 1.65 Profilo di denaturazione termica del DNA. Un DNA a doppia elica in soluzione (DNA nativo) presenterà un certo valore di assorbanza che aumenterà con l'aumentare della temperatura, delineando un andamento sigmoide (effetto catastrofico). La conversione da doppio a singolo filamento è parallela all'incremento dell'assorbimento della luce a 260 nm. Si definisce T_m il valore della temperatura alla quale si osserva il 50% di aumento dell'assorbanza.

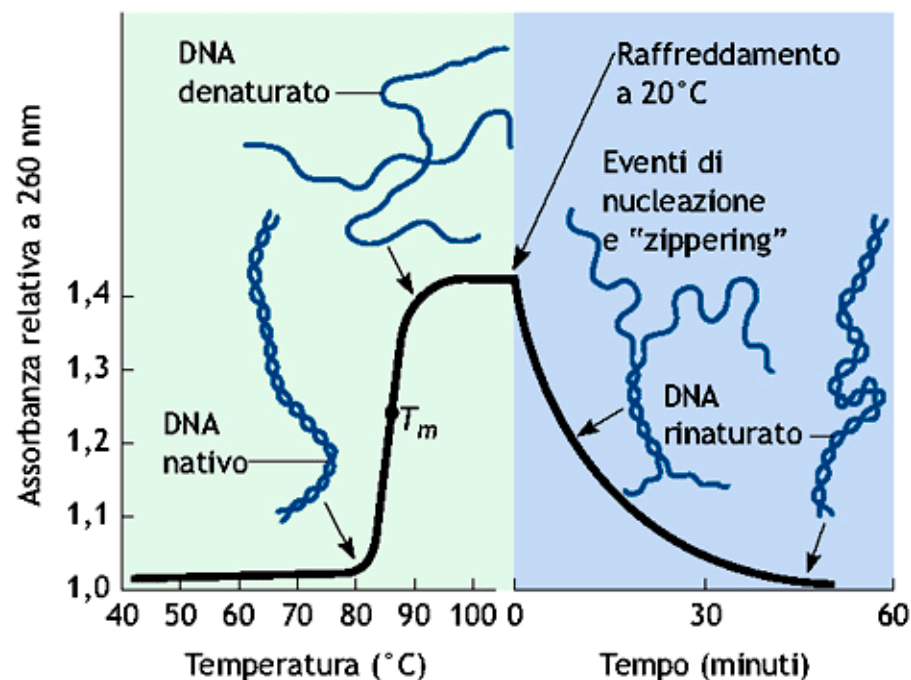


Figura 1.66 Denaturazione e rinaturazione del DNA. Riscaldando lentamente una soluzione di DNA nativo (a doppia elica), il DNA fonde, cioè le due eliche si separano. Quando la soluzione viene raffreddata si osserva una riassociazione delle due eliche con una cinetica che dipende dalla concentrazione iniziale del DNA e dalla sua lunghezza. I due filamenti si “urtano” e quando collidono tratti complementari c'è l'inizio della “nucleazione” e il successivo “zippering” delle basi complementari.

Sequenze ripetute si rinaturano più rapidamente rispetto a sequenze a sequenza unica

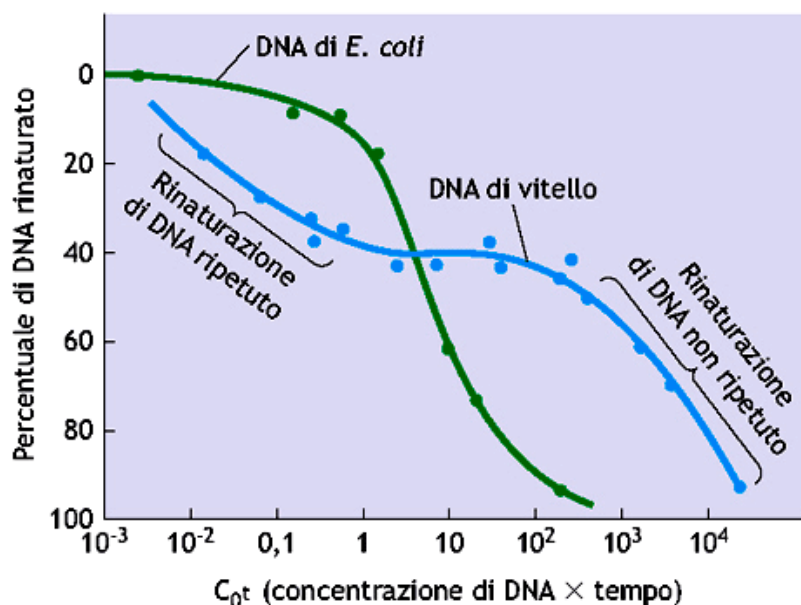


Figura 1.68 Curve di C_0t . Confronto fra le curve di rinaturazione di DNA estratto da cellule di vitello e di *E. coli*. La frazione che si rinatura rapidamente è quella costituita da sequenze ripetute.

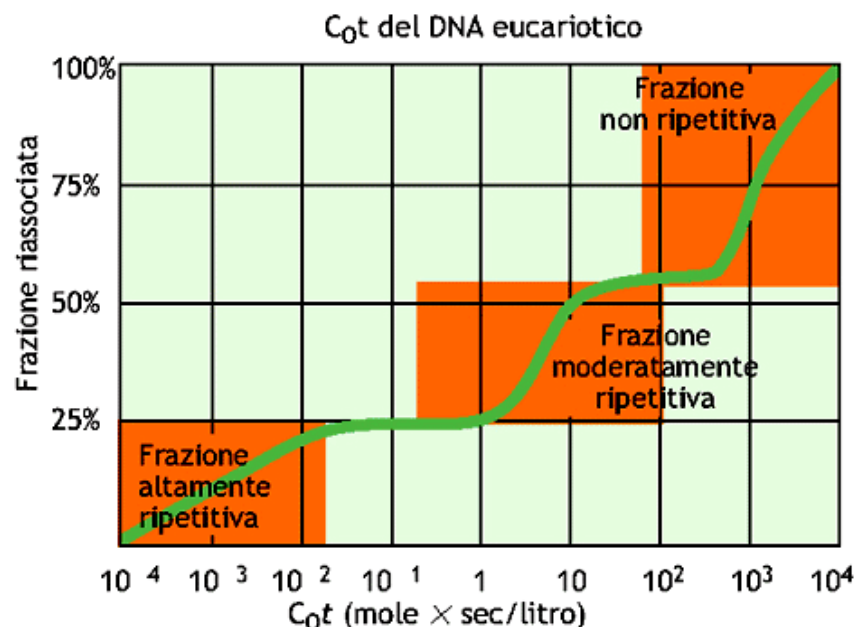
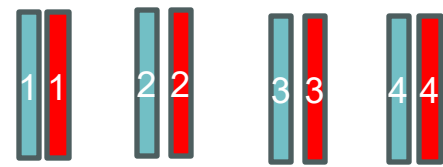


Figura 1.69 Curva di C_0t del DNA eucariotico. Circa il 25% del DNA eucariotico è costituito da sequenze altamente ripetute, il 30% da sequenze mediamente ripetute e la restante parte da DNA a singola copia.

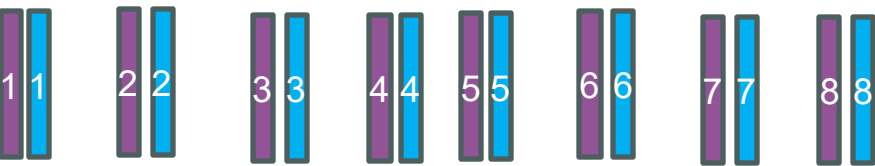
DNA A DOPPIA ELICA



DNA COPIA SINGOLA

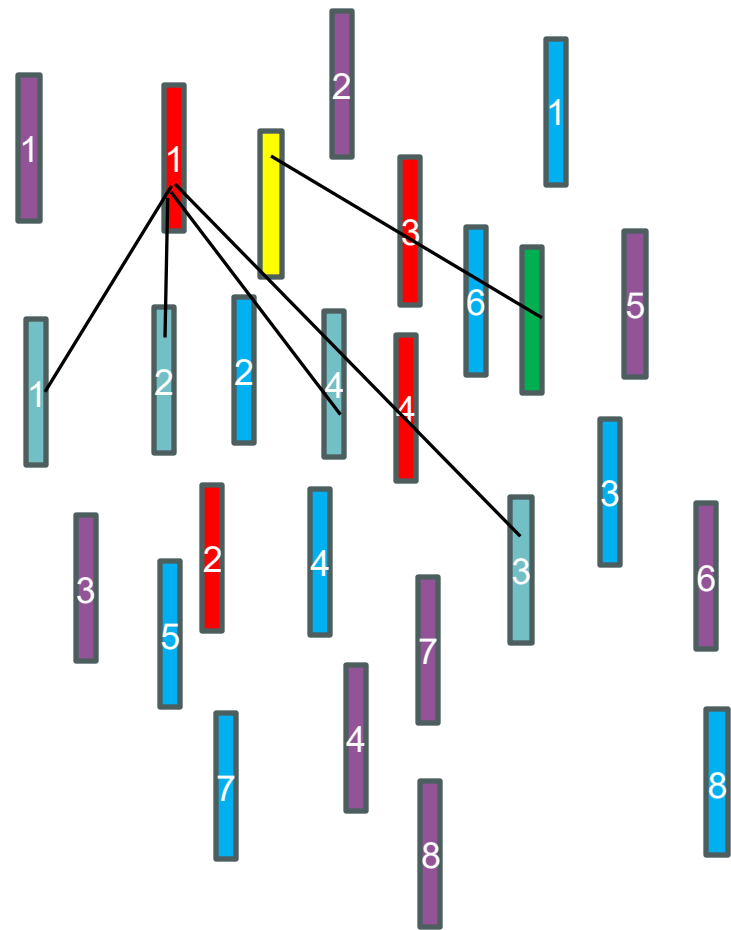


DNA MEDIAMENTE RIPETUTO



DNA ALTAMENTE RIPETUTO

DNA DENATURATO



Non c'è correlazione tra la complessità genetica/morfologica di un organismo e le dimensioni del suo genoma.

Prendendo in considerazione **le frazioni non ripetitive** dei genomi si ritrova la colinearità tra la complessità genomica e la complessità dell'organismo.

- **Grandezza e complessità** del genoma (contenuto globale di DNA di una cellula).
- **La grandezza del genoma (o valore c)** si riferisce alla **quantità totale di materiale genetico (DNA)** contenuta in una singola copia **aploide** del genoma di un organismo.
- **La complessità del genoma** si riferisce in parte alla **lunghezza totale di tutte le sequenze di DNA differenti presenti nel genoma**

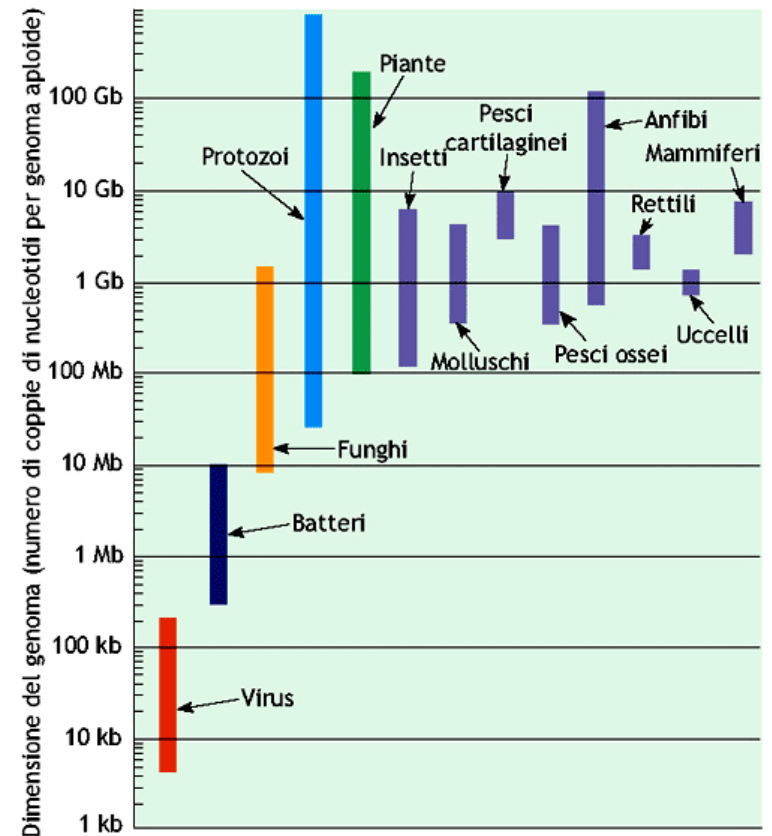


Figura 1.67 La dimensione del genoma. È evidente la grande variabilità che esiste quando si parla di dimensioni del genoma in organismi diversi. In viola sono mostrate le dimensioni del genoma aploide di vari gruppi appartenenti al regno animale.

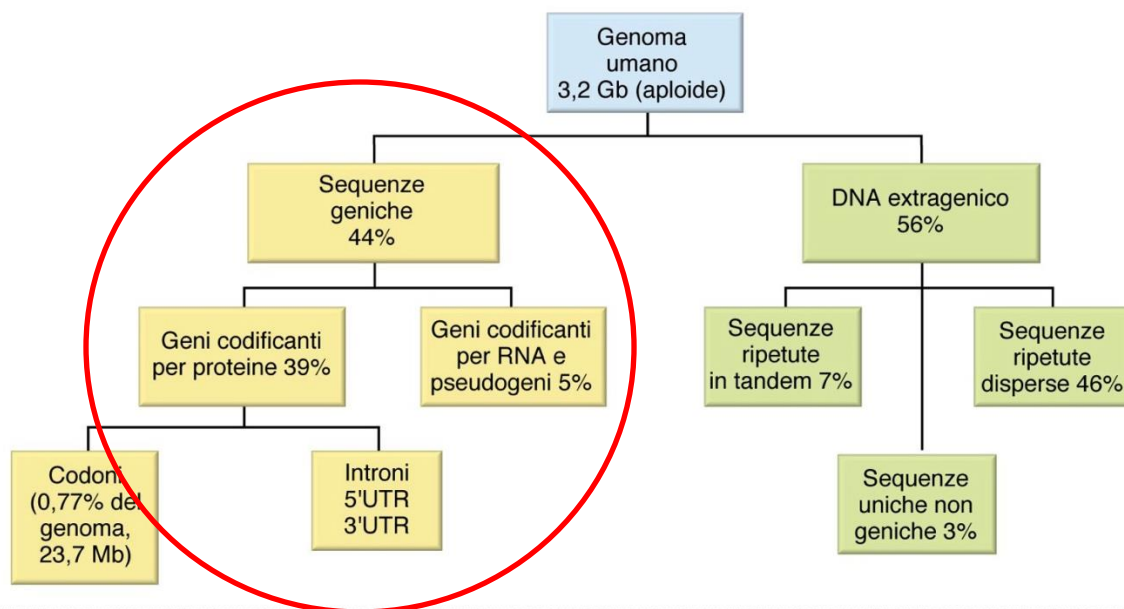


FIGURA 5.2 Organizzazione generale del genoma umano. Meno della metà (44%) del genoma umano forma prodotti maturi (RNA e proteine). Se consideriamo solo la porzione di genoma costituita dai codoni, meno dell'1% dell'intero DNA è codificante in senso stretto, cioè corrisponde a esoni (non ridondanti) codificanti per proteine. Altre sequenze geniche sono geni codificanti per RNA e pseudogeni, anche se questi non sempre vengono trascritti, quindi potrebbero essere considerati parte del DNA extragenico (vedi testo). Il DNA extragenico costituisce la maggioranza del genoma: si possono riconoscere nel genoma sequenze ripetute in tandem, sequenze ripetute disperse e sequenze uniche non geniche. Le percentuali sono indicative, poiché non tengono conto delle sovrapposizioni parziali di alcune sequenze nella stessa regione cromosomica. Inoltre, riflettono la continua scoperta e riclassificazione delle sequenze: si dice che una sequenza è “annotata” quando vengono registrate sulle principali banche dati le caratteristiche di tale sequenza e le informazioni note riguardanti il suo ruolo biologico, dimostrato o presunto. Esistono numerosi software che effettuano l'annotazione automatica del genoma, ovvero analizzano le sequenze di DNA per identificare sequenze trascritte. Occorre però un successivo lavoro sperimentale grazie al quale si possa dimostrare che una data sequenza è effettivamente trascritta (in un determinato tipo cellulare, durante una specifica fase di sviluppo, in condizioni fisiologiche o in presenza di una specifica patologia, in risposta a un determinato farmaco). Per questo, nelle principali banche dati (GENCODE o NCBI RefSeq) viene riportato lo stato di avanzamento della validazione di una determinata sequenza (es. in NCBI RefSeq per ogni sequenza annotata viene riportato il “RefSeq status”: una stessa sequenza nel tempo può essere classificata come MODEL, INFERRED, PREDICTED, PROVISIONAL, VALIDATED, REVIEWED).

Human Genome Project HGP (Progetto Genoma Umano)

Il **Progetto Genoma Umano (HGP)** è stato uno sforzo internazionale di ricerca scientifica iniziato formalmente nell'**ottobre 1990** e completato nel **2003**.

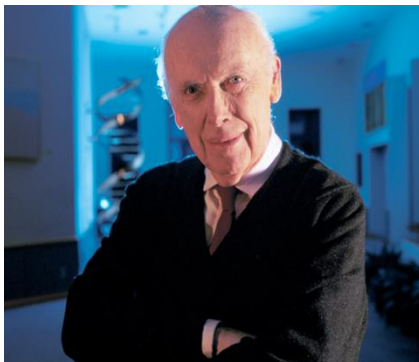
Gli **obiettivi principali** del progetto erano:

1.Determinare la Sequenza Completa: Mappare e sequenziare l'intero patrimonio genetico (genoma) dell'organismo umano.

2.Identificare i Geni: Scoprire e catalogare tutti i geni umani stimati (allora si stimavano tra i 20.000 e i 25.000 geni).

3.Rendere i Dati Accessibili: Rendere pubbliche e disponibili per ulteriori studi biologici tutte le informazioni genetiche raccolte.

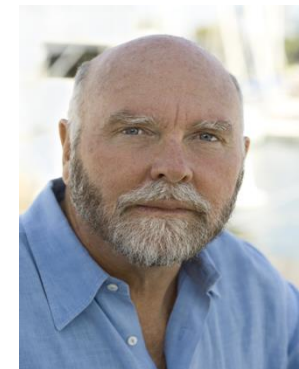
James Watson



Francis Collins
(National Institutes of Health)



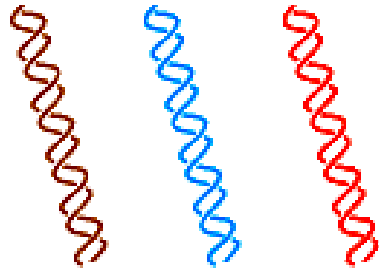
John Craig Venter (Celera)



Ibridazione degli acidi nucleici rende possibile trovare una sequenza specifica di DNA o RNA con grande accuratezza e sensibilità in base alla sua capacità di legarsi ad una sequenza complementare.

Ibridazione di acidi nucleici (DNA)

Miscela di molecole a doppio filamento di DNA cellulare totale

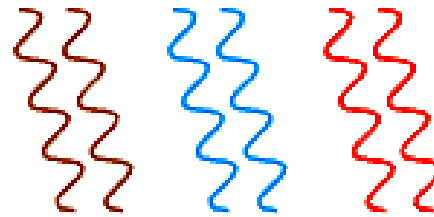


Quale frammento contiene la sequenza
5'-AATTGC-3'
3'-TTAACG-5'

Denaturazione a 95°C



Separazione dei filamenti



Aggiunta di una sonda radioattiva di DNA complementare ad una sequenza specifica di DNA cellulare



5-AATTGC-3



5-AATTGC-3

Rinaturazione a 65°C (in presenza di una specifica forza ionica)



Ibridazione della sonda radioattiva con sequenze complementari presenti nel DNA cellulari



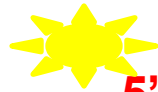
Ibridazione di acidi nucleici (RNA)

Miscela di molecole a
singolo filamento di
RNA
cellulare totale



Quale RNA
contiene
la sequenza?
5'-AATTGC-3'

Aggiunta di una
sonda radioattiva di
DNA
complementare ad
una sequenza
specifica di RNA
cellulare



5'-GCAATT-3'

65C



La marcatura radioattiva delle sonde

La sonda è uno specifico frammento di DNA, a sequenza nota, che si utilizza per individuare un frammento di DNA o gene di interesse in un pool di DNA totale.

La sonda per essere utile allo scopo deve essere marcata ad esempio con il fosforo radioattivo P^{32} .

Le sonde possono essere:

- corte (20-30 oligonucleotidi) (marcatura al 5' o al 3')
- lunghe (es. frammenti 2-3 kb) (marcatura tramite *nick translation*-)

La marcatura radioattiva delle sonde: sonde corte

22 oligo

5' - ACTTAGTAAGGCTTGGAACCTC - 3'

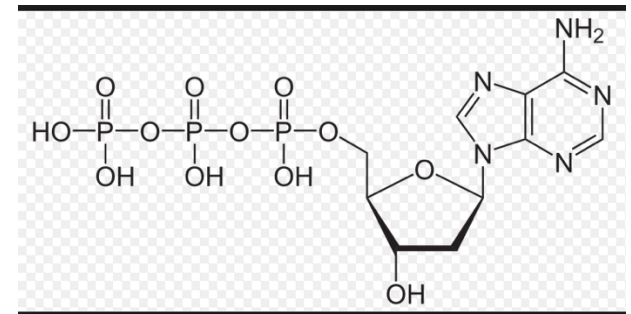
+

$\gamma^{32}\text{ATP} = \text{A } \alpha\text{P } \beta\text{P } \gamma^{32}\text{P}$

+

enzima: polinucleotide chinasi

=

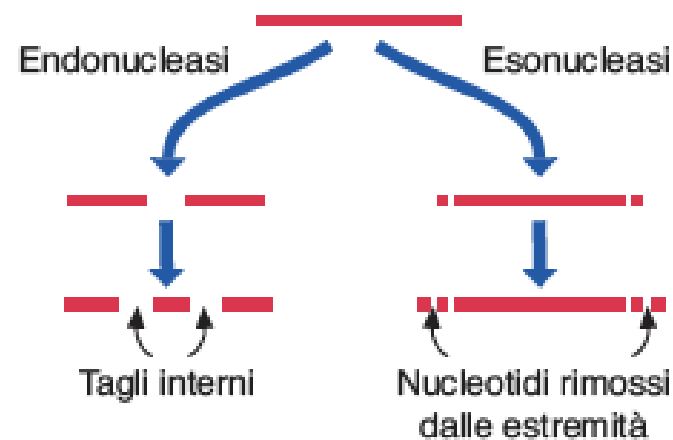


5' - $\gamma^{32}\text{P}$ ACTTAGTAAGGCTTGGAACCTC - 3' La sonda è marcata

A DNA polimerasi



B Nucleasi



C Ligasi

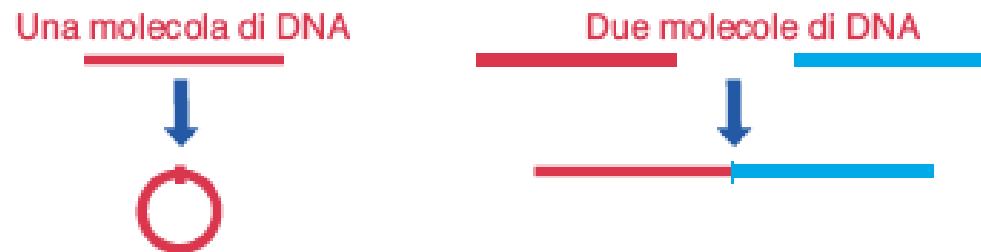
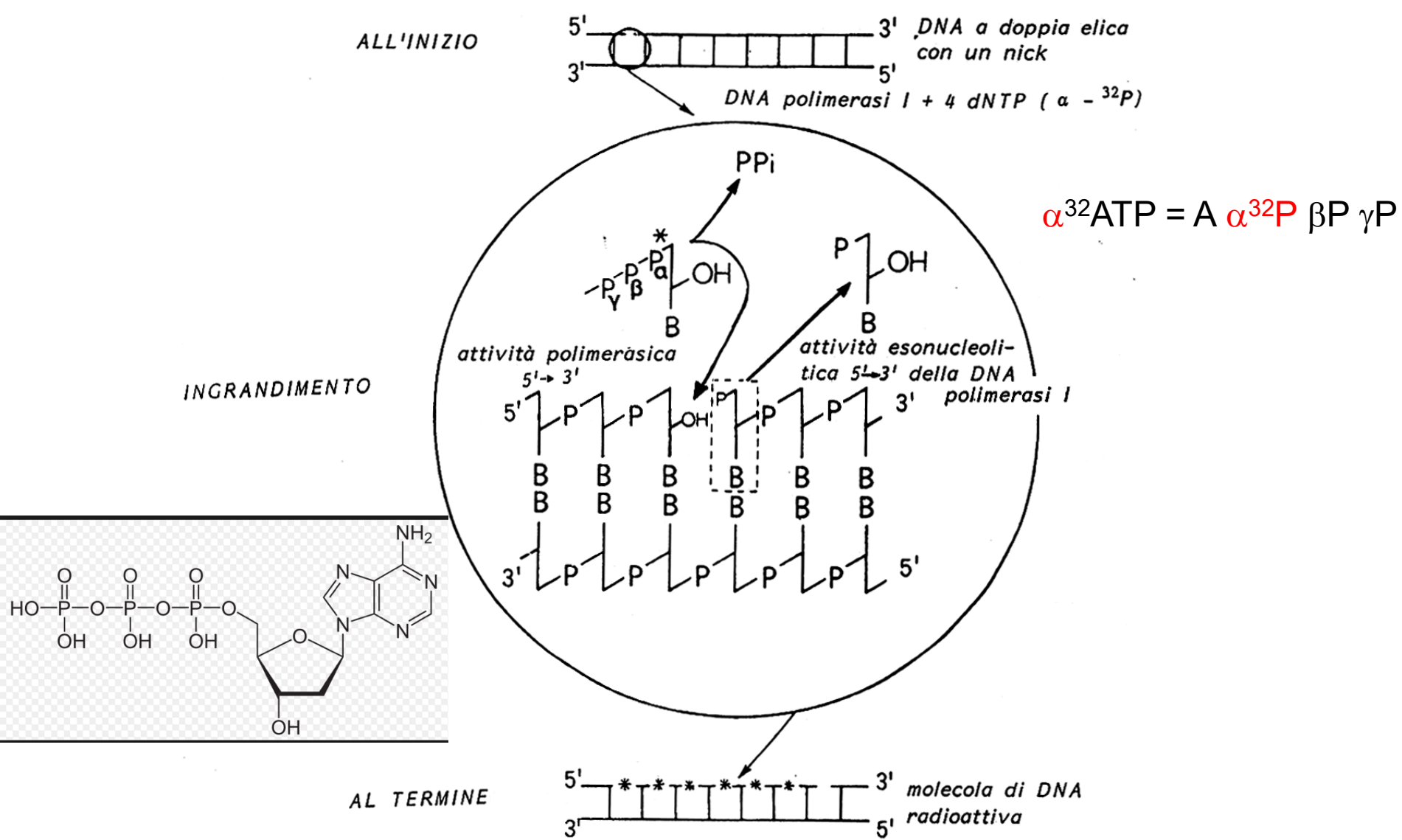


FIGURA 12.1 Attività delle DNA polimerasi (A), nucleasi (B) e ligasi (C).

La marcatura radioattiva delle sonde: sonde lunghe

La nick translation



Come identificare una sequenza specifica di DNA o RNA



Enzimi di restrizione: Taglio del DNA in siti specifici

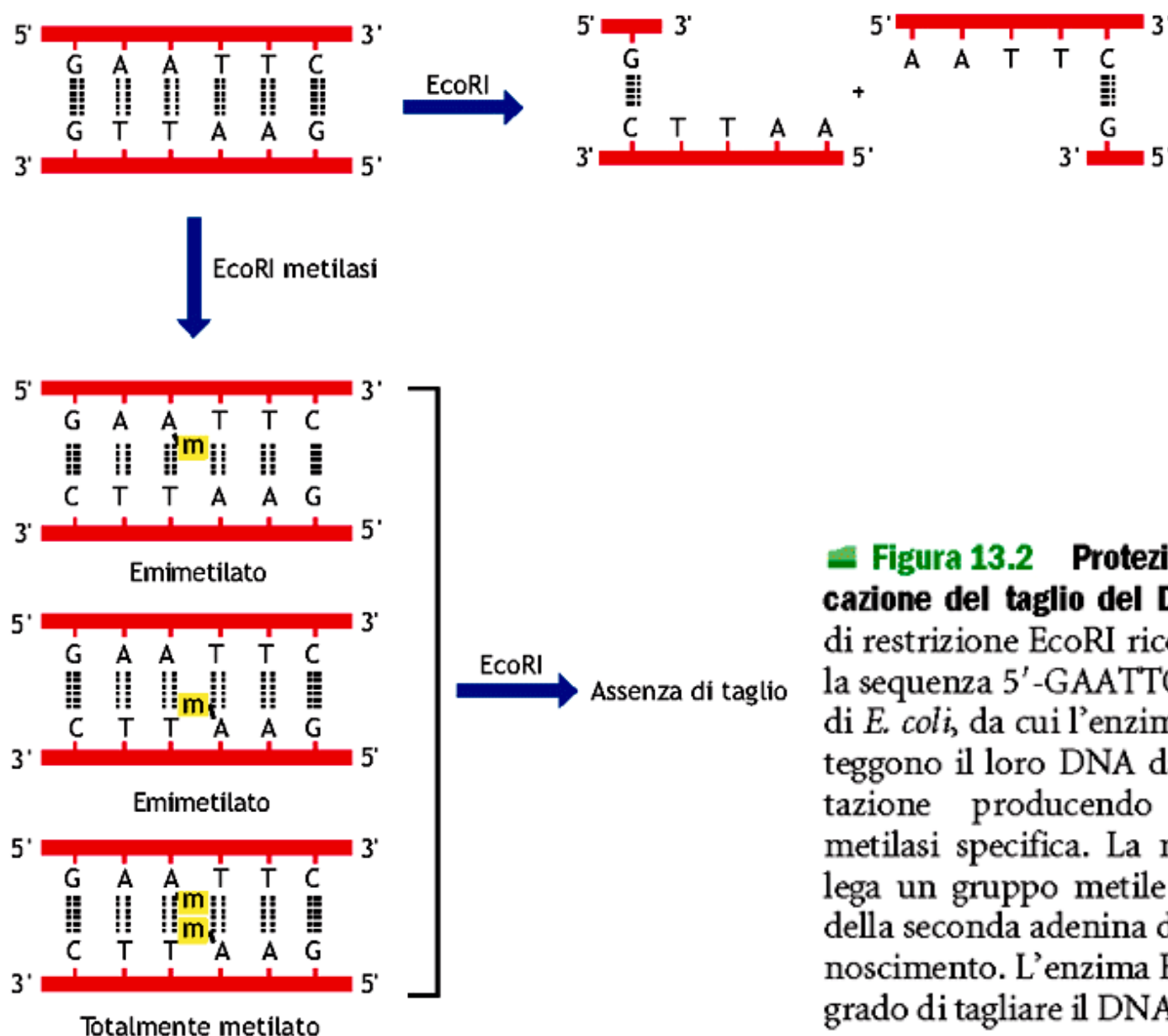


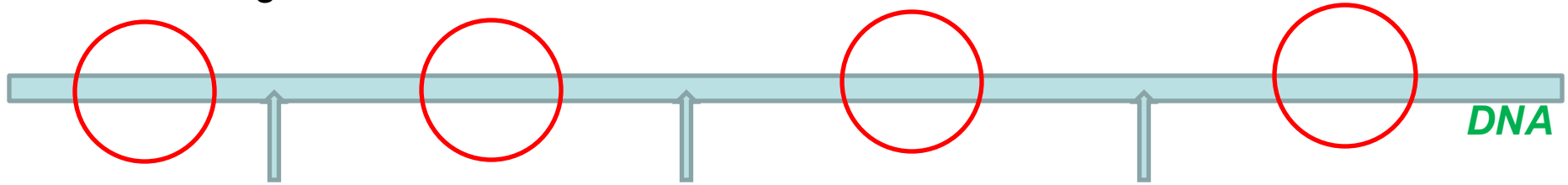
Figura 13.2 Protezione per modificazione del taglio del DNA. L'enzima di restrizione EcoRI riconosce e taglia la sequenza 5'-GAATTC-3'. I ceppi R di *E. coli*, da cui l'enzima deriva, proteggono il loro DNA dalla frammentazione producendo anche una metilasi specifica. La metilasi EcoRI lega un gruppo metile all'atomo N6 della seconda adenina del sito di riconoscimento. L'enzima EcoRI non è in grado di tagliare il DNA così metilato.



| Enzima | Sito di riconoscimento | Numero di basi | Estremità | Batterio |
|--------------|------------------------|----------------|------------|-------------------------------|
| <i>Sau3A</i> | /GATC | 4 | 5' adesive | <i>S. aureus</i> 3A |
| <i>AluI</i> | AG/CT | 4 | piatte | <i>A. luteus</i> |
| <i>EcoRI</i> | G/AATTC | 6 | 5' adesive | <i>E. coli</i> RY13 |
| <i>BamHI</i> | G/GATCC | 6 | 5' adesive | <i>B. amyloliquefaciens</i> H |
| <i>PstI</i> | CTGCA/G | 6 | 3' adesive | <i>P. stuartii</i> |
| <i>SmaI</i> | CCC/GGG | 6 | piatte | <i>S. marcescens</i> |
| <i>NotI</i> | GC/GGCCGC | 8 | 5' adesive | <i>N. otitidis-caviarum</i> |

TABELLA 12.2 Esempi di endonucleasi di restrizione.

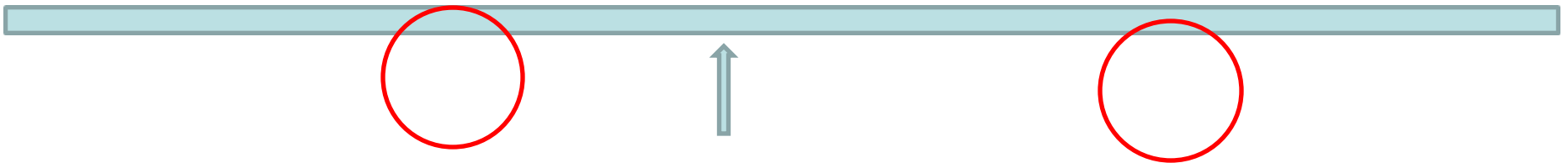
Enzima A taglia in 3 siti si formano 4 frammenti



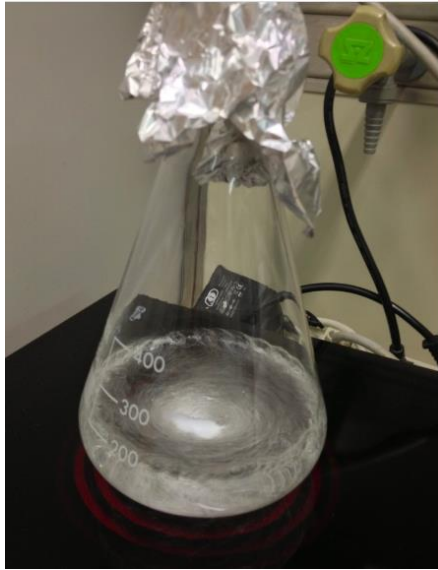
Enzima B taglia in due siti si formano 3 frammenti più grandi



Enzima C taglia in un sito si formano 2 frammenti



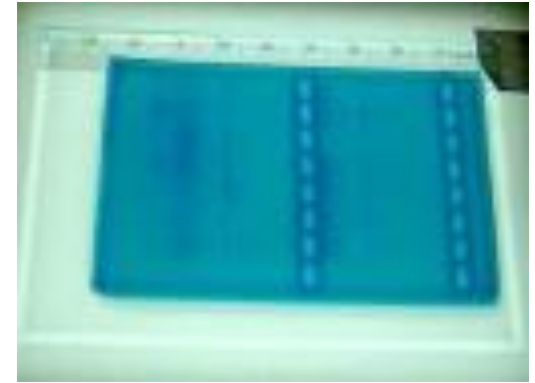
1) Elettroforesi



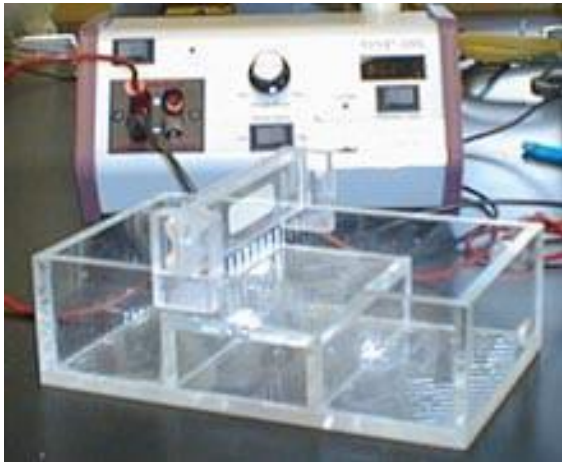
1, 2. Preparare il gel



3. Caricare il DNA ed sottoporlo ad un campo elettrico elettroforesi



4. Colorazione del DNA con etidio bromuro. Visualizzazione del DNA agli U.V.



Elettroforesi su gel d'agarosio: analisi di RNA e DNA

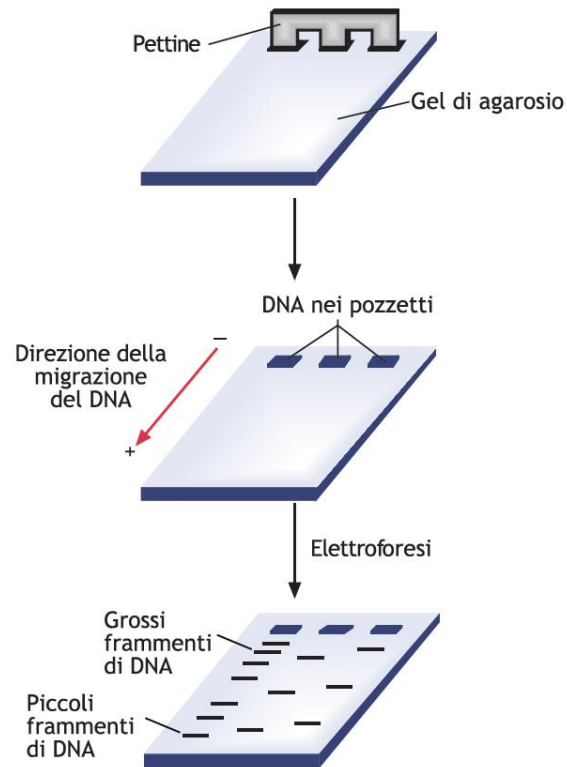
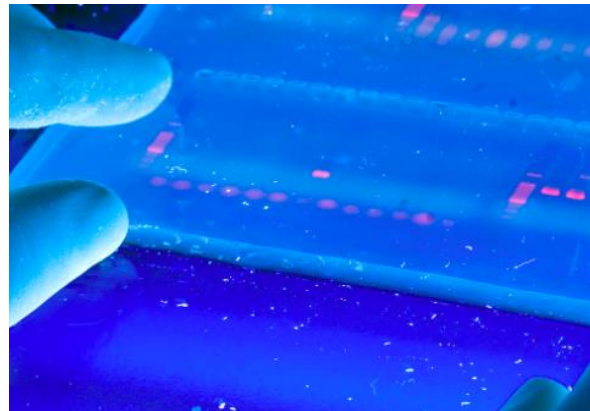


FIGURA I.12.1.1 Gel elettroforesi in agarosio. L'agarosio disciolto è colato in uno stampo che contiene un pettine. Dopo che il gel si è formato, il pettine è rimosso per creare i pozzetti nei quali saranno caricati i campioni di DNA. Si applica quindi una corrente elettrica per spostare il DNA carico negativamente verso l'elettrodo positivo. Le piccole molecole di DNA generalmente migrano attraverso il gel con una velocità superiore rispetto a quelle più grosse.

Elettroforesi su gel d'agarosio: analisi di RNA e DNA



A

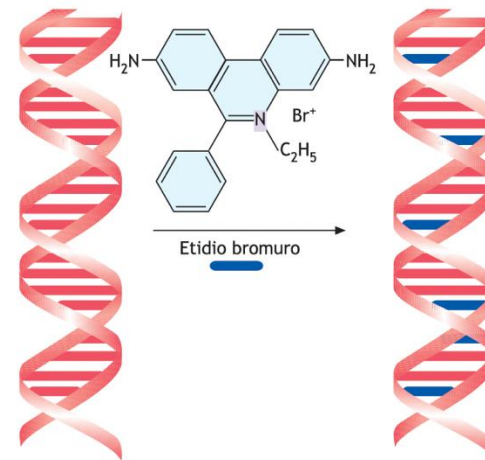
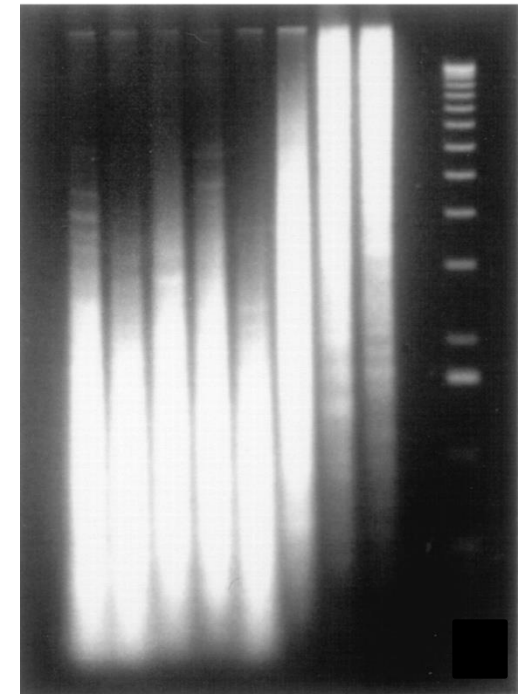


FIGURA I.12.1.2 Il legame dell'etidio bromuro al DNA. L'etidio bromuro è una molecola planare in grado di intercalarsi tra le basi impilate della doppia elica del DNA. Il DNA a cui è legato l'etidio bromuro emette fluorescenza se è illuminato con luce ultravioletta.

HaeIII
TaqI
Sau3A
RsaI
AluI
SstI
NdeI
EcoRI



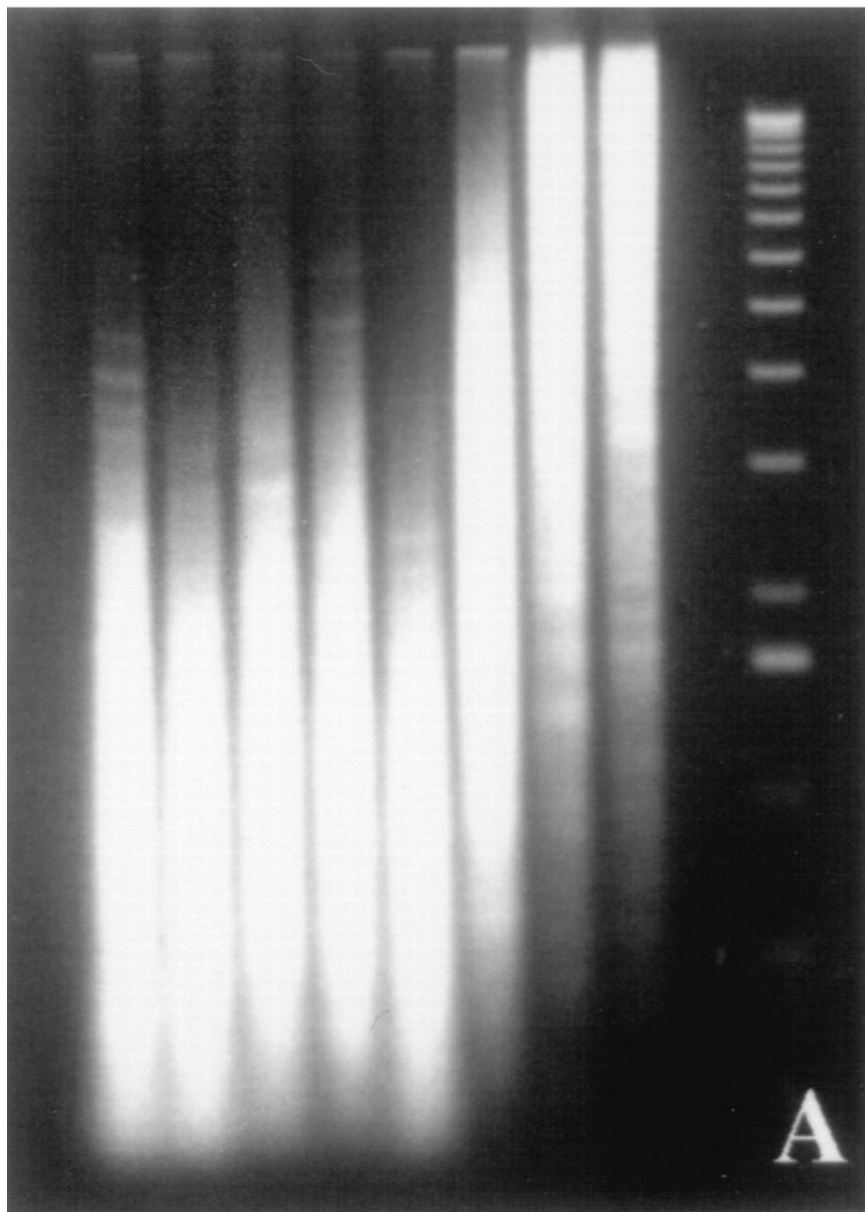
B, C

A) Colorazione del DNA con etidio bromuro.
B) Visualizzazione del DNA agli UV
C) Foto



HaeIII
TaqI
Sau3A
RsaI
AluI
StyI
NdeI
EcoRI

Analisi su gel d'agarosio di
 DNA genomico frammentato
 con enzimi di restrizione

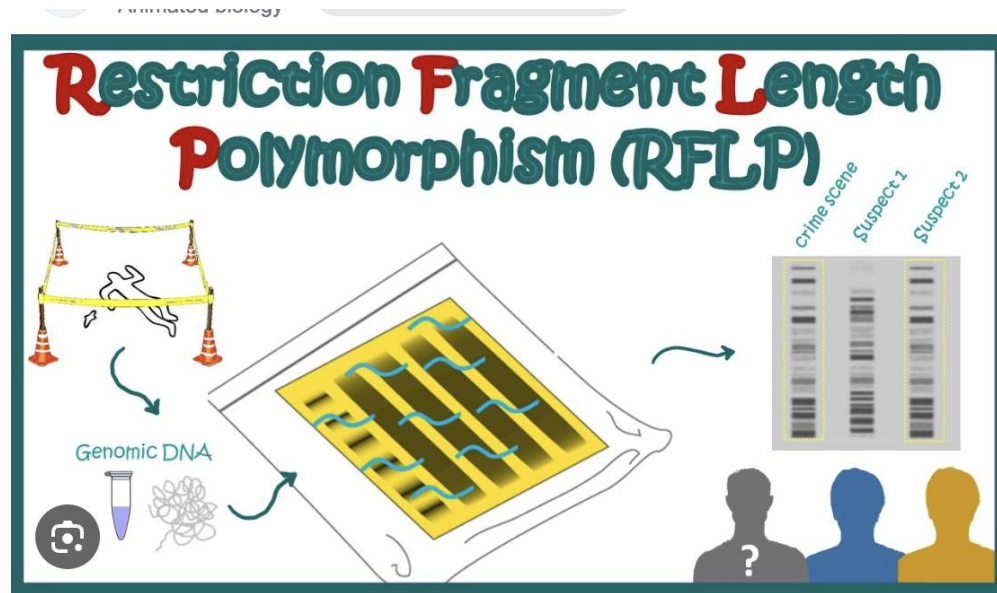


Polo negativo -

Polo positivo +

RFLP-Restriction fragment length polymorphisms

- Ci sono differenze tra gli individui nella lunghezza dei frammenti di DNA tagliati dall'enzima di restrizione
- Questo test essere utilizzato per stabilire la paternità o sulla scena del crimine



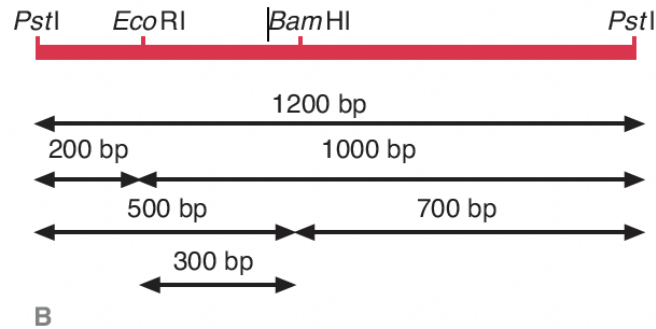
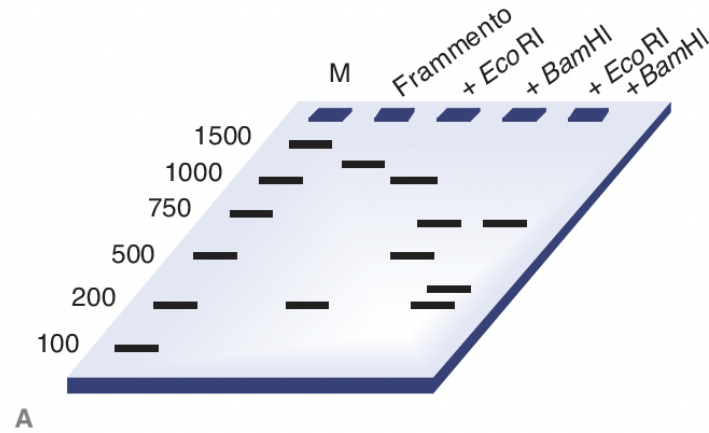
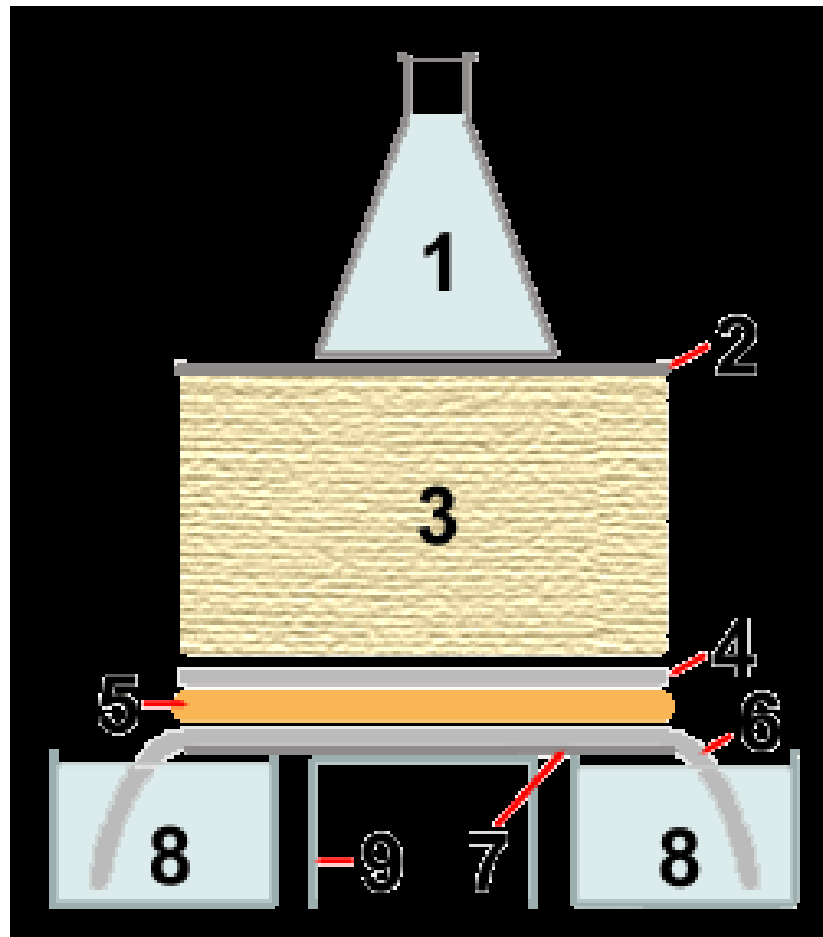


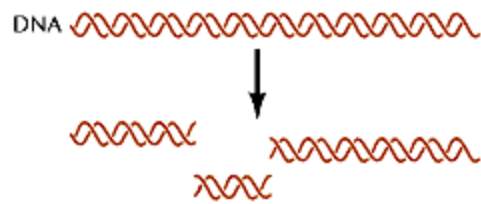
FIGURA 12.5 Mappatura di frammenti di DNA mediante digestione con enzimi di restrizione. **(A)** Un frammento di DNA da 1,2 kb isolato dopo la digestione con *Pst*I viene tagliato con l'enzima di restrizione *Eco*RI, o *Bam*HI, o una miscela di entrambi come indicato. I prodotti vengono separati su gel di agarosio e le dimensioni delle bande risultanti sono calcolate rispetto al riferimento costituito da frammenti di DNA di dimensione nota (M = marcatore di peso molecolare). **(B)** La mappa di restrizione dedotta per il frammento di DNA. I siti per *Pst*I sono posti alle due estremità e la localizzazione dei siti per *Eco*RI e *Bam*HI può essere determinata dalla dimensione dei frammenti ottenuti.

2) Trasferimento

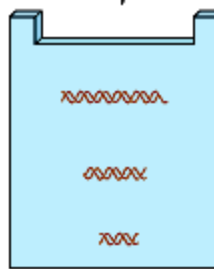


Trasferimento
del
DNA su
membrana
per ibridazione

Southern (Northern) blot: per valutare se una sequenza di DNA (RNA) è presente

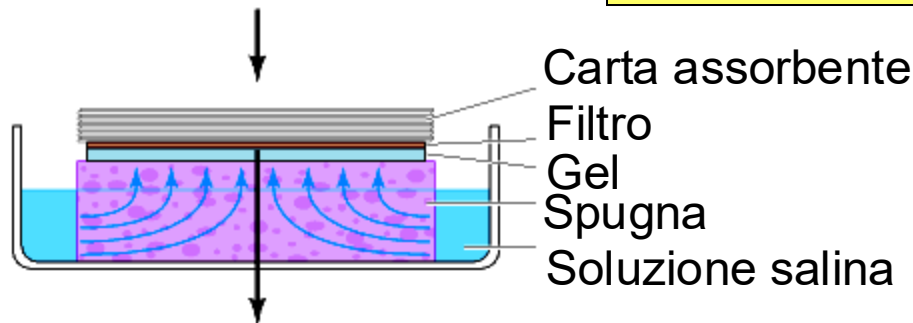


Il DNA è digerito con una endonucleasi di restrizione



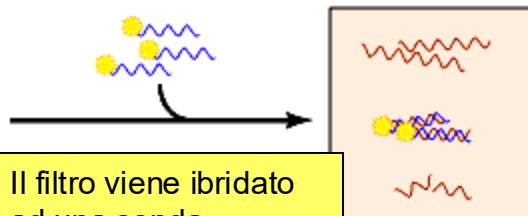
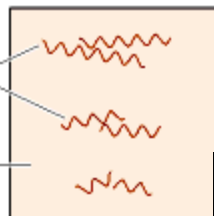
Migrazione

I frammenti di restrizione di dimensione diverse sono separati mediante elettroforesi su gel.



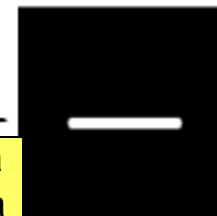
Il DNA viene denaturato e trasferito su di un filtro mediante passaggio di una soluzione attraverso il gel

Frammenti di DNA
Filtro



Il filtro viene ibridato ad una sonda radioattiva, che si lega a sequenze complementari di DNA

La sonda legata al filtro è rivelata in autoradiografia



Lastra autoradiografica

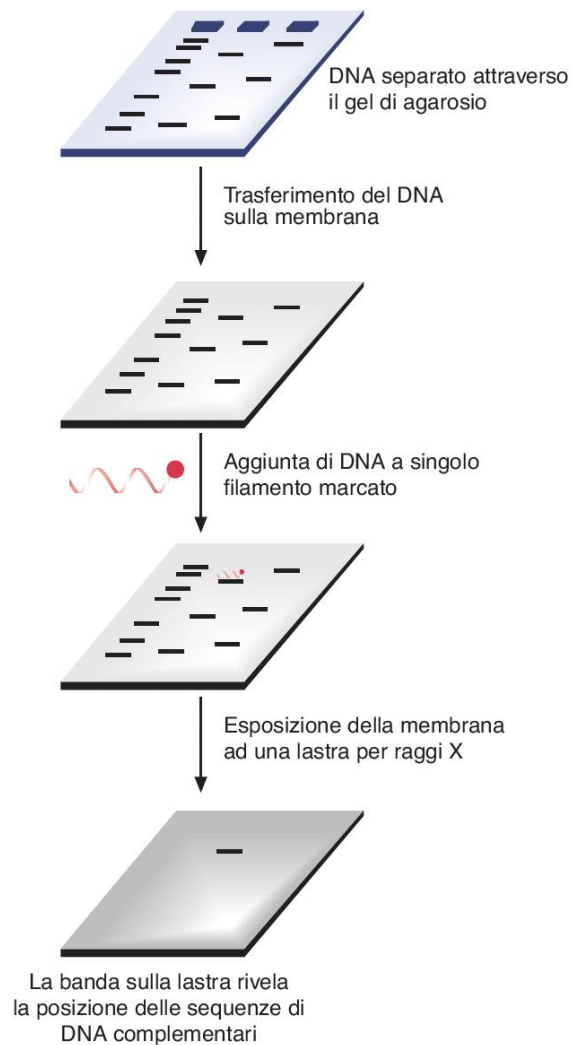
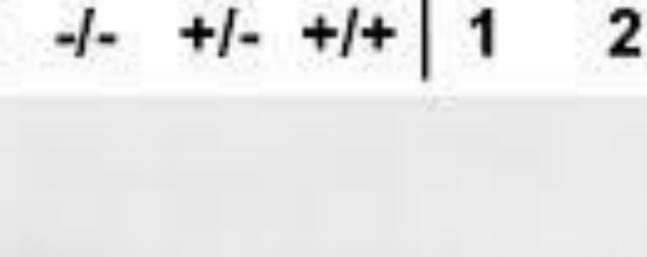
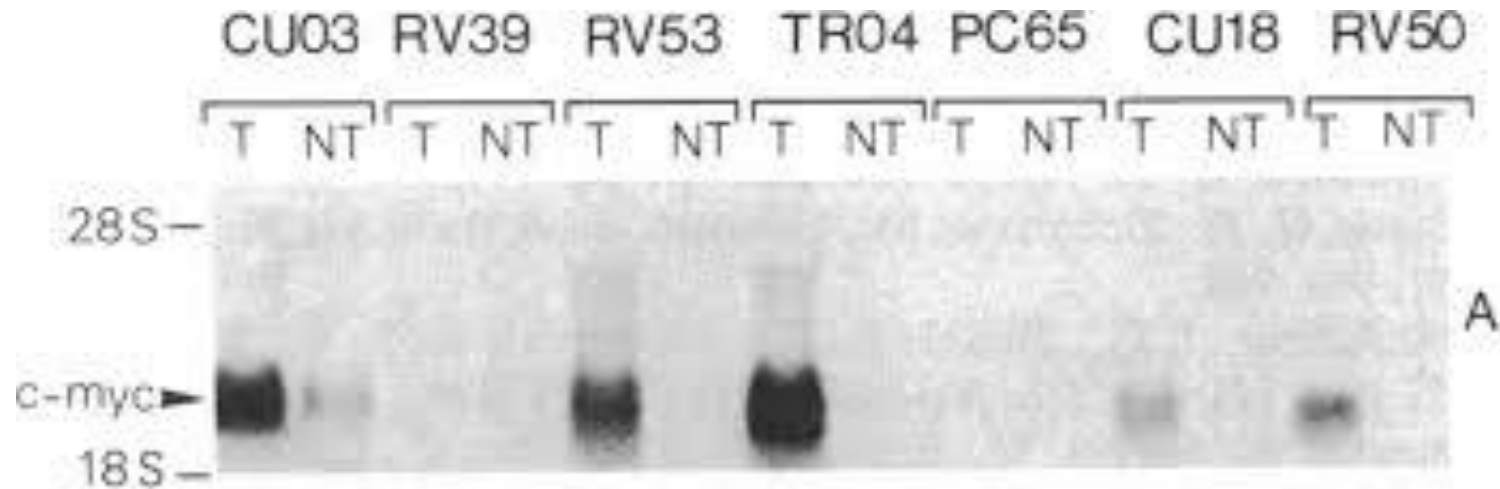


FIGURA 12.6 Ibridazione in Southern blot. I frammenti di DNA separati mediante elettroforesi su gel di agarosio sono trasferiti su una membrana dopo essere stati denaturati a singolo filamento. La membrana è poi messa a contatto con una sonda marcata. Il legame della sonda alla membrana, mediante la formazione di legami idrogeno, può essere rivelato mediante esposizione ad una lastra per raggi X. La sonda ra-

| p53 Control | | | | Bladder CIS | | | |
|--|-----|-----|-----|-------------|---|---|---|
| +/+ | -/- | +/- | +/+ | 1 | 2 | 3 | 4 |
|  | | | | | | | |
| | | | | - Pseudo | | | |
| | | | | - p53 | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |

Carcinoma in situ della vescica

Northern blot per determinare i livelli di espressione del gene c-myc



Microarrays vengono utilizzati per confrontare i livelli di espressione di tutti i geni conosciuti in un tessuto normale e in una biopsia tumorale

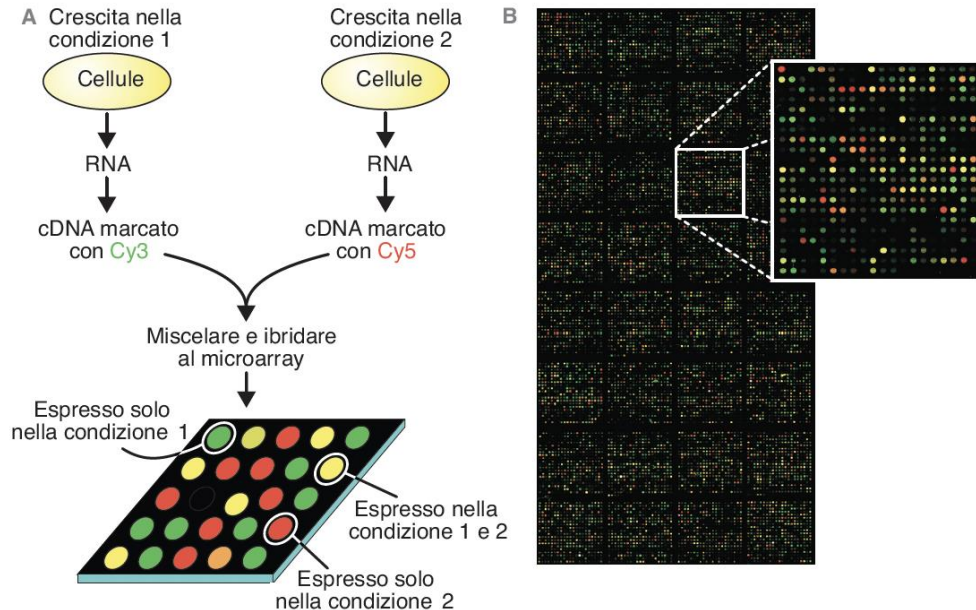
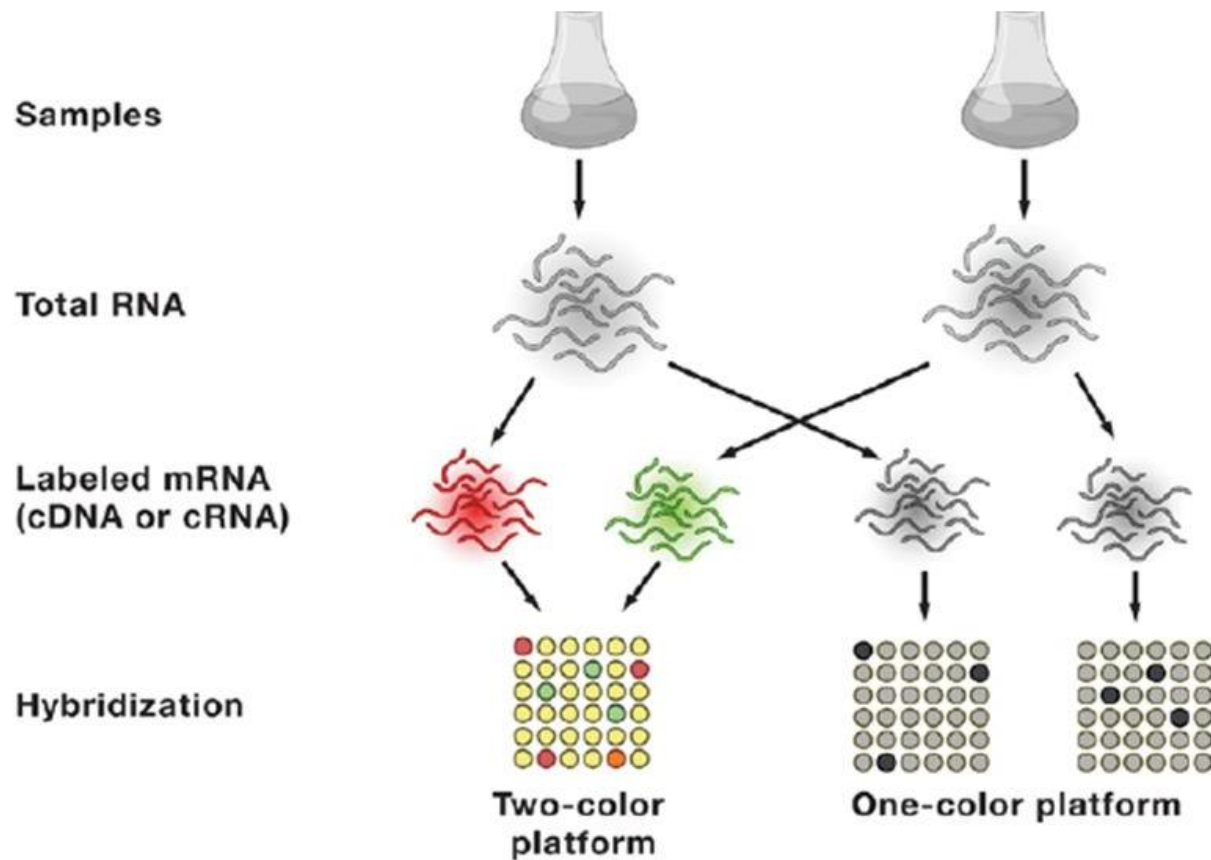


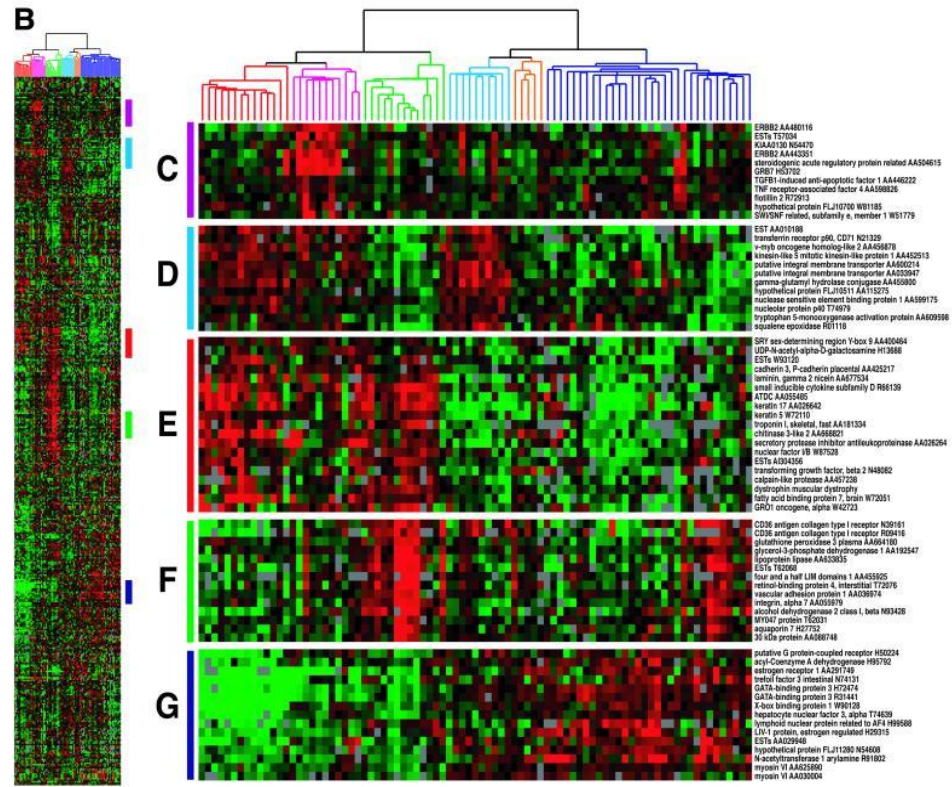
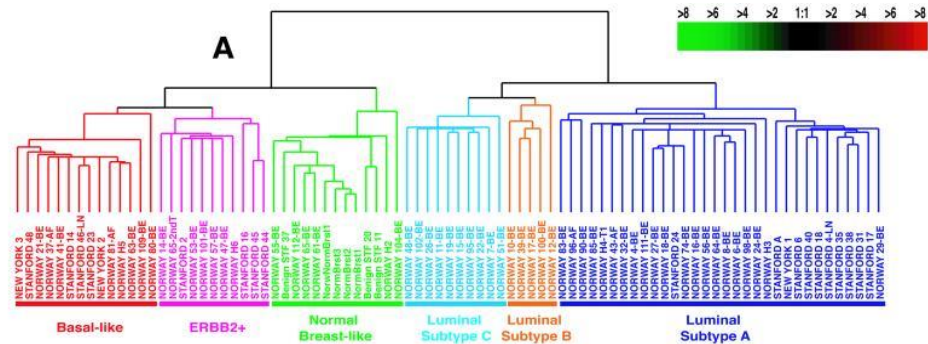
FIGURA 12.34 Derivazione dei profili di espressione genica mediante la tecnica dei microarray. (A) L'RNA estratto dalle cellule coltivate in due condizioni differenti (condizione 1 e 2) viene retrotrascritto a cDNA e marcato con due sostanze fluorescenti, verde e rossa rispettivamente. I campioni di cDNA vengono mescolati in parti uguali e ibridati al microarray. L'analisi della fluorescenza mette in evidenza una serie di spot verdi (il gene corrispondente è espresso solo nelle cellule cresciute nella condizione 1), rossi (il gene corrispondente è espresso solo nelle cellule cresciute nella condizione 2), gialli (il gene corrispondente è espresso in quantità uguali nelle cellule cresciute in condizione 1 e 2) o di gradazione intermedia a seconda dei livelli di espressione del gene corrispondente nei due campioni. (B) Esempio di microarray per l'analisi dell'espressione di geni di topo.

L'RNA isolato dai due campioni viene marcato con una molecola fluorescente (verde o rossa) e fatto ibridare su pozzetti ognuno dei quali contiene una delle **27590 sequenze geniche note**

Two color vs single color



Attraverso i microarrays abbiamo individuato più sottogruppi di tumore della mammella



78 biopsies (SorlieT PNAS 2001)

Oncotype DX® 21-Gene Recurrence Score® (RS) Assay
è un test che stabilisce il rischio di ricorrenza del tumore se è necessaria la chemioterapia dopo l'intervento chirurgico

Calculation of the Recurrence Score Result

Coefficient x Expression Level

$$\begin{aligned} \text{RS} = & + 0.47 \times \text{HER2 Group Score} \\ & - 0.34 \times \text{ER Group Score} \\ & + 1.04 \times \text{Proliferation Group Score} \\ & + 0.10 \times \text{Invasion Group Score} \\ & + 0.05 \times \text{CD68} \\ & - 0.08 \times \text{GSTM1} \\ & - 0.07 \times \text{BAG1} \end{aligned}$$

| Category | RS (0-100) |
|-----------|----------------|
| Low risk | RS <18 |
| Int risk | RS ≥18 and <31 |
| High risk | RS ≥31 |

Medicina personalizzata

L'approccio al trattamento personalizzato (prevede l'utilizzo di strumenti di analisi e test di diagnostica molecolare), con l'obiettivo di:

- 1) conoscere il rischio di insorgenza di una determinata patologia;
- 2) prescrivere i farmaci più adatti e gestire le patologie in modo ottimale per un paziente.

