

Quante molecole di DNA ci sono

In una cellula umana ?

Quante molecole di DNA ci sono

In una cellula umana ?

23 coppie + ...

Quante molecole di DNA ci sono

In una cellula umana ?

23 coppie + quanti mitocondri?

Quante molecole di DNA ci sono

In una cellula umana ?

23 coppie + quanti mitocondri?

Nel nucleo di una cellula umana ?

23 coppie = 46

Quante molecole di DNA ci sono

In una cellula umana ?

23 coppie + quanti mitocondri?

Nel nucleo di una cellula umana ?

23 coppie = 46

In un batterio ?

Quante molecole di DNA ci sono

In una cellula umana ?

23 coppie + quanti mitocondri?

Nel nucleo di una cellula umana ?

23 coppie = 46

In un batterio ?

Da 1 a 3 + ...

Quante molecole di DNA ci sono

In una cellula umana ?

23 coppie + quanti mitocondri?

Nel nucleo di una cellula umana ?

23 coppie = 46

In un batterio ?

Da 1 a 3 + quanti plasmidi?

1 APRILE 2000

la Repubblica

Fondatore Eugenio Scalfari

Direttore Ezio Mauro



Anno 25 - Numero 81 - L. 2200 - € 1,19 In Italia - Venerdì 7 Aprile 2000

ED: 00185 ROMA, Piazza Indipendenza 11/b, tel. 06/49821, Fax: 06/22023. Spedizione abbonamenti postale, articolo 2, comma 20/b, legge 662/96 - Roma - Il prezzo al pubblico è di complessive lire 2.200 col supplemento D.

PIEZZI DI VENDITA ALL'ESTERO: Austria Sc. 26; Belgio F.B. 75; Canada \$ 1; Danimarca Kr. 15; Egitto P.L. 700; Finlandia Fmk 10; Francia F. 12; Germania D.M. 3,5; Grecia Dr. 500; Lussemburgo F.L. 75; Malta Cor. 50; Monaco F. F. 12; Norvegia Kr. 15; Olanda Fl. 4; Portogallo Esc. 200 (Isola)

225; Regno Unito Lst. 1,30; Repubblica Ceca Kor. 56; Slovenia Sit. 200; Spagna Ptas 150 (Canarie 175); Svezia Kr. 15; Svizzera Fr. 2,00; Svizzera Tic. Fr. 2,5 (com. il Venerdì) Fr. 2,00; Ungheria Fl. 250; U.S.A. \$ 1. Concessionari di pubblicità: A. MARZONI & C. Milano - via Novara 21 tel. 02/574911

INTERNET www.repubblica.it



LA POLEMICA
D'Alema: vinceremo Berlusconi: indagini per farmi perdere
di CAPORALE e RAGONE
A PAGINA 24

SANITA'
Per ridurre gli errori in corsia arriva il robot in camice
di BONERANDI e REGGIO
A PAGINA 36



ASTRONOMIA
Il segreto di Hyakutake cometa con la coda lunga 500 milioni di chilometri
di CLAUDIA DI GIORGIO
A PAGINA 13

iscossa
lzo
ari
ura
olio
isa
ATI

Una piccola società fondata da un ricercatore brucia i tempi. "Una svolta storica per la scienza" **Svelati i segreti del genoma** Annuncio dagli Usa: "Ora la mappa dell'uomo è completa"

WASHINGTON - «Abbiamo completato la sequenza del genoma di un singolo essere umano». L'annuncio storico è stato dato ieri dalla Celera Genomics, una piccola società privata fondata da Craig Venter, un ricercatore che ha lavorato per anni all'Istituto superiore di Sanità americano. Il genoma è la mappa completa dell'essata sequenza delle oltre tre miliardi di coppie chimiche che formano il Dna. Soddisfazione della Casa Bianca: «Un passo importante». La Celera ha avuto un'impennata a Wall Street, dove sono cresciuti tutti i titoli biotecnologici.

L'INTERVISTA
Il fondatore di Celera Genomics
"Renderemo pubblica la nostra scoperta"

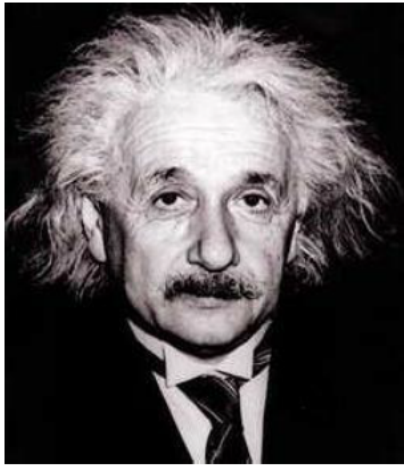


IL LIBRO DEL DNA IN 300 COMPUTER
dal nostro inviato VITTORIO ZUCCONI
WASHINGTON - La mela della vita è alla portata della nostra mano: la prima sequenza completa dei geni umani è stata tracciata. Tutti i centomila pezzi circa, i «geni» che formano il Dna e che nel silenzio delle nostre cellule disegnano quello che siamo e che saremo, sono stati raccolti, ancora alla rinfusa. Già i supercalcolatori hanno cominciato la fatica immane di metterli al loro posto, di sistemare quella montagna di pezzi sparsi nell'ordine corretto, come sono dentro le nostre cellule. E quel lavoro che in un anno, due al massimo, ci condurrà alla defini-

Paradosso del valore C

Valore C: quantità totale (in picogrammi) di DNA in un genoma aploide (Hewson Swift, 1950)

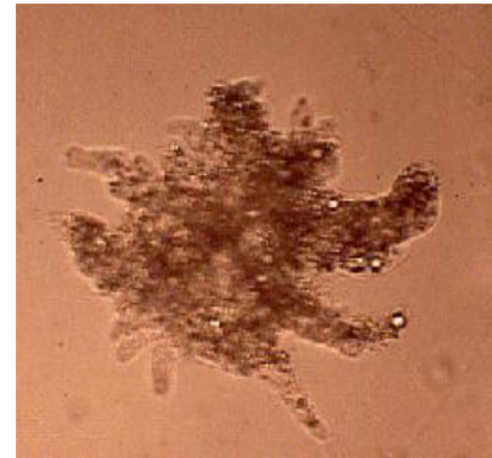
Paradosso del valore C: la complessità dell'organismo non correla con il contenuto di DNA del genoma.



3.4×10^9 bp
Homo sapiens



1.5×10^{10} bp
Allium cepa



6.8×10^{11} bp
Amoeba dubia

Paradosso del valore C

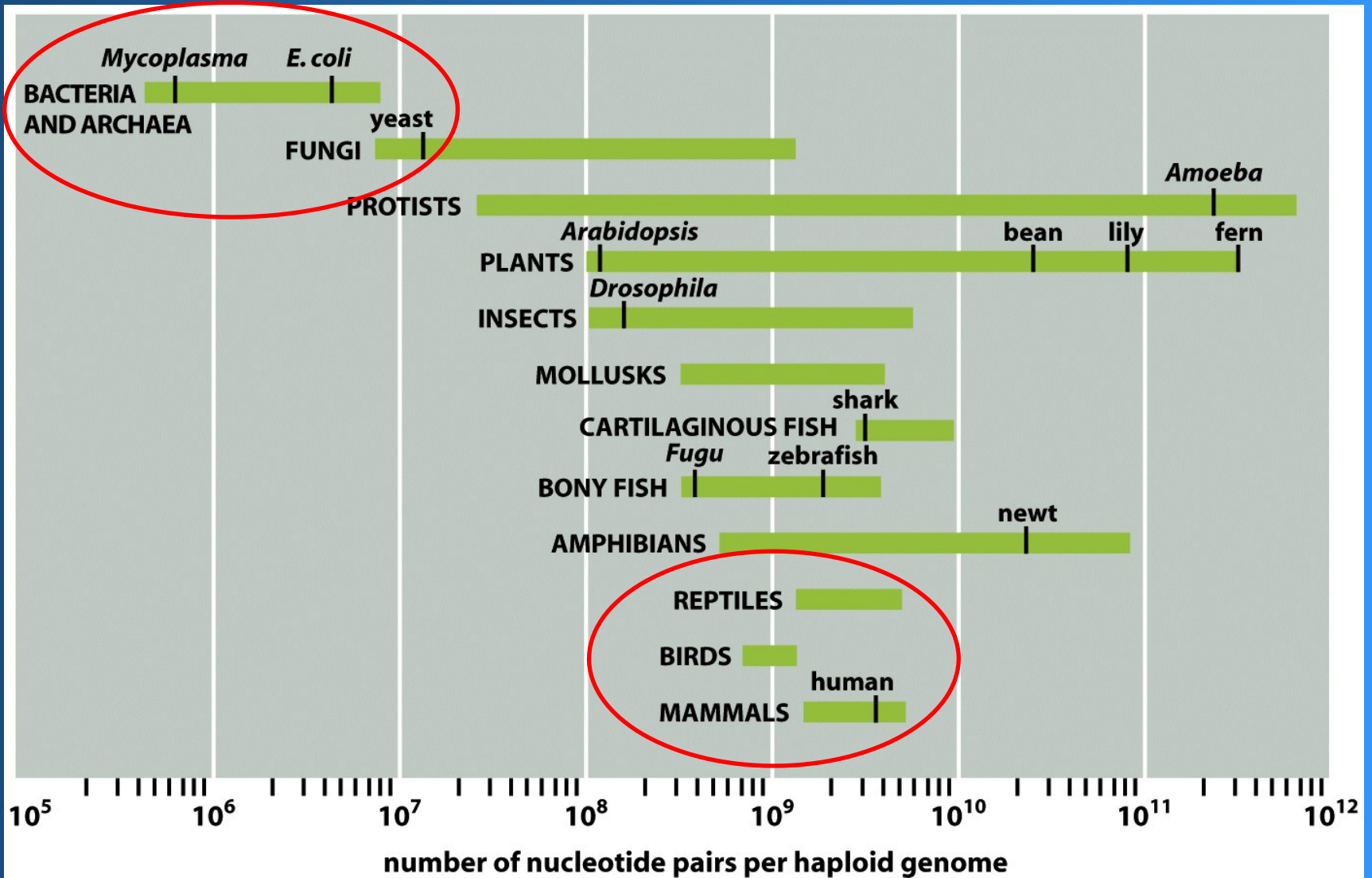


Figure 1-37 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Paradosso del valore C

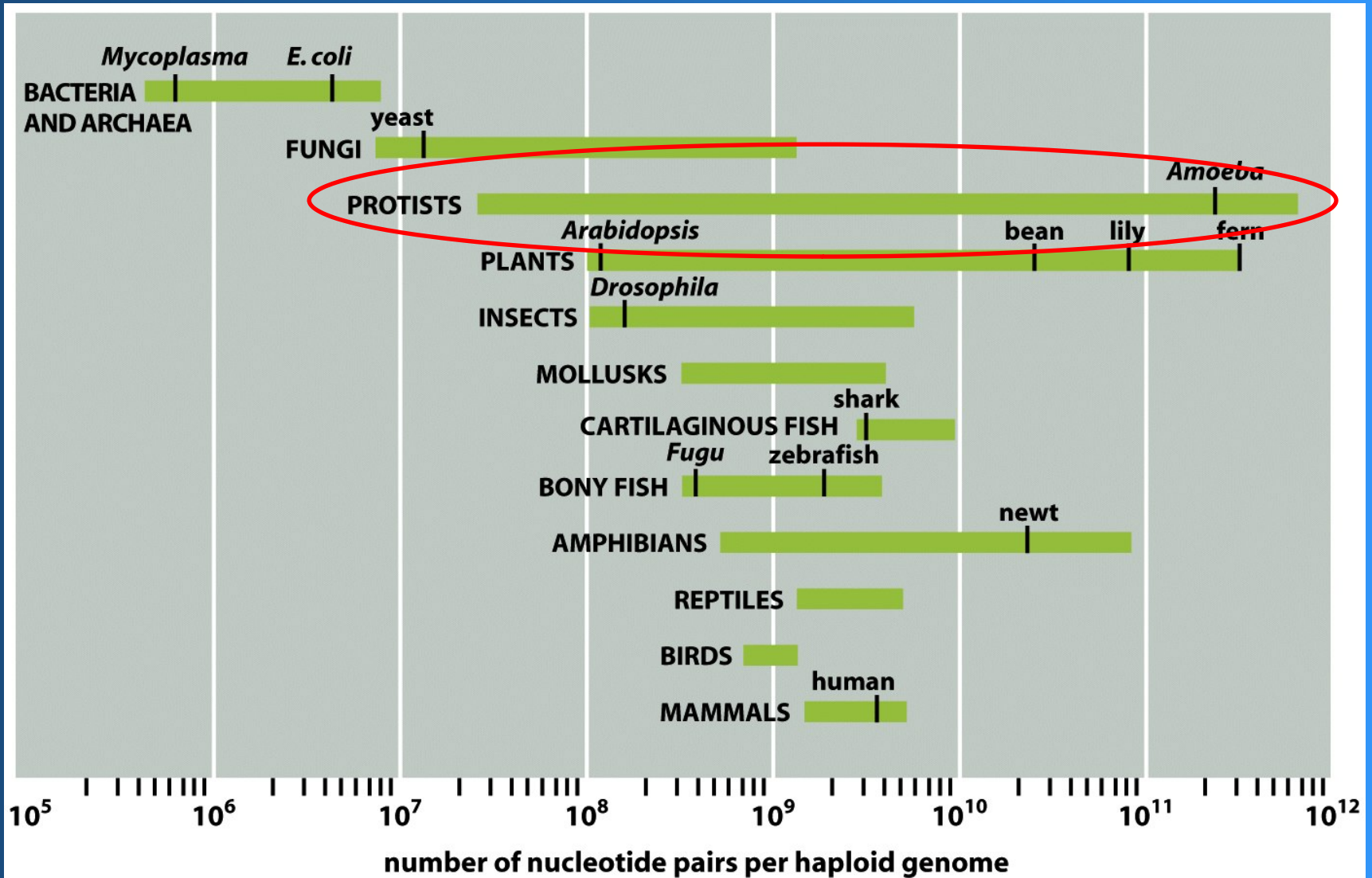


Figure 1-37 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Densità genica nei genomi

Il valore C correla con la quantità di DNA, non con il numero di geni (intesi come geni codificanti)

TABELLA 4.2 ▼ Dimensioni e numero di geni di alcuni genomi

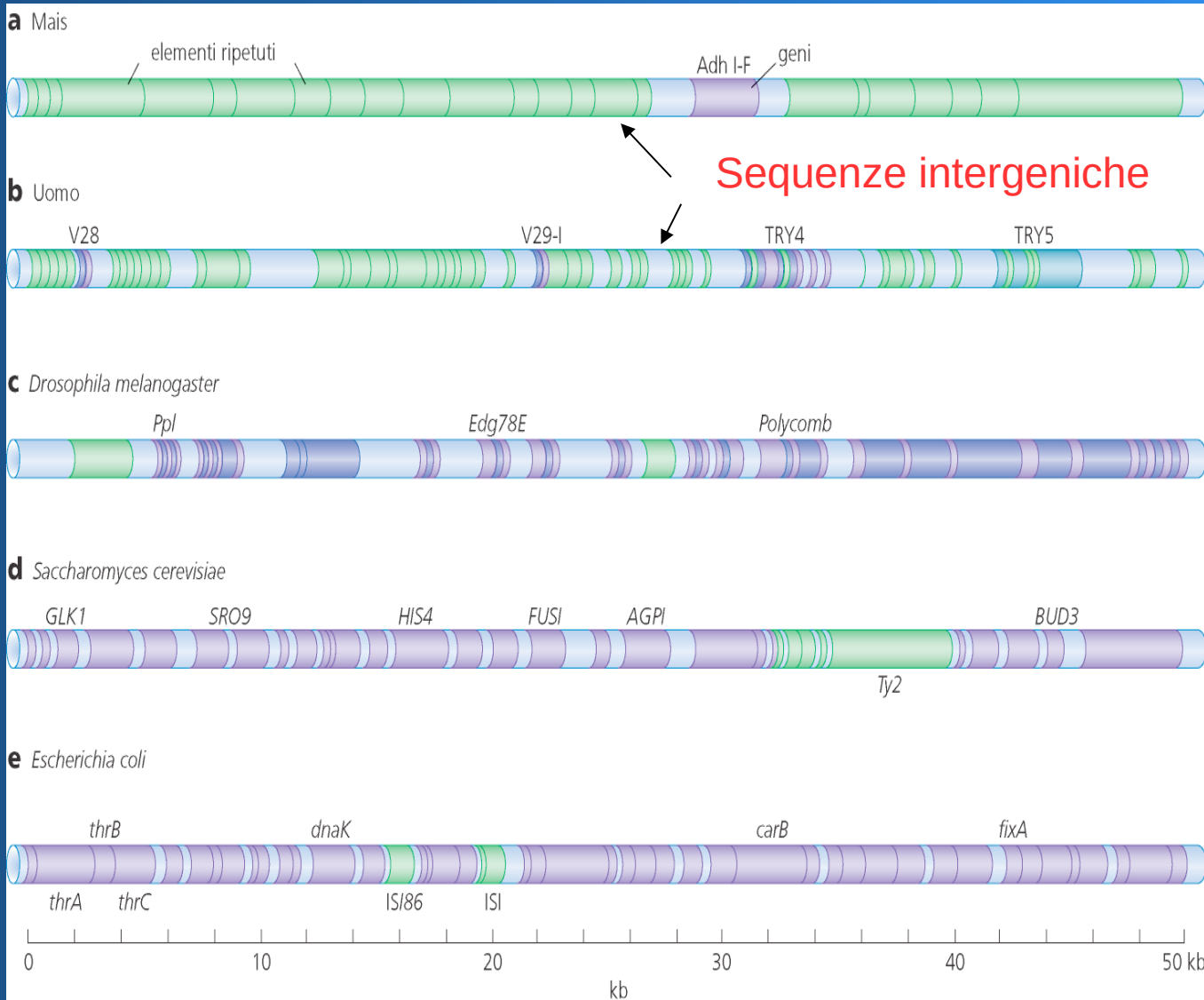
Specie *	Dimensioni del genoma (bp)	Numero di geni codificanti proteine	Densità genica media	Numero di cromosomi	Contenuto medio di GC (%)
<i>Homo sapiens</i> (uomo)	3,3 miliardi	~23.000	1 gene /135.000 basi	46	41,2
<i>Mus musculus</i> (topo)	2,7 miliardi	~21.000	1 gene /129.000 basi	40	42,4
<i>Danio rerio</i> (pesce zebrato)	1,39 miliardi	>26.000	1 gene / 53.000 basi	50	36,9
<i>Drosophila melanogaster</i> (moscerino)	148 milioni	17.000	1 gene / 9000 basi	8	41,9
<i>Arabidopsis thaliana</i> (pianta)	100 milioni	25.000	1 gene / 4000 basi	10	36,7
<i>Caenorhabditis elegans</i> (verme)	100 milioni	19.000	1 gene / 5000 basi	12	35,4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (lievito)	12,3 milioni	5400	1 gene / 2300 basi	32	38,40
<i>Escherichia coli</i> K12 (batterio)	4,64 milioni	4100	1 gene / 1100 basi	1	50,8
<i>Haemophilus influenzae</i> (batterio)	1,86 milioni	1700	1 gene /1100 basi	1	38,0

* Per gli eucarioti, si intende il genoma aploide nucleare.

Compattezza dei genomi

regioni ripetute ■ regioni intergeniche ■ geni ■

compattezza decrescente ↑



Distribuzione funzionale dei geni

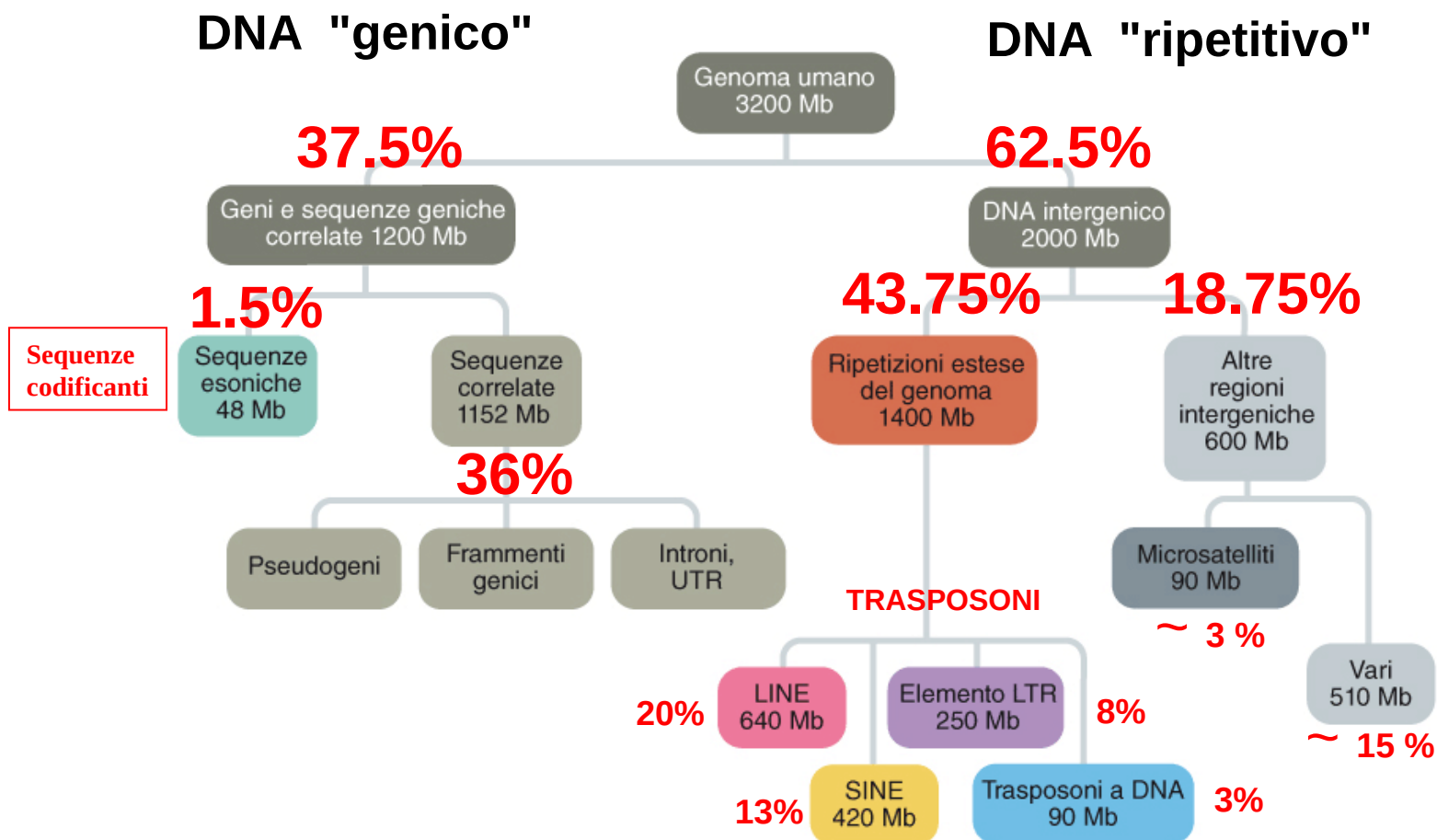
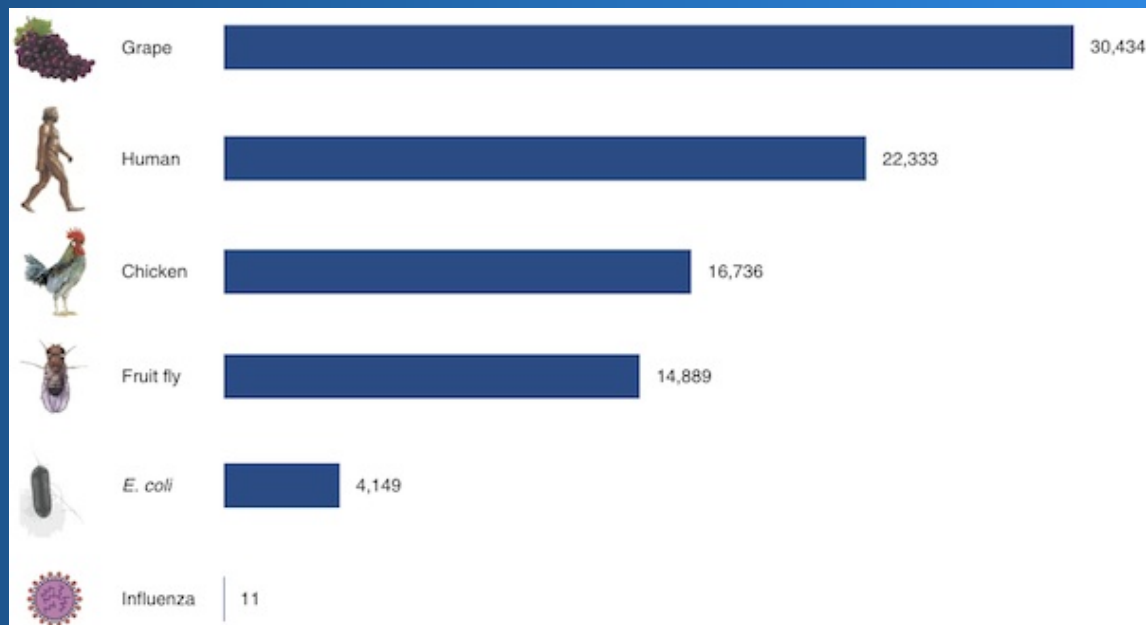


FIGURA 4.14 ▲ Organizzazione del genoma umano.

Numero di geni negli eucarioti

TABLE 19.2 GENE NUMBERS FOR VARIOUS EUKARYOTES	
Species	Approximate number of genes
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (fission yeast)	4900
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (budding yeast)	6100
<i>Drosophila melanogaster</i> (fruit fly)	13,600
<i>Caenorhabditis elegans</i> (nematode worm)	20,140
<i>Homo sapiens</i> (human)	20,500
<i>Arabidopsis thaliana</i> (plant)	25,500
<i>Zea mays</i> (maize)	32,700

Table 19.2 Introduction to Genetics (© Garland Science 2012)



Nel genoma umano

DNA "GENICO" ~ 37 %

Geni singoli
Cluster genici
Geni ripetuti in tandem (istoni, tRNA, rRNA)
Pseudogeni

DNA RIPETITIVO ~ 60 %

Mediamente ripetitivo (trasposoni)
Altamente ripetitivo (DNA satellite)

DNA NON CLASSIFICABILE ~ 3 %

Geni omologhi

Geni ortologhi:

geni simili riscontrabili in organismi correlati tra loro.

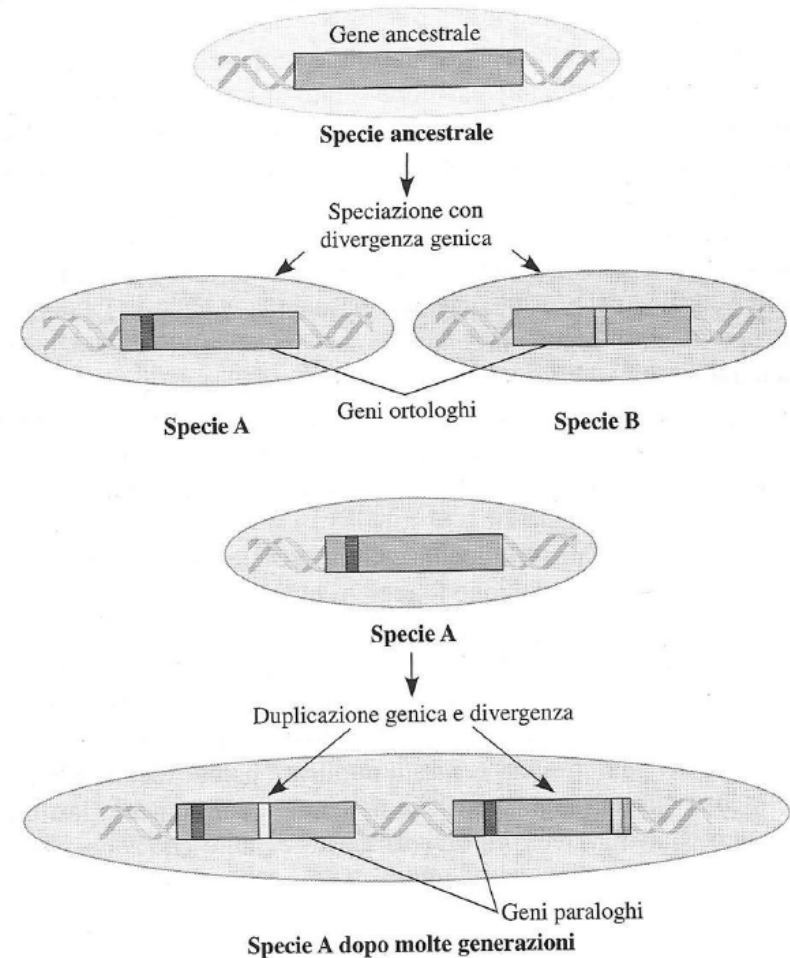
Il fenomeno della speciazione porta alla divergenza dei geni e quindi delle proteine che essi codificano.

ESEMPIO: l'alfa-globina di uomo e di topo hanno iniziato a divergere circa 80 milioni di anni fa, quando avvenne la divisione che dette vita ai primati e ai roditori. I due geni sono da considerarsi **ortologhi**.

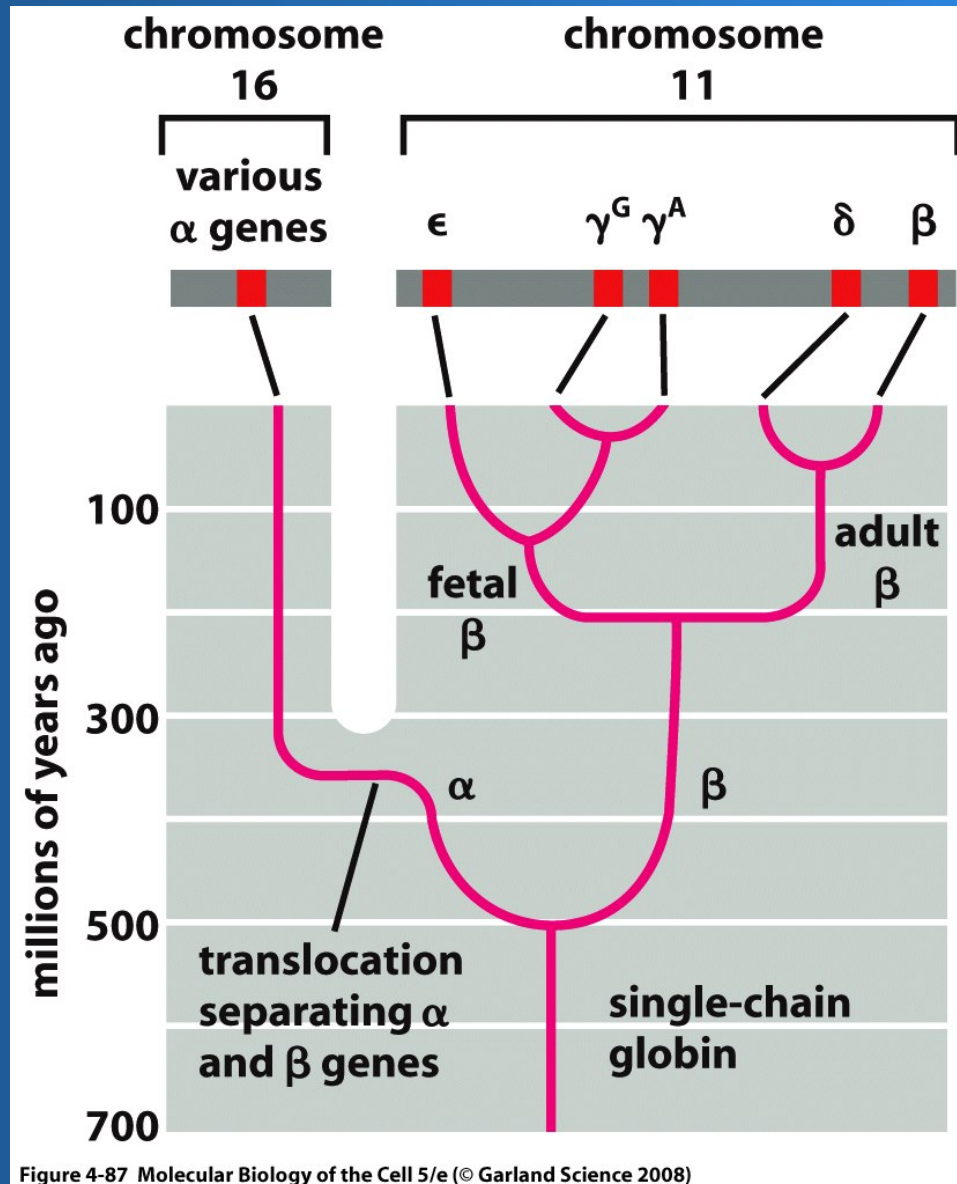
Geni paraloghi:

geni originati dalla duplicazione di un unico gene nello stesso organismo.

ESEMPIO: le globine umane alfa e beta hanno iniziato a divergere in seguito alla duplicazione di un gene globinico ancestrale. I due geni sono da considerarsi **paraloghi**.



Geni omologhi delle globine



Geni omologhi delle globine

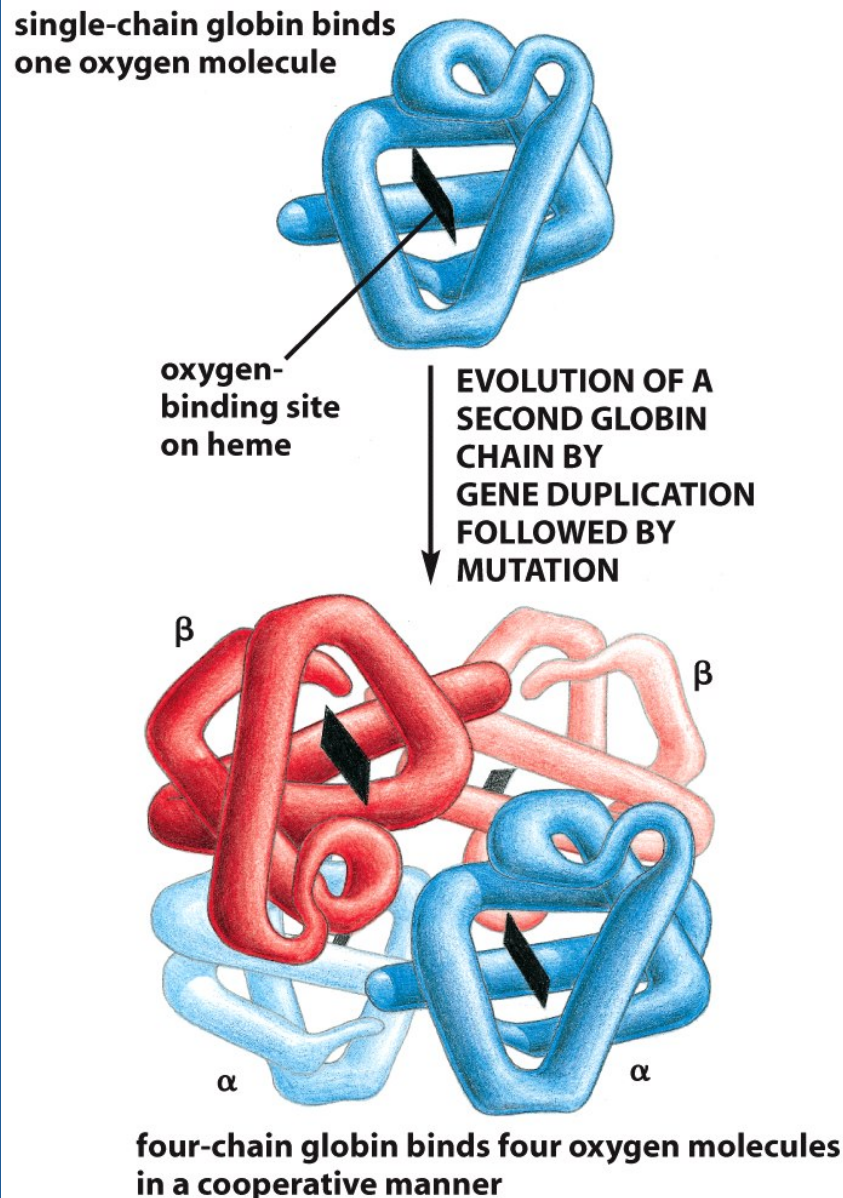


Figure 4-86 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Emoglobina

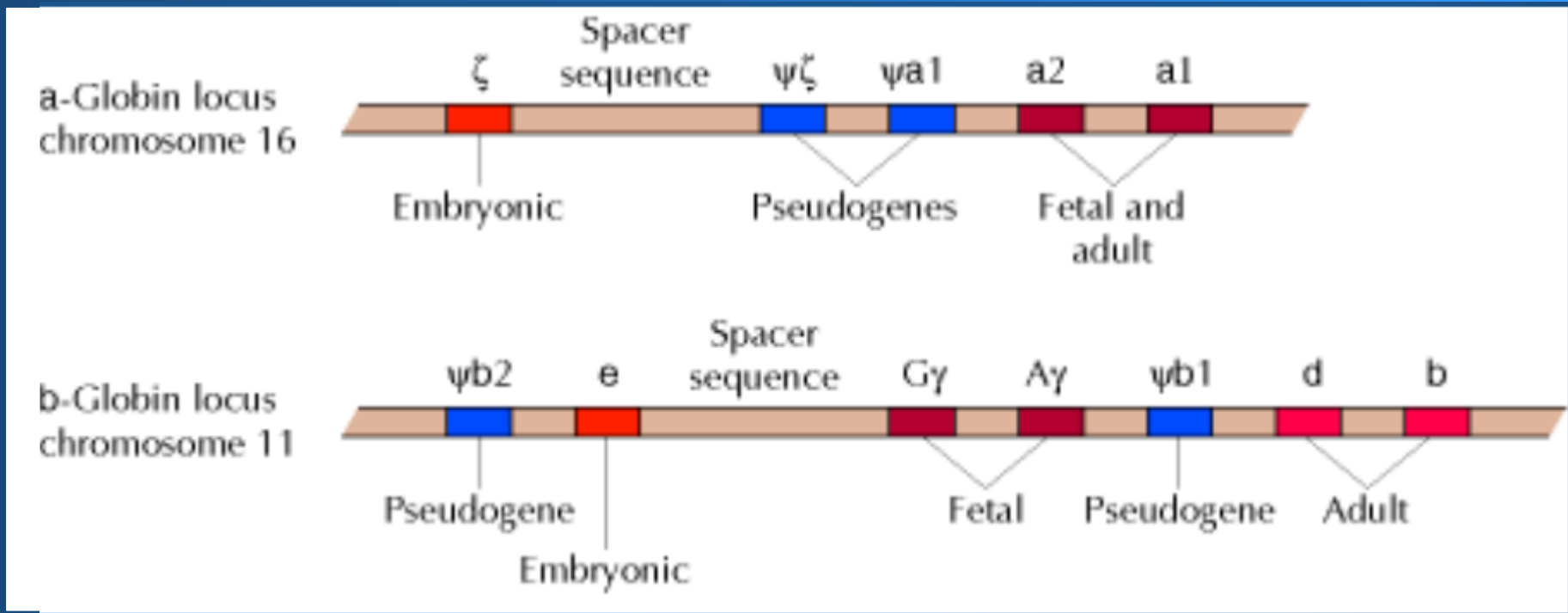
2 x globina α

2 x globina β

tutte con
struttura
quasi uguale

I cluster nei geni delle globine oggi

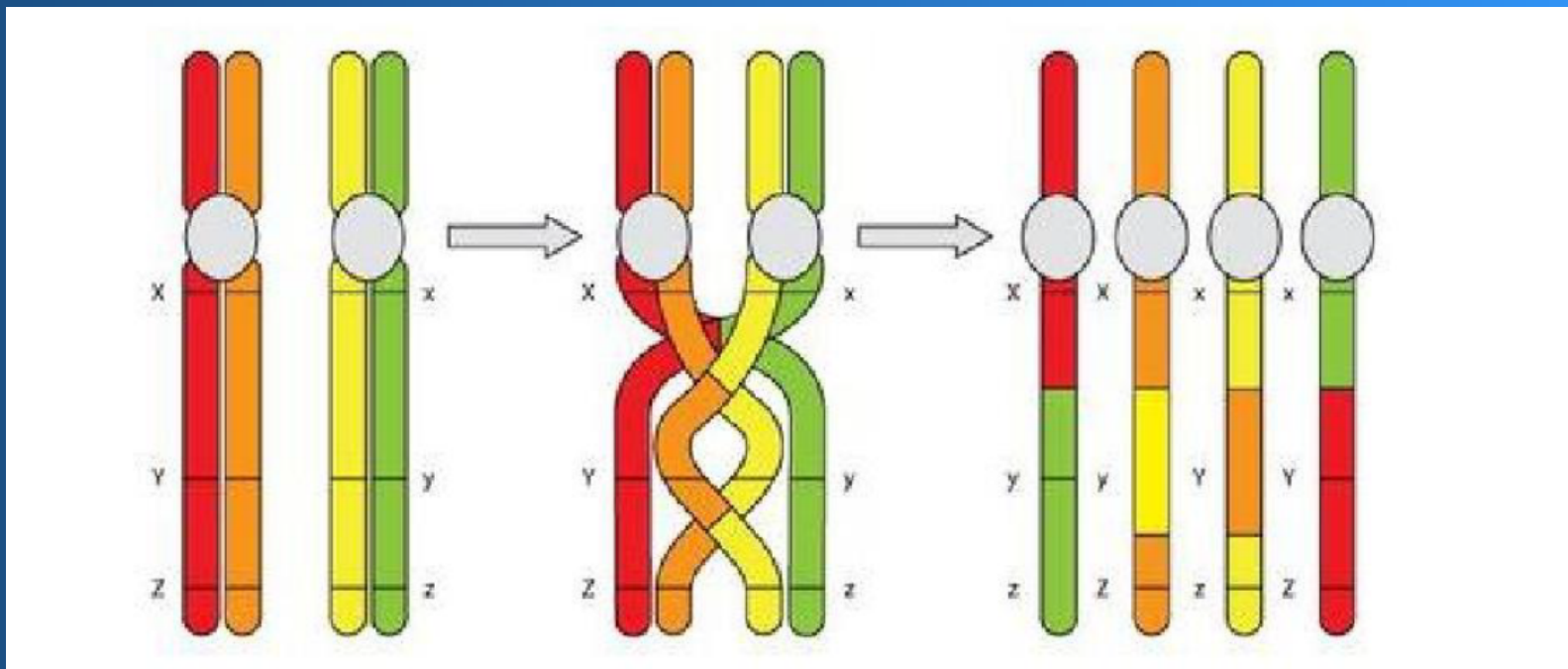
geni ψ : sono presenti ma NON funzionano



Crossing over uguale

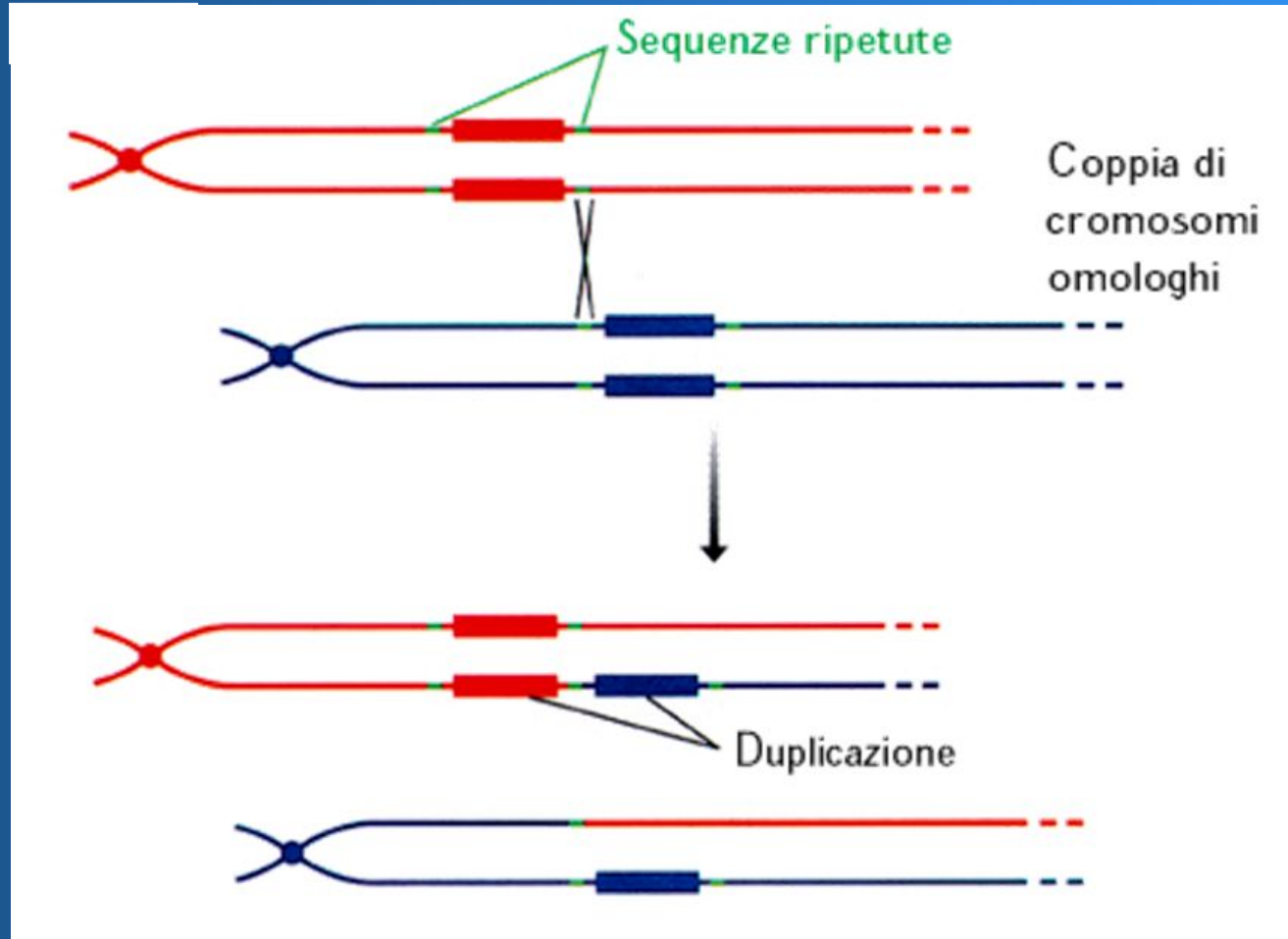
La **distribuzione** dei geni rimane **invariata**, quello che **cambia** è la **combinazione** degli **alleli** di loci diversi lungo i cromosomi. Viene anche definito

ricombinazione omologa



Il crossing over avviene durante la **meiosi** tra **cromatidi omologhi NON fratelli** in un punto di contatto chiamato "**chiasma**"

Crossing over disuguale



Crossing over disuguale

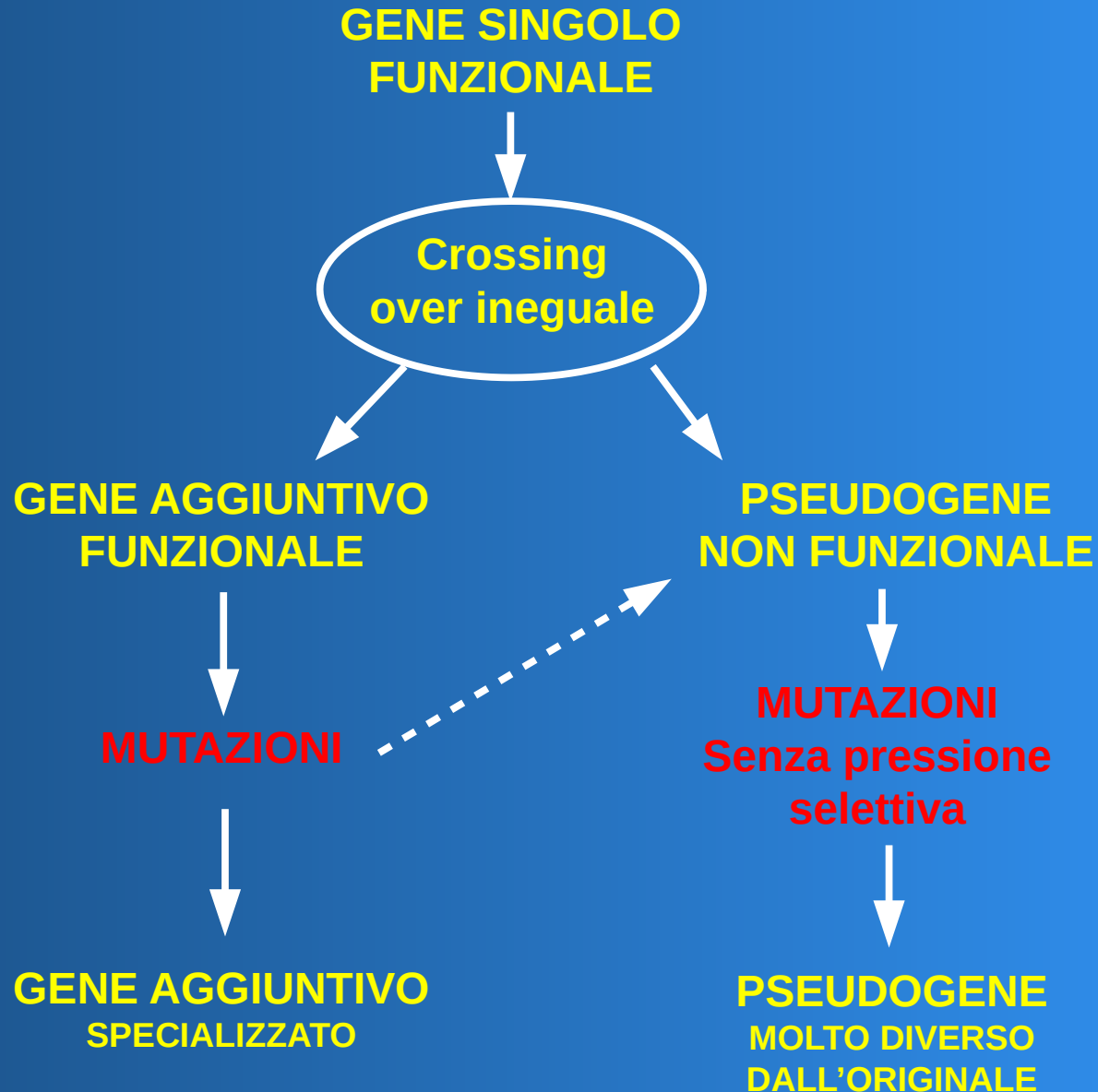
Corretto



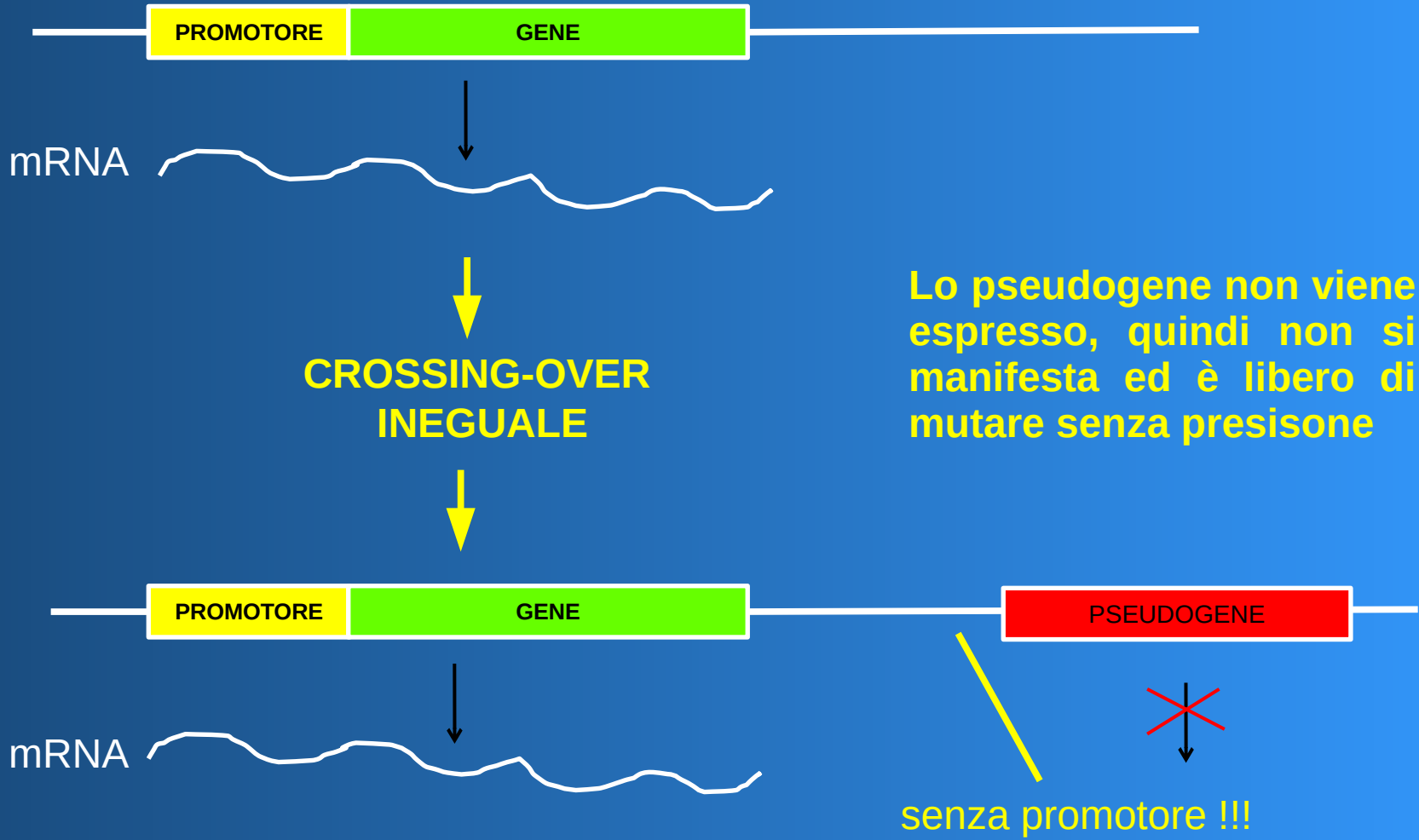
Ineguale



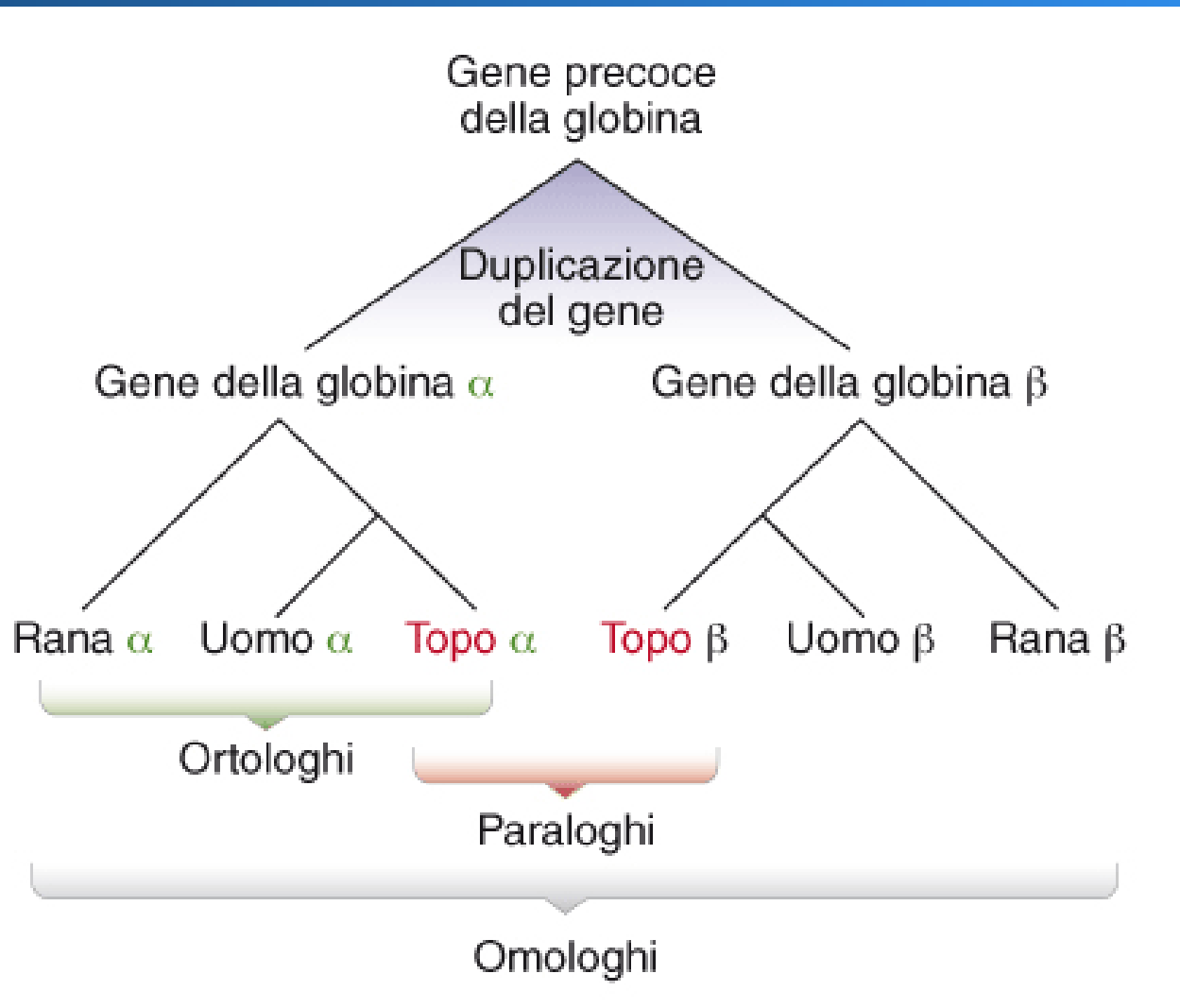
Crossing over disuguale



Creazione di geni paraloghi

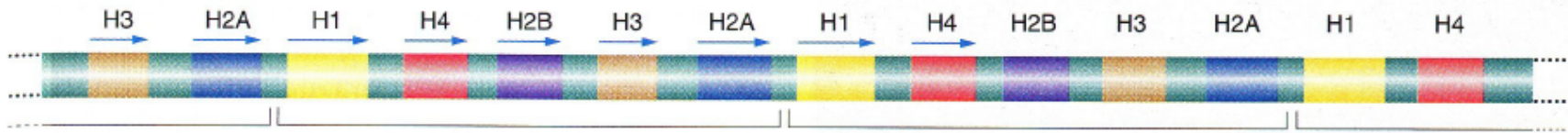


Creazione di geni paraloghi

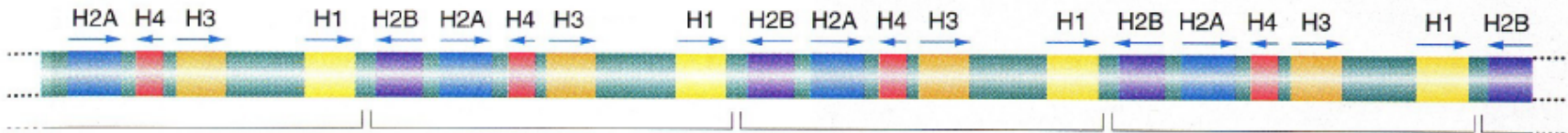


Geni per istoni

Geni per gli istoni di riccio di mare



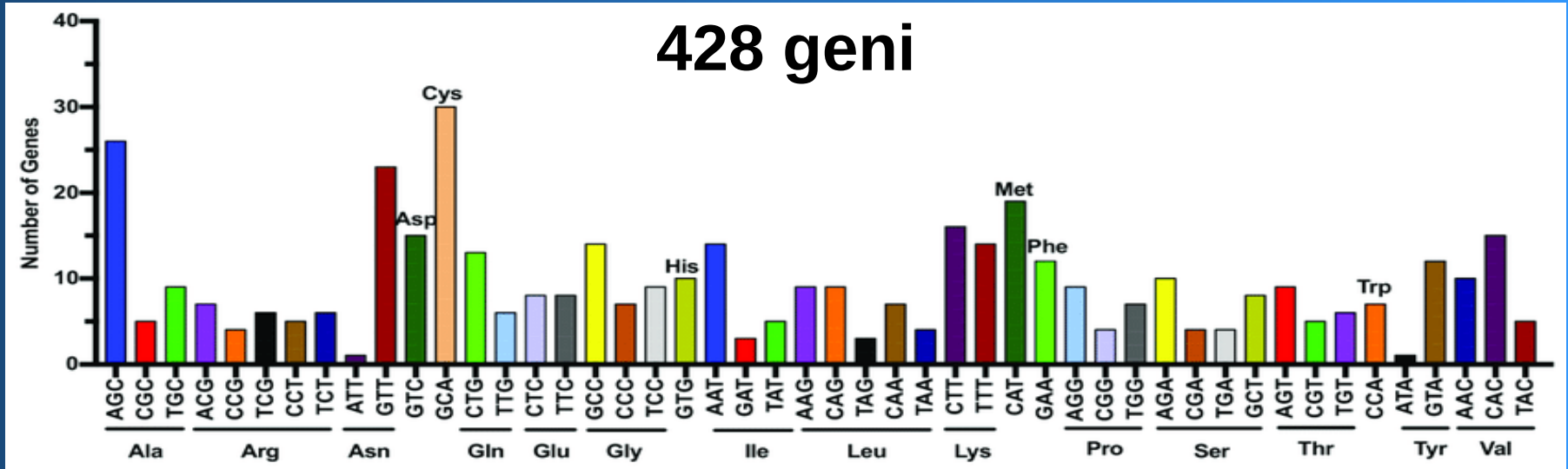
Geni per gli istoni di *Drosophila*



GENI RIPETUTI "IN TANDEM"

- 30-40 x uomo
- 100 x *Drosophila*
- 300 x riccio di mare

Geni per i tRNA



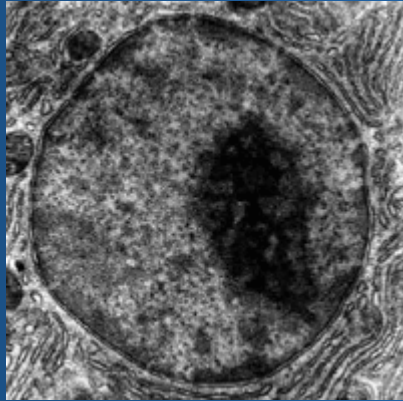
I geni per i tRNA citoplasmatici sono raggruppati in

49 famiglie

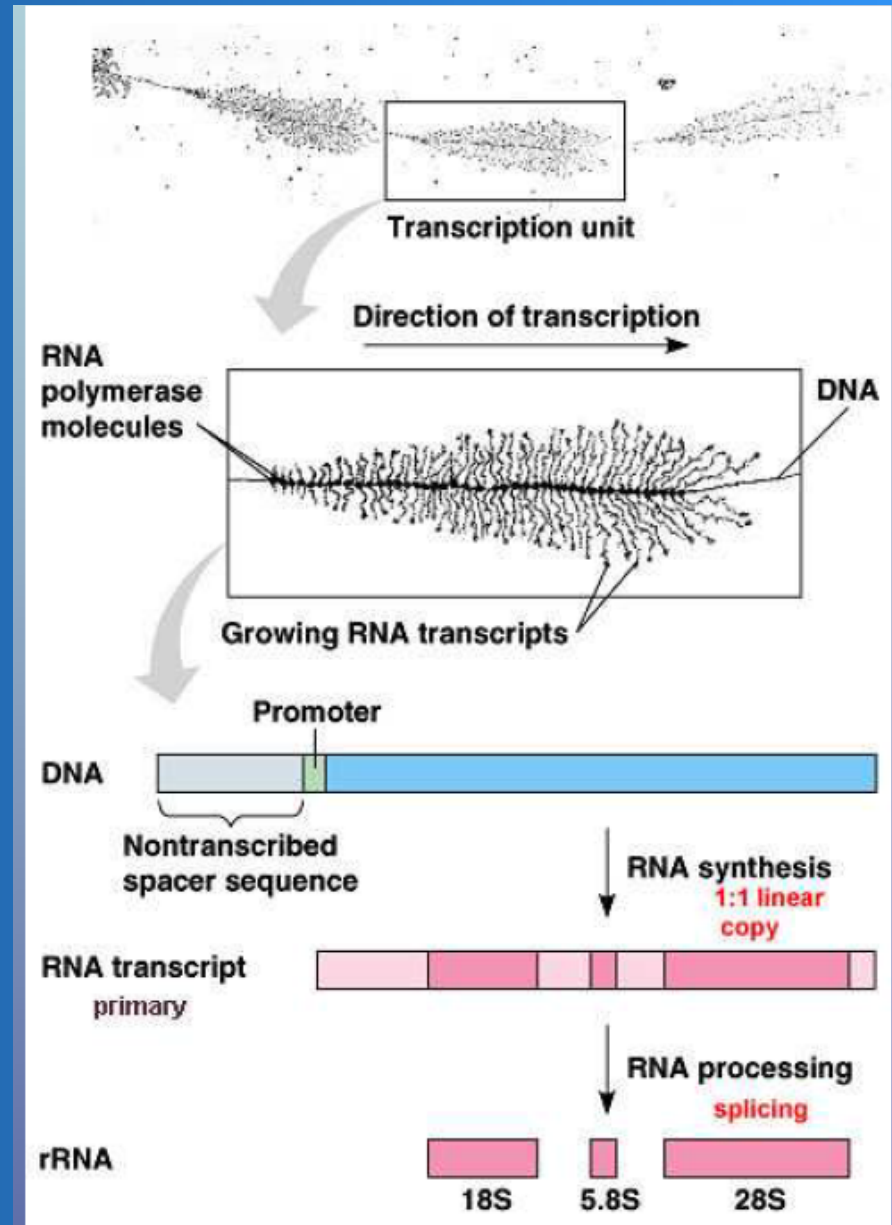
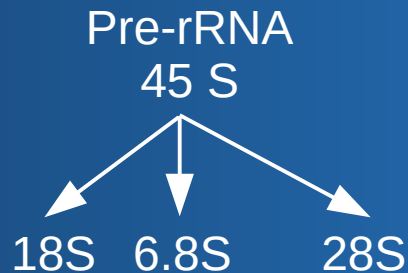
secondo le caratteristiche del loro anticodone.

Si trovano su tutti i cromosomi tranne 22 ed Y

Geni per RNA ribosomiali



NEL NUCLEOLO
Trascritti dalla RNA polimerasi I come unico precursore di 45 S e processati con l'aiuto di piccoli RNA (snoRNA)



Nel genoma umano

DNA "GENICO" ~ 37 %

Geni singoli
Cluster genici
Geni ripetuti in tandem (istoni, tRNA, rRNA)
Pseudogeni

DNA RIPETITIVO ~ 60 %

non trascritto

Mediamente ripetitivo (trasposoni)
Altamente ripetitivo (DNA satellite)

DNA NON CLASSIFICABILE ~ 3 %

Distribuzione funzionale dei geni

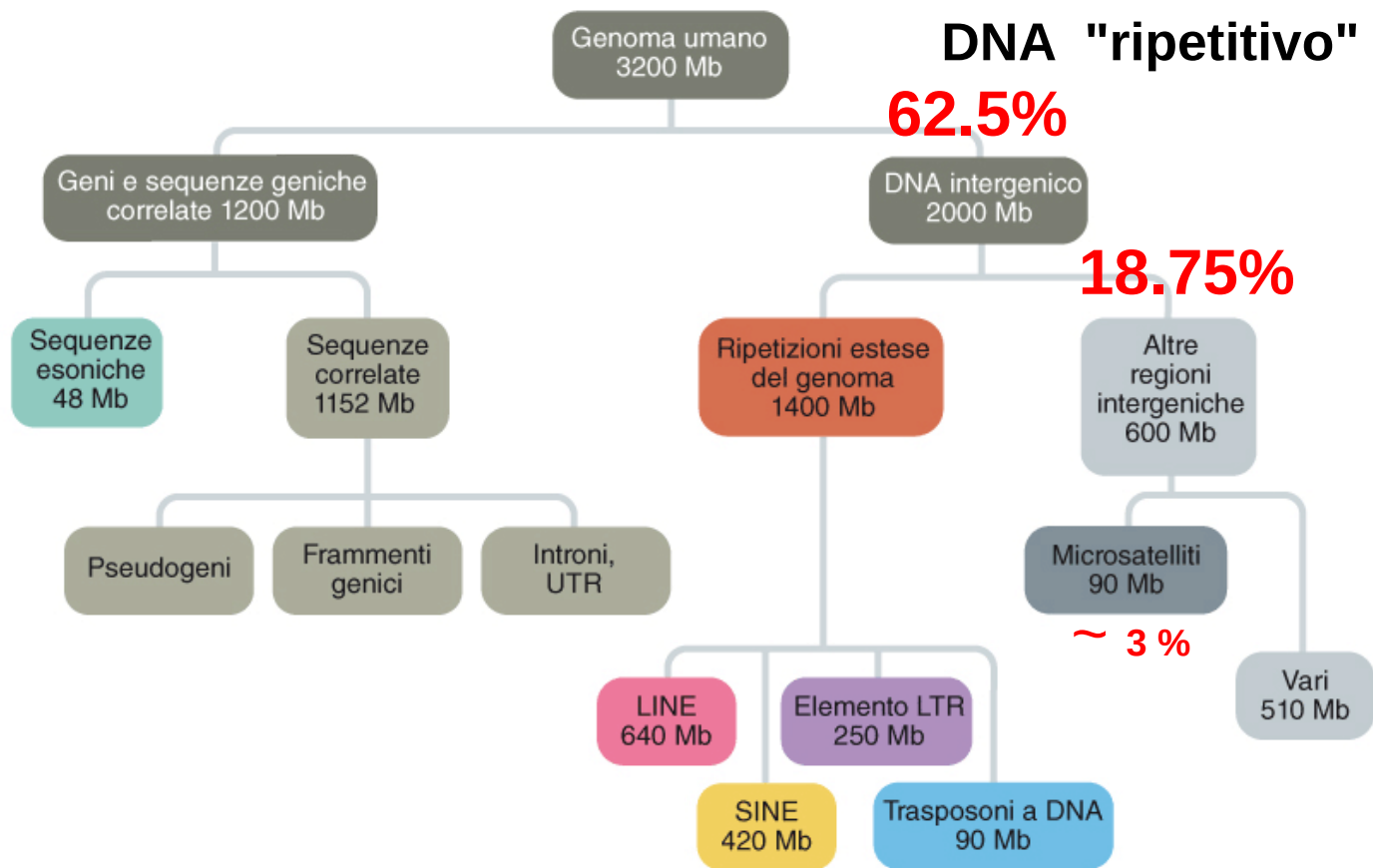


FIGURA 4.14 ▲ Organizzazione del genoma umano.

Sequenze ripetute nel genoma umano

ALTAMENTE RIPETITIVE

DNA MICROSATELLITE



Estese ripetizioni di corte sequenze, spesso localizzate in particolari distretti, numero totale limitato, circa 3%

MEDIAMENTE RIPETITIVE

TRASPOSONI



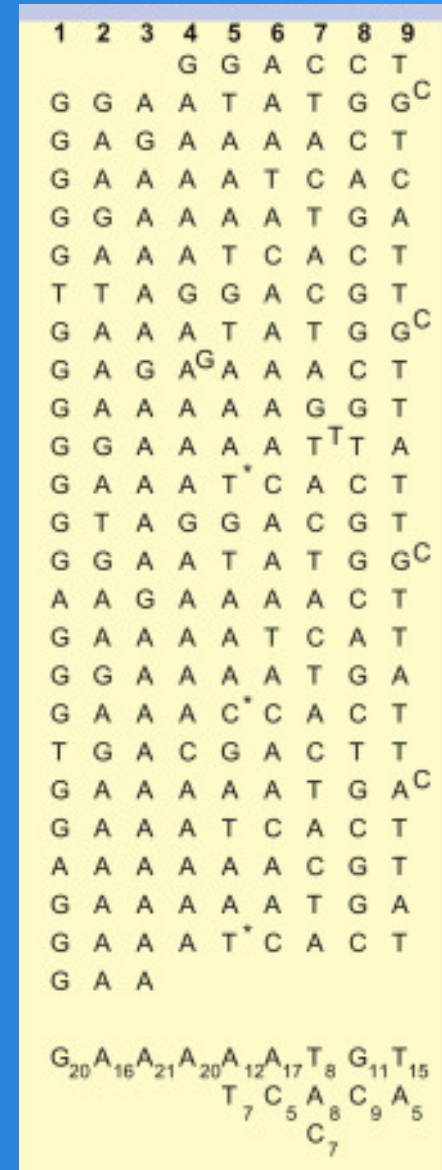
Ripetizioni di sequenze più lunghe disperse nell'intero genoma, molto numerose, circa 45%

Il DNA satellite

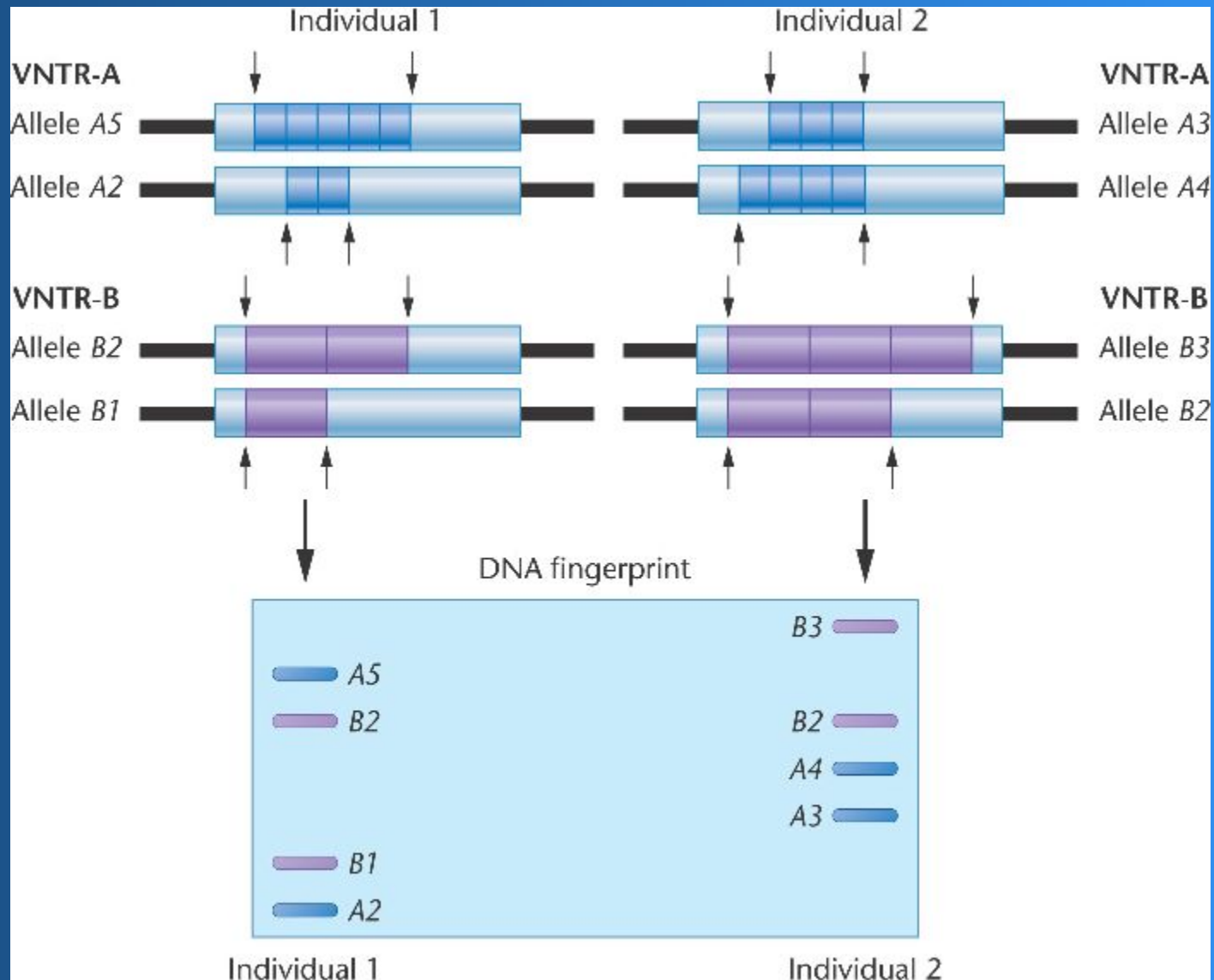
DNA altamente ripetitivo, a sequenza semplice

Nell'uomo occupano circa 4-6% del genoma.

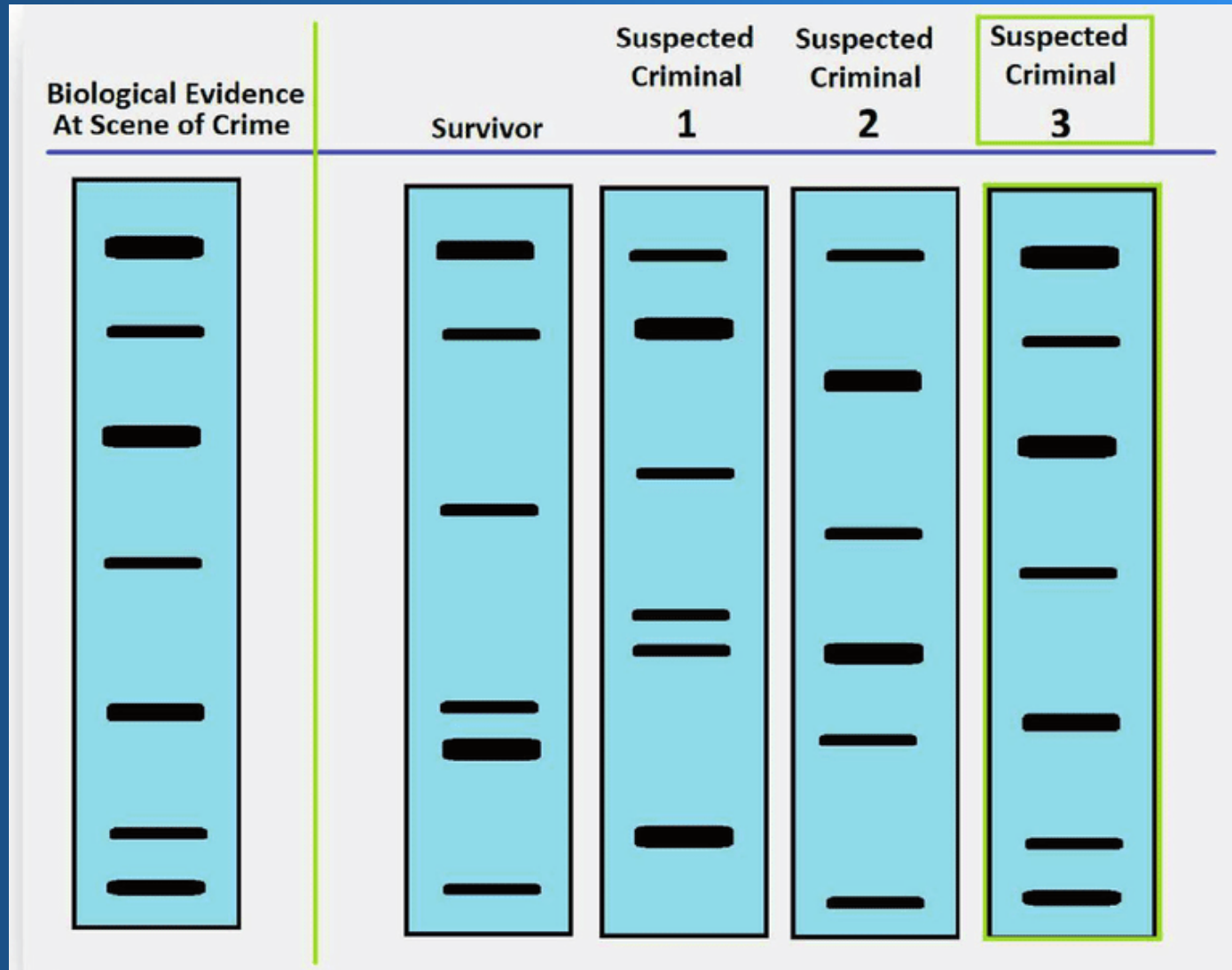
I microsattelliti sono regioni di 2-13 basi ripetute centinaia di volte



Analisi dei microsatelliti



Analisi forense con i microsatelliti



Distribuzione funzionale dei geni

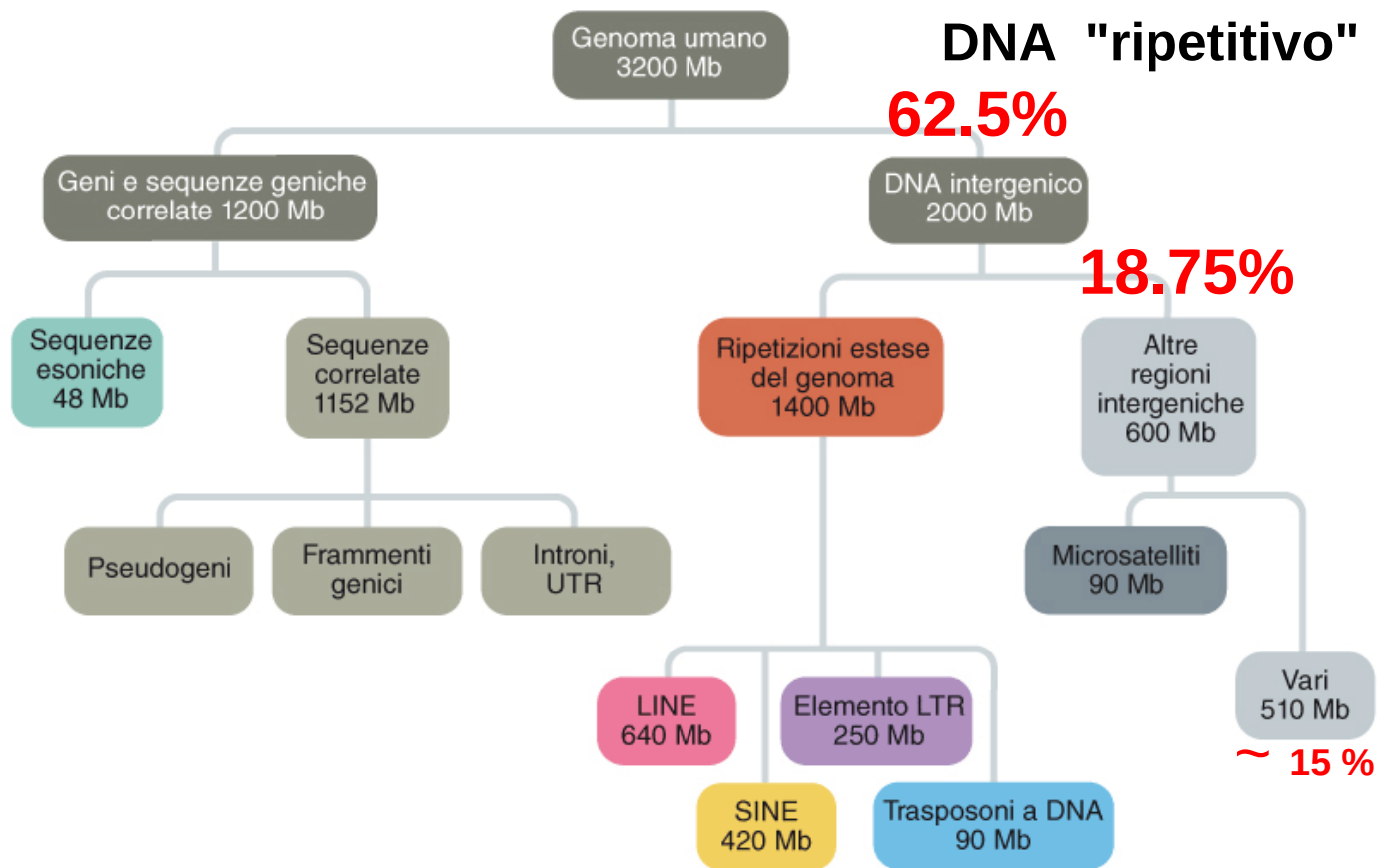


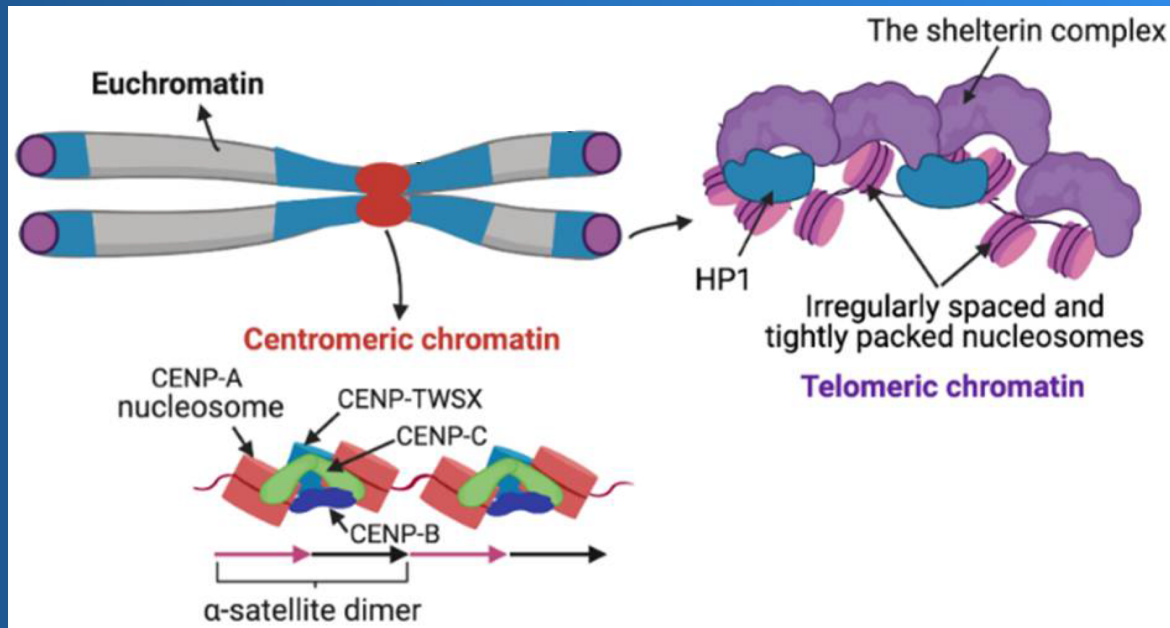
FIGURA 4.14 ▲ Organizzazione del genoma umano.

Regioni ripetute

DNA CENTROMERICO: ripetizioni di 171 basi (alphoid) che favoriscono il contatto con gli istoni CENP durante la duplicazione cellulare

MINISATELLITI: regioni sub-telomeriche di < 100 bp altamente polimorfiche

TELOMERI: circa 1000 ripetizioni di una corta sequenza TTAGGG che interagisce con il complesso shelterin.



Distribuzione funzionale dei geni

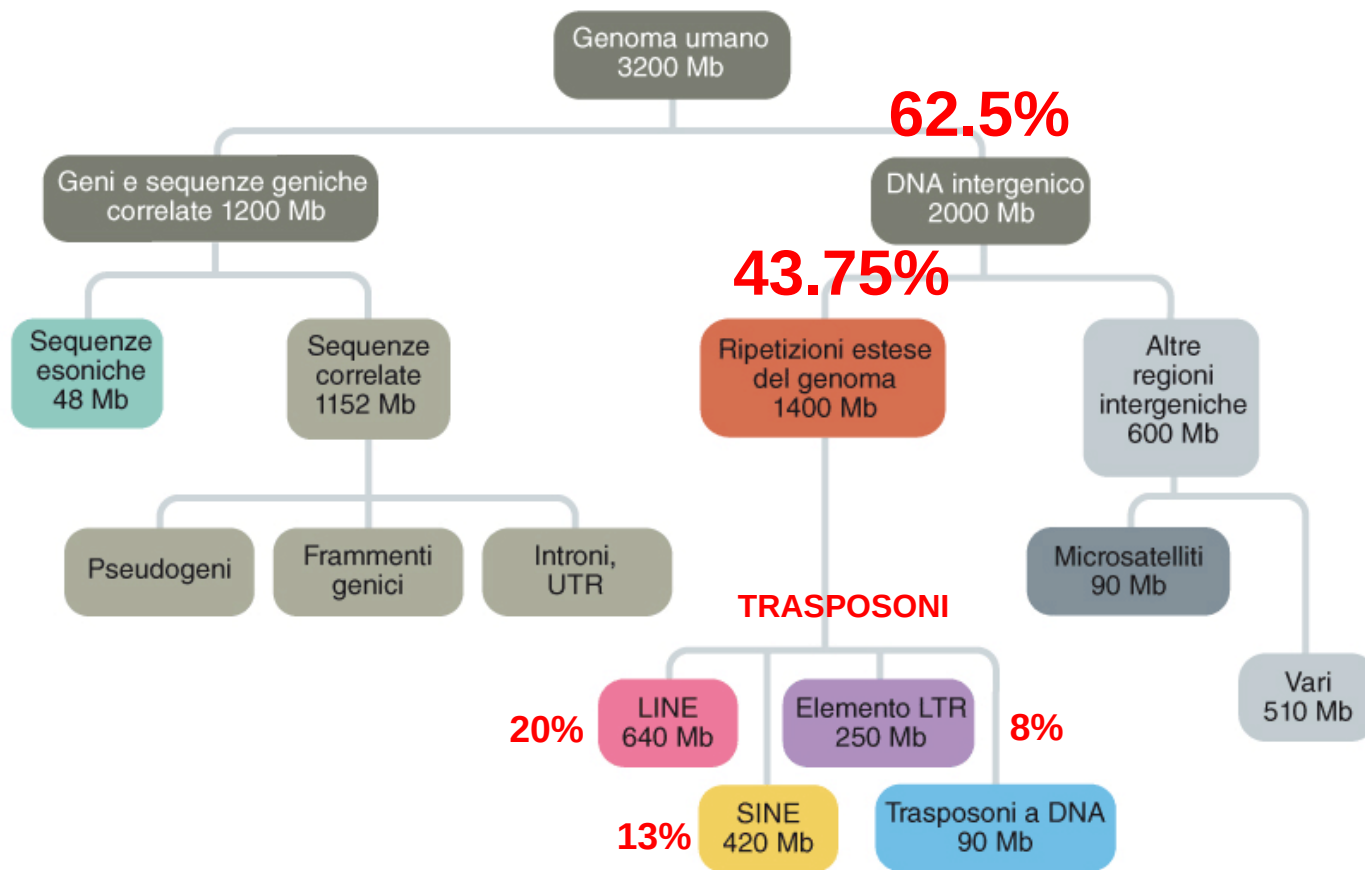


FIGURA 4.14 ▲ Organizzazione del genoma umano.

Il modello Zea mais

Ogni chicco è un embrione prodotto da un evento di fertilizzazione indipendente, quindi è come analizzare una enorme quantità di fratelli (non gemelli).

Si osservano chicchi di colori diversi tra fratelli: cosa è che controlla la pigmentazione?



Zea Mais

I trasposoni

Elementi ripetuti molto **abbondanti**

Elementi genetici **mobili**, presenti in tutti gli organismi, chiamati anche "jumping genes"

Sono considerati parassiti molecolari, dei "**selfish** genes"

Contengono geni che codificano per le attività di trasposizione

La maggior parte sono elementi "**fossili**", inattivi ma ancora riconoscibili

Promuovono il riarrangiamento di sequenze di DNA dell'ospite

>> **favoriscono l'evoluzione** <<
?!?!



Barbara McClintock
(1902 -1992)
Premio Nobel nel 1983

Classi di trasposoni

RNA

CLASSE I

- **Retrotrasposoni virali**

elementi Ty (lievito)
elementi copia (Drosophyla)

- **Retrotrasposoni non virali**

elementi LINE e SINE (mammiferi)
sequenza Alu (uomo)

DNA

CLASSE II

- **Rari nell'uomo, comuni nei batteri**

- **Trasposoni batterici**

Tn9 (resistenza cloramfenicolo)

- **Trasposoni eucariotici:**

elemento P in Drosophila
elementi Ac e Ds nel mais

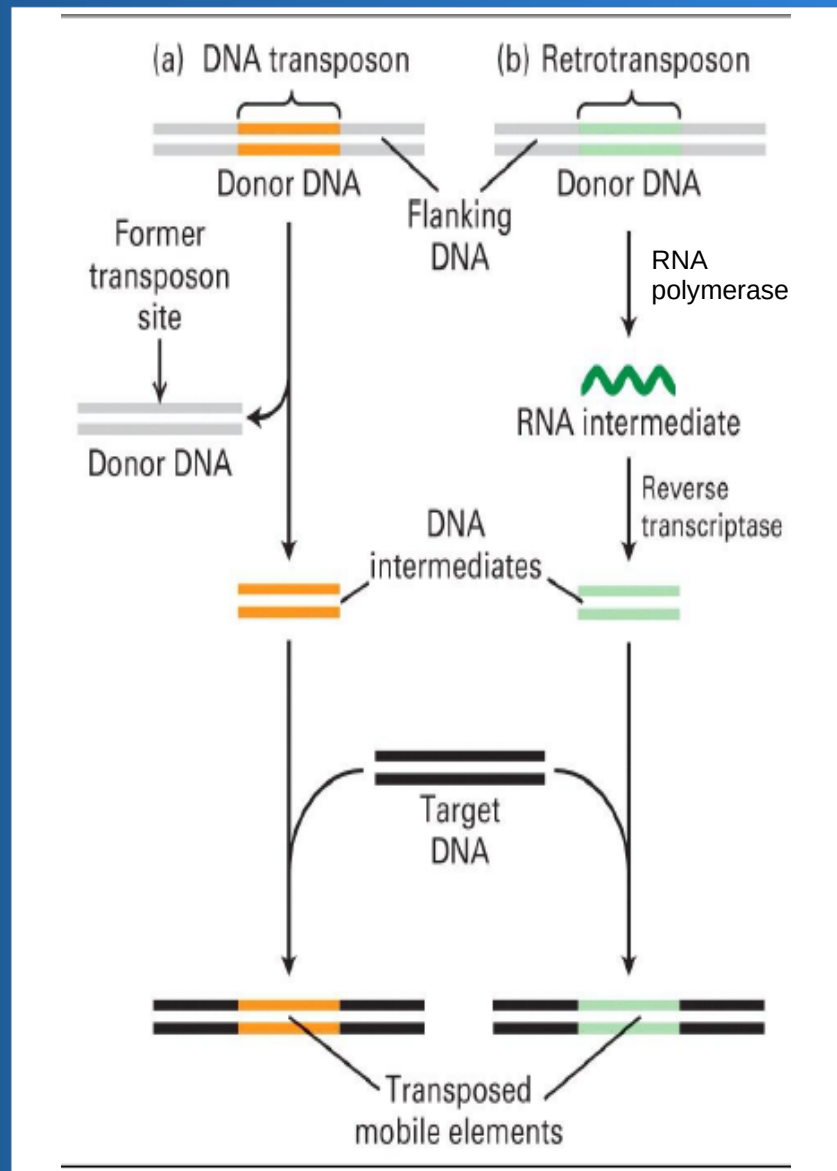
Meccanismi di trasposizione

TRASPOSONE A DNA

due possibili
modi per
"muoversi"

- ✓ copia/incolla
(replicativo)
- ✓ taglia/incolla
(trasposasi)

frequente in
batteri



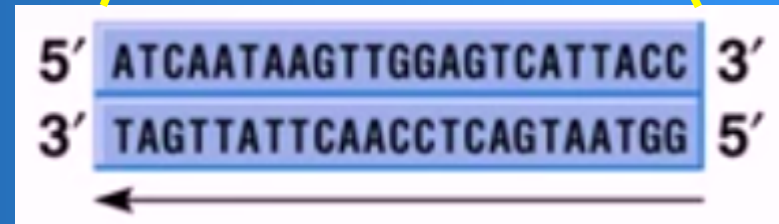
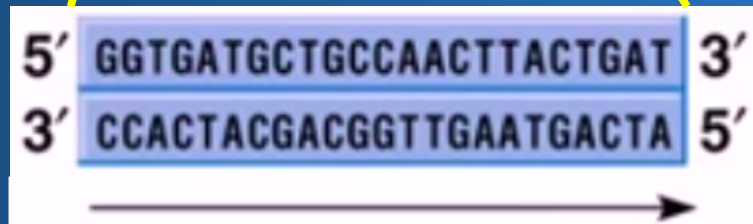
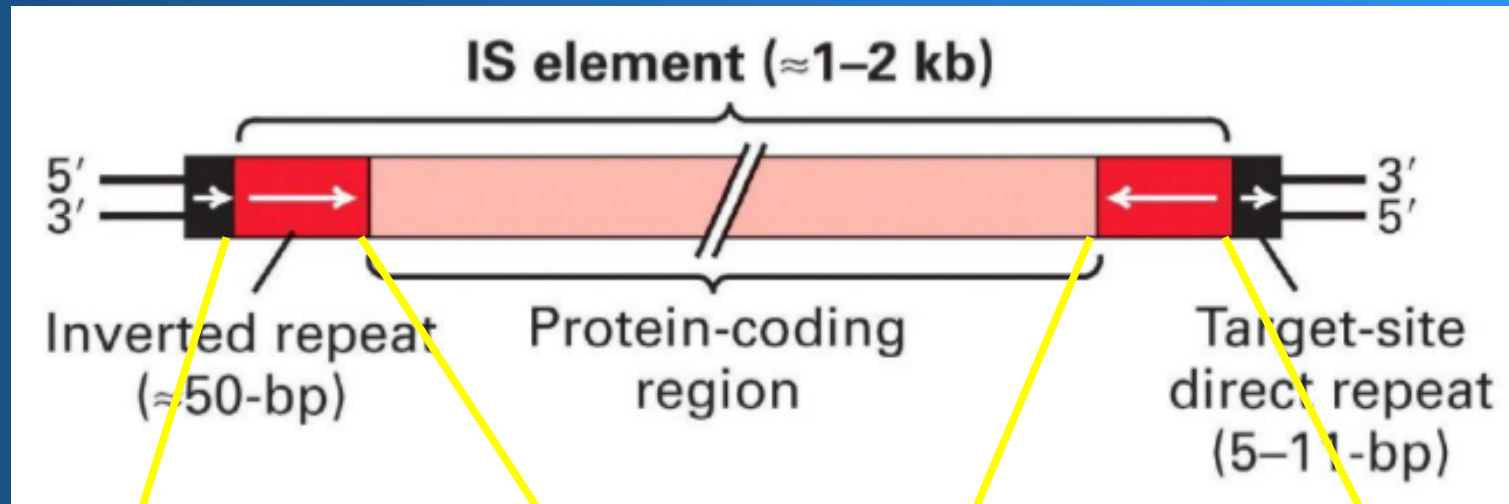
RETRO TRASPOSONE

un solo modo
di "muoversi":

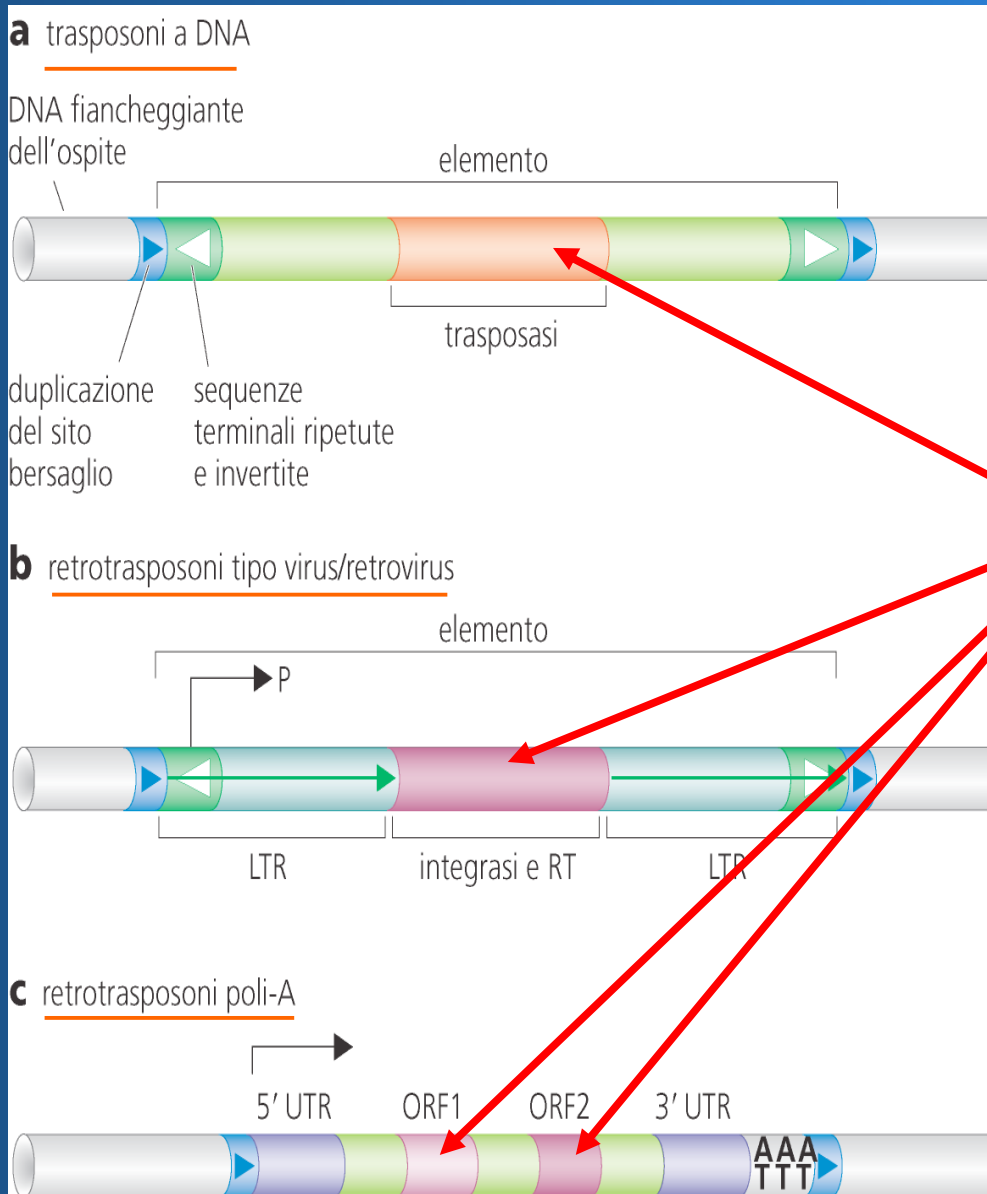
- ✓ trascrizione
- ✓ retro trascrizione
- ✓ integrazione

frequente in
eucarioti

Elementi IS (insertion sequences)

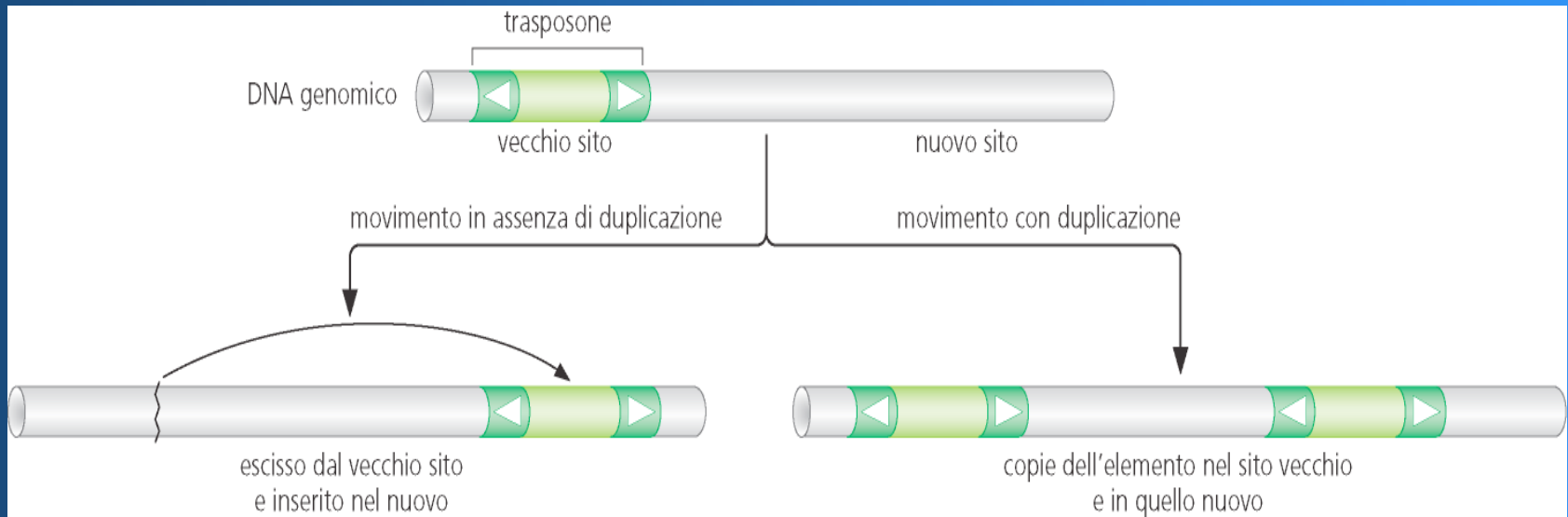


I trasposoni portano sequenze codificanti



Sequenze
codificanti
per proteine utili
alla trasposizione

Trasposoni con intermedio a DNA



NON REPLICATIVO

REPLICATIVO

I sistemi a RNA sono **SEMPRE** replicativi perchè devono essere

- trascritti
- retrotrascritti
- integrati nel DNA

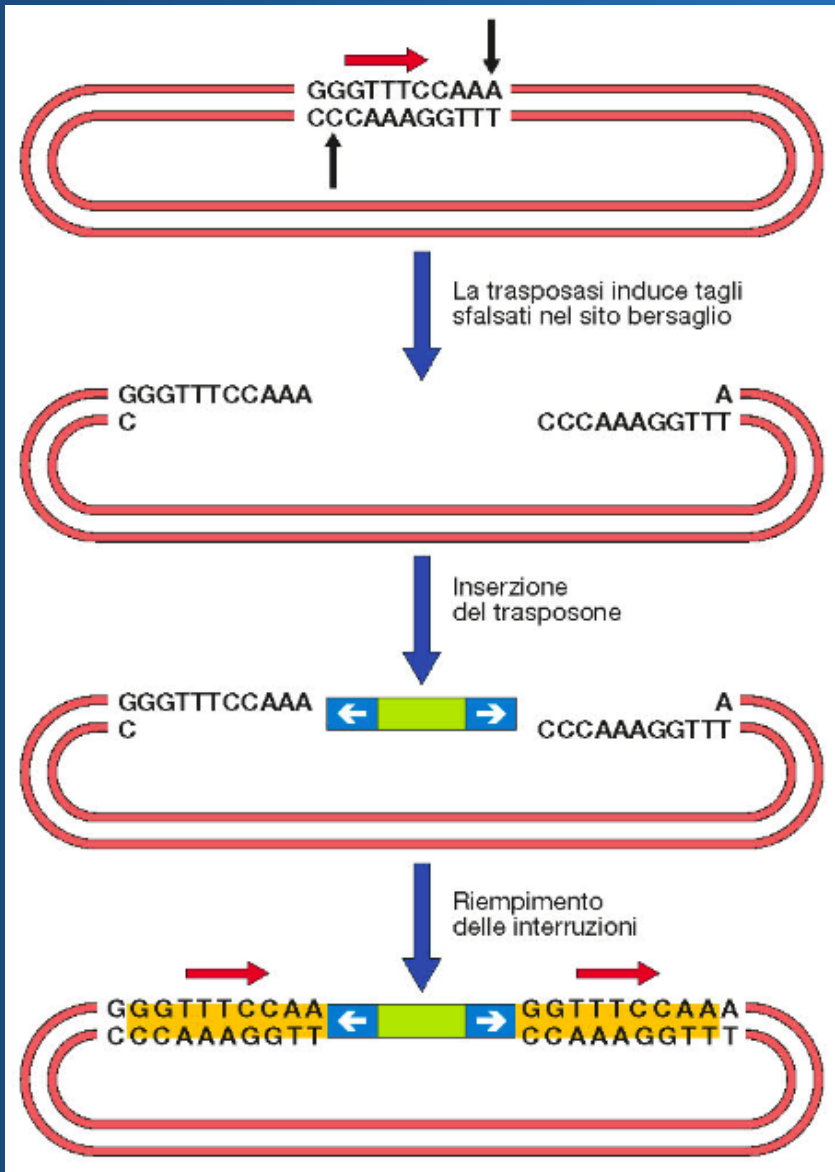
Meccanismo delle trasposasi (DNA)

In presenza di opportuni stimoli (es. stress, attivazione del ciclo cellulare) viene espressa la trasposasi

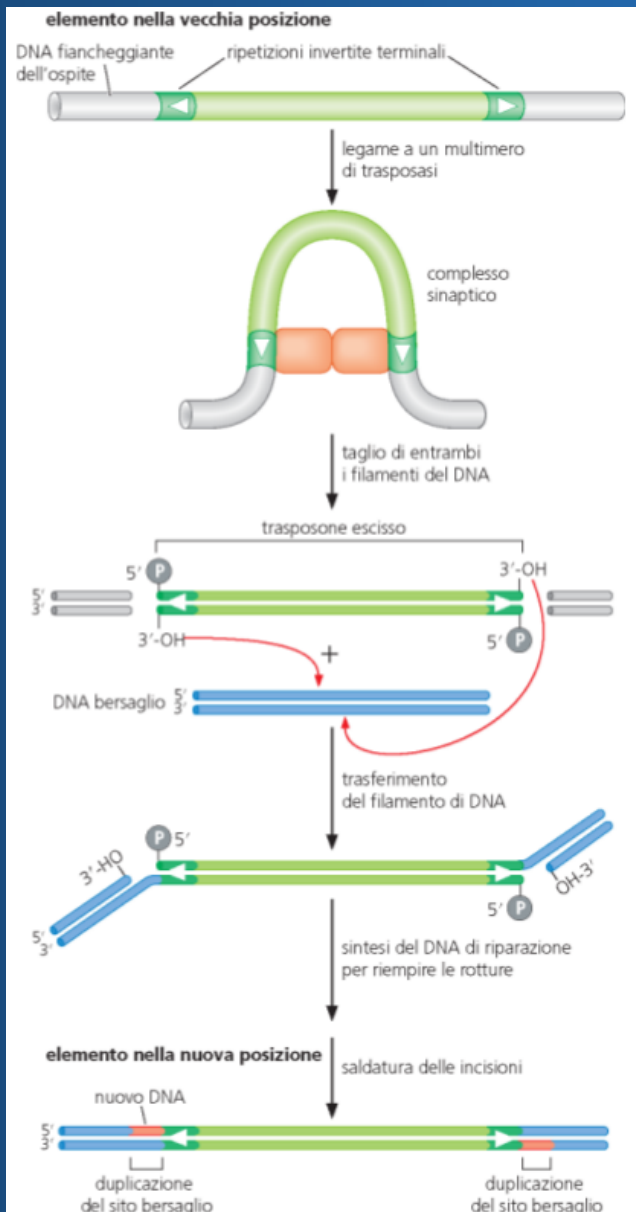
La trasposasi introduce tagli sfalsati in regioni casuali (non specifiche!) nel genoma

Il trasposone viene inserito in una regione bersaglio

Le estremità a singolo filamento vengono riparate



Il processo di trasposizione (DNA)



Il trasposone presenta sequenze ripetute invertite alle estremità

Le trasposasi legano le inserzioni e le collegano (complesso sinaptico) piegando il DNA.

Il DNA uscente viene exciso e "cerca" un sito bersaglio. Il DNA aperto rimanente viene riparato.

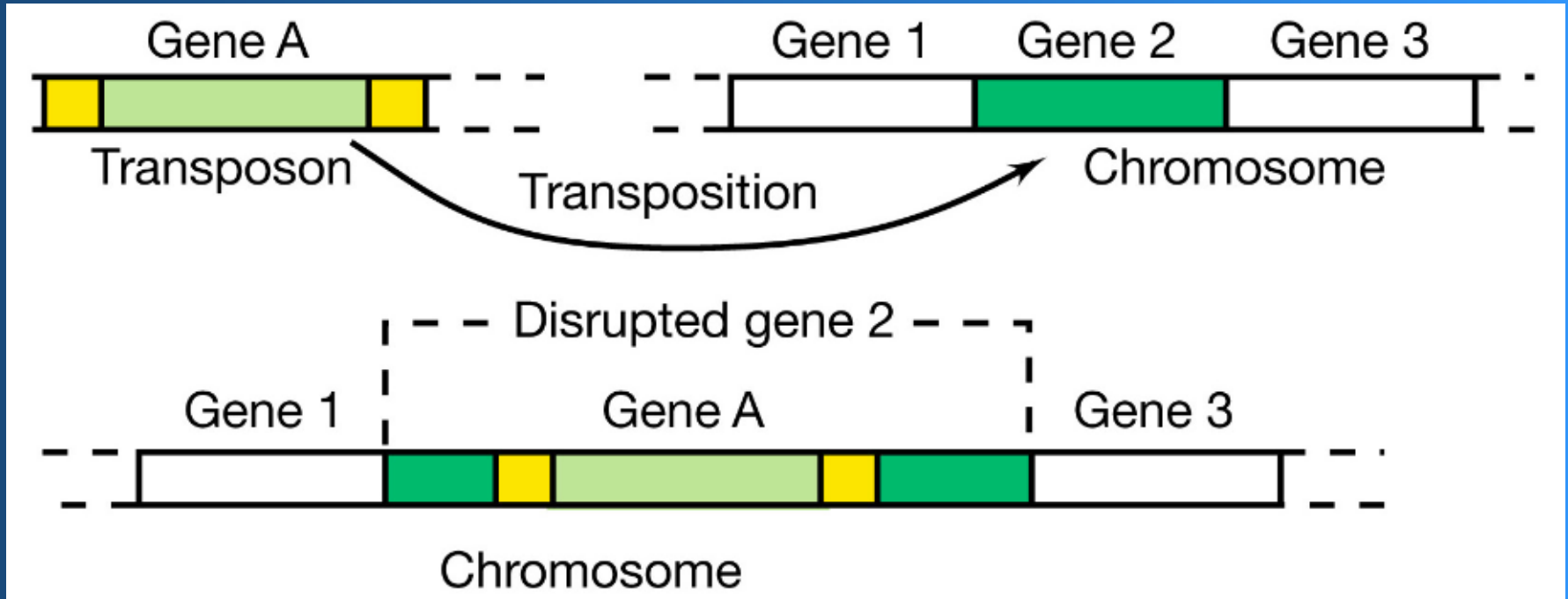
L'integrazione (transesterificazione doppia) lascia le estremità 3'OH del sito bersaglio esposte.

Il sistema di riparazione del DNA riempie le incisioni e le ligasi operano la saldatura.

Trasposizione e resistenza agli antibiotici

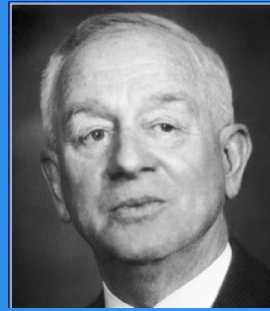
Transposable Element	Antibiotic Resistance
Tn3	Ampicillin
Tn5	Kanamycin
Tn7	Trimethoprim, Streptothricin, Spectinomycin, Streptomycin
Tn9	Chloramphenicol
Tn10	Tetracycline
Tn903	Kanamycin
Tn1681	Heat Stable (ST) Toxin

Altre conseguenze della trasposizione

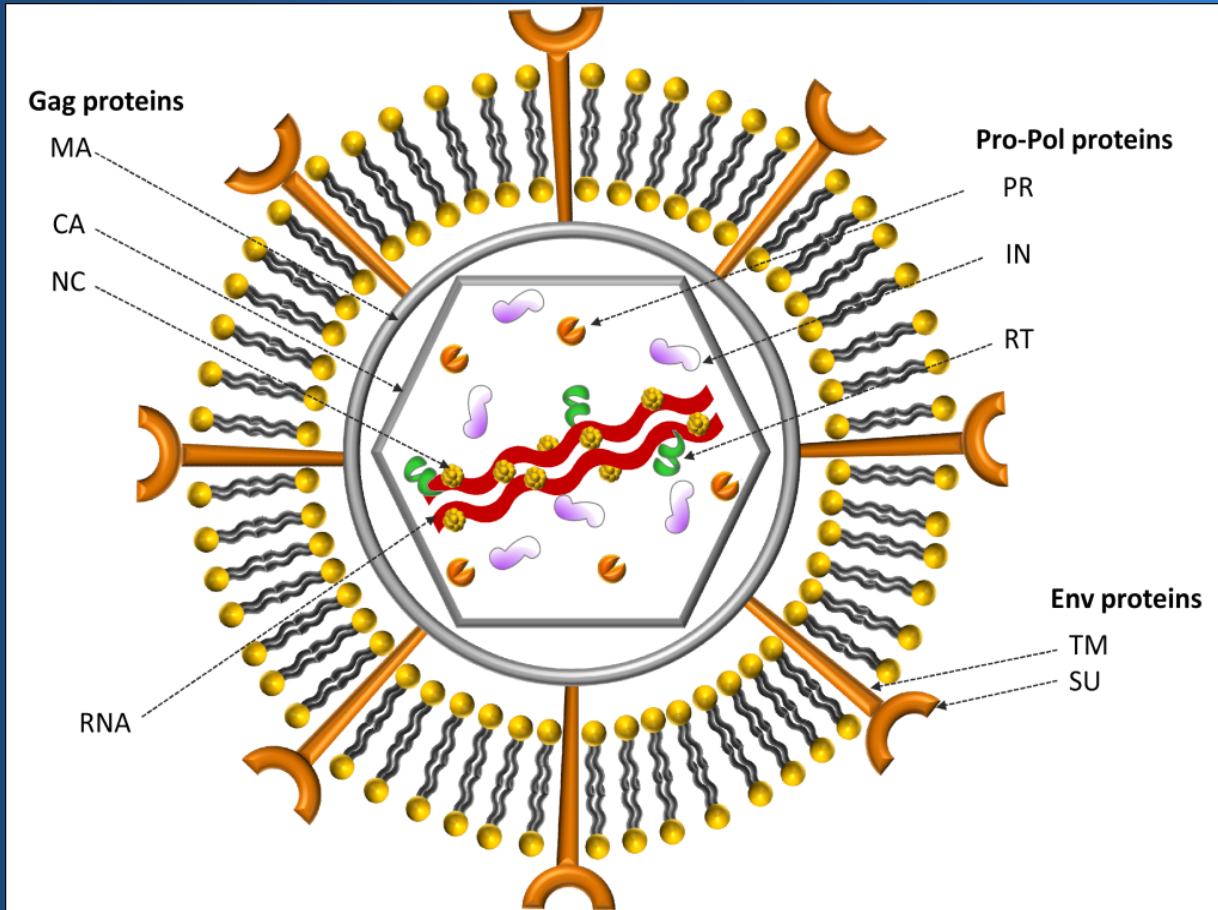


I retrovirus

I retrovirus sono un gruppo di virus che utilizza la **trascrittasi inversa** (copia RNA in DNA) per convertire il proprio genoma da RNA a DNA durante il proprio ciclo di replicazione virale.



Peyton Rous
Nobel 1966

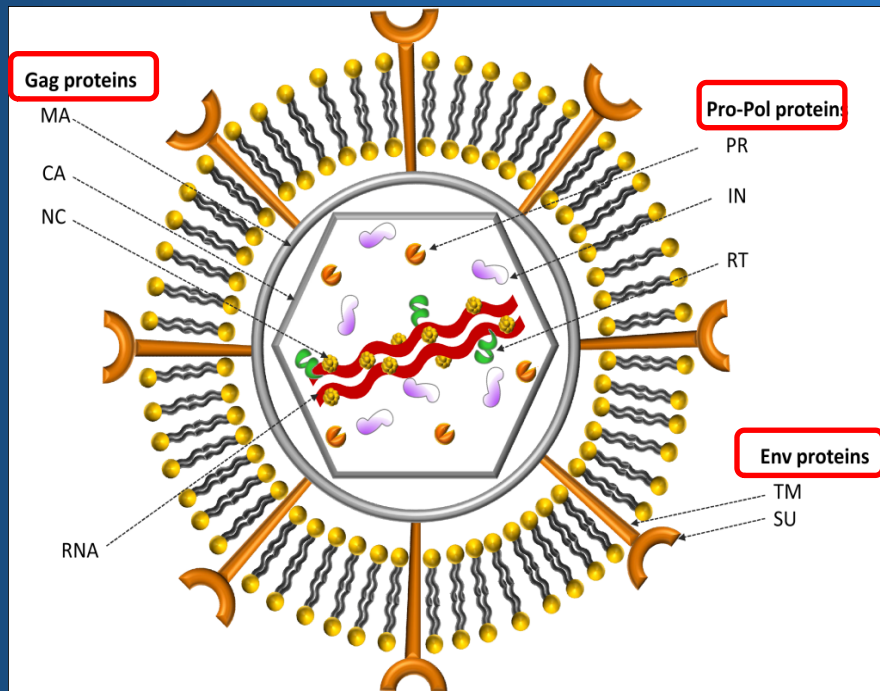
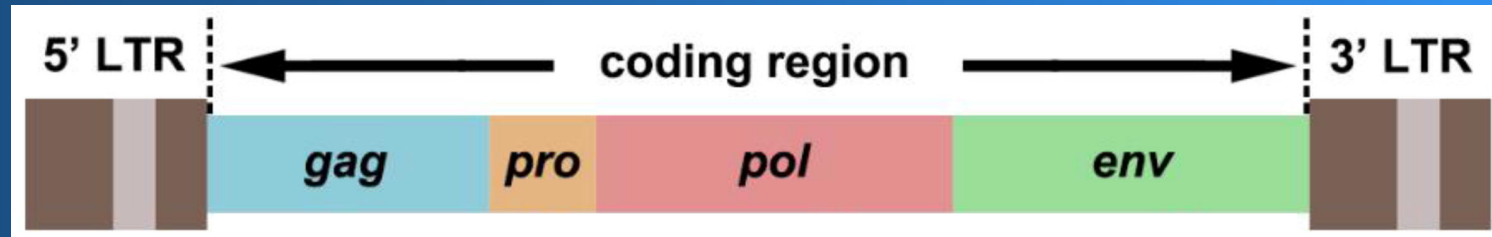


Le proteine virali sono codificate nel genoma ma anche presenti in forma solubile nel capside



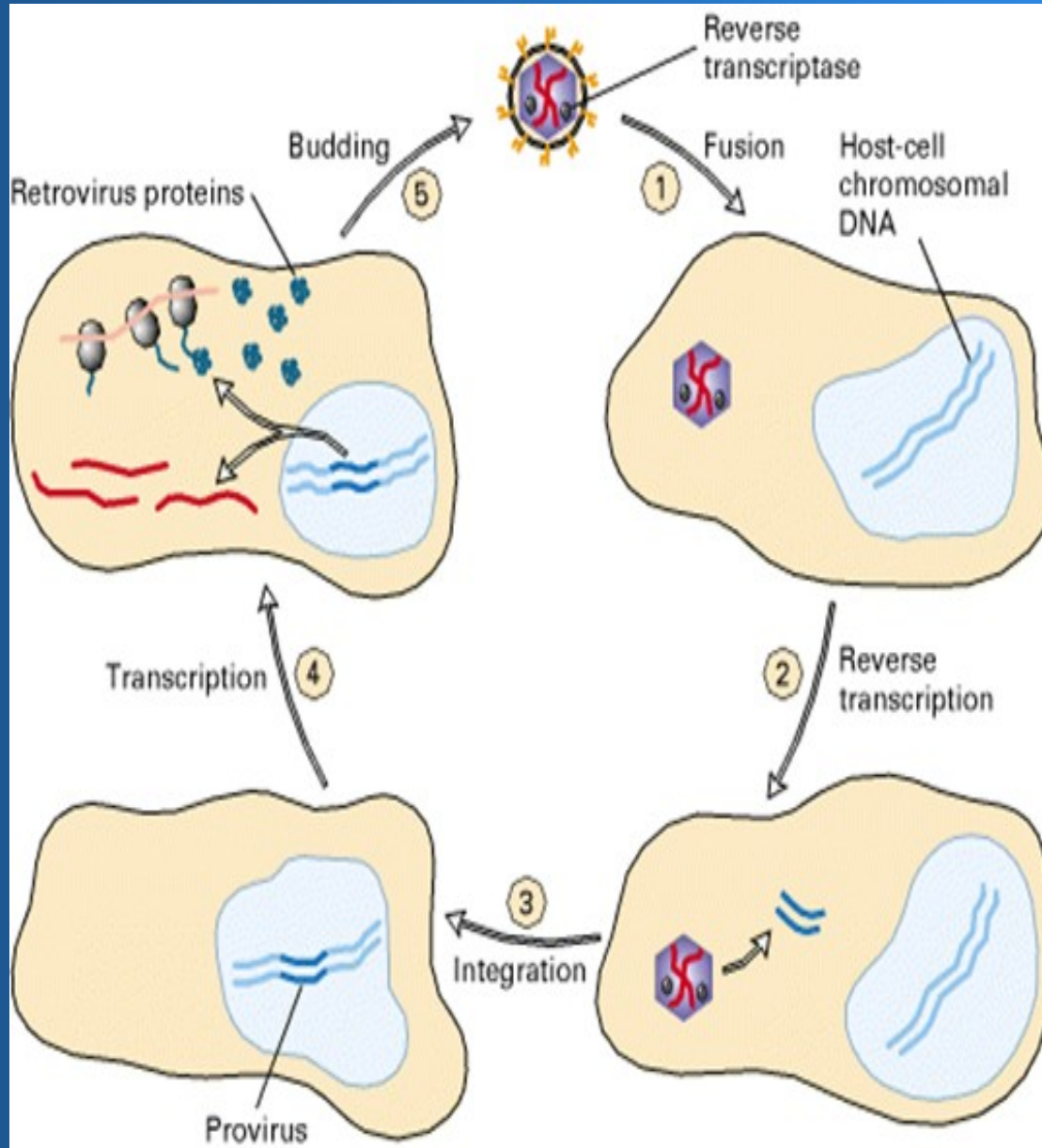
In seguito a infezione vengono rilasciate in forma attiva nel citoplasma dell'ospite

Il genoma del retrovirus



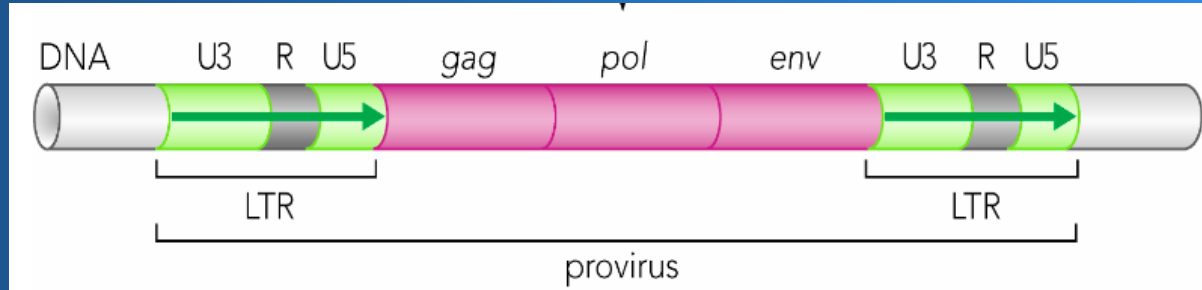
- GAG**
 - MA: matrix
 - CA: capsid
 - NC: nucleocapsid
- PRO**
 - PR: protease
- POL**
 - RT: reverse transcriptase
 - IN: integrase
- ENV**
 - SU: surface
 - TM: transmembrane

Ciclo replicativo dei retrovirus

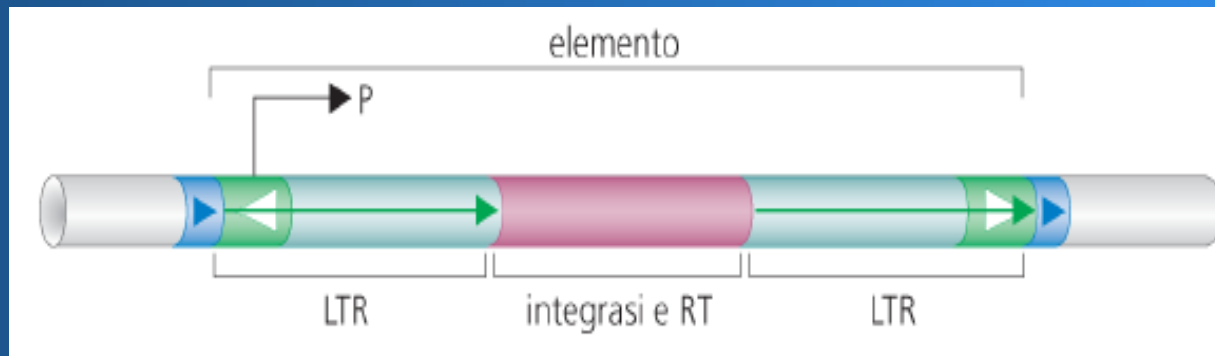


Retrotrasposoni

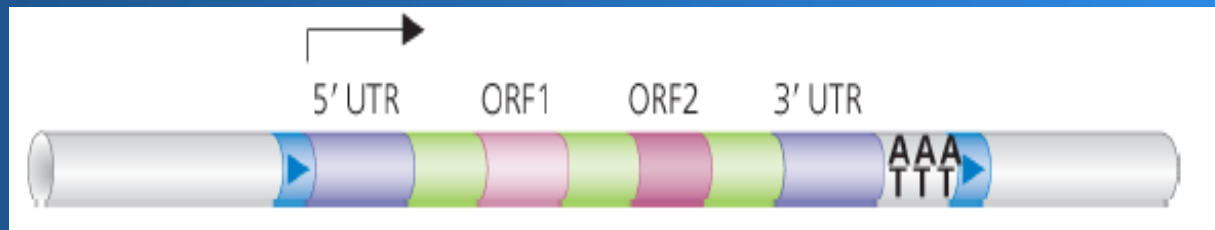
Retrovirus



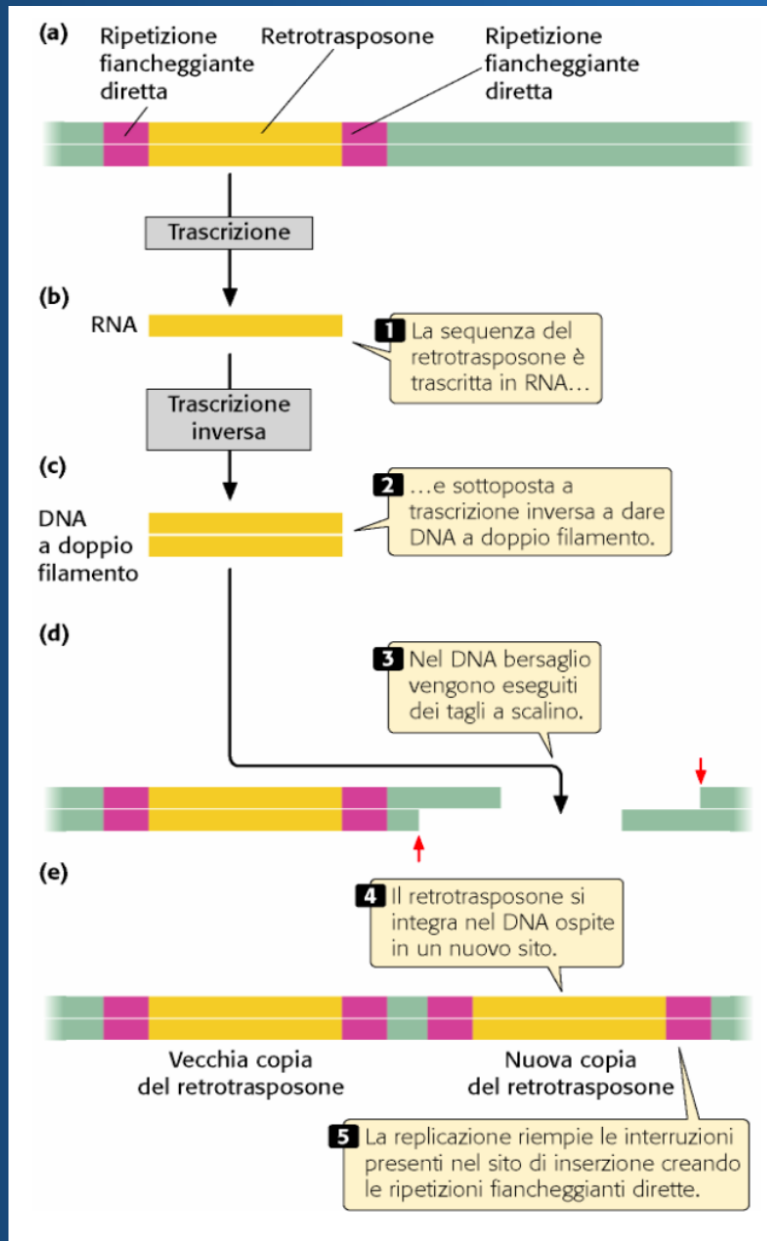
Retrotrasposone LTR – long terminal repeats



Retrotrasposone Poly-A



Reazione di retrotrasposizione



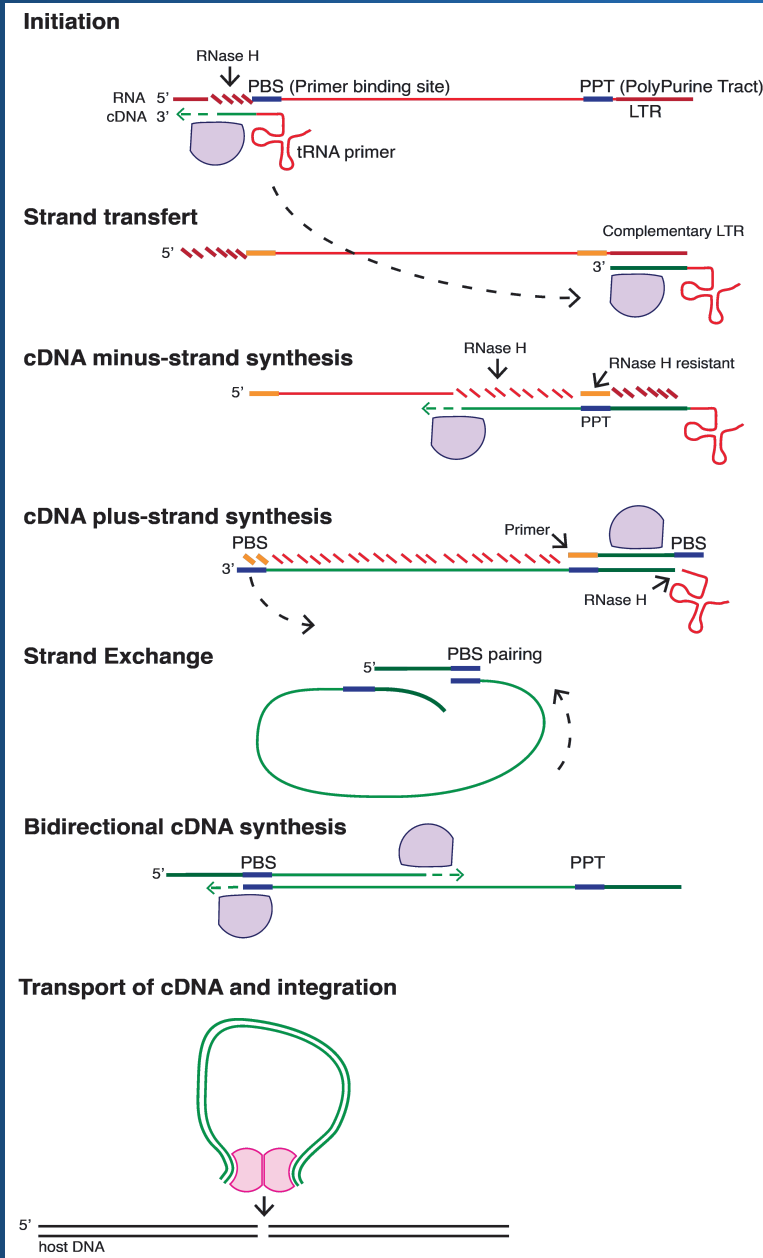
Il retrotrasposone viene trascritto dalla **RNA polimerasi II**

Una **trascrittasi inversa** copia lo stampo di RNA in DNA a doppio filamento

Una zona diversa da quella di partenza viene tagliata lasciando delle estremità adesive (sticky)

Il retrotrasposone si integra e il sistema di riparazione del DNA sigilla

Retrotrasposoni LTR



La trascrittasi inversa necessita di un primer.

Il trasposone viene retrotrascritto usando un tRNA che funge da primer per il primer binding site (PBS) al 5'. Si forma un breve filamento DNA+

Il filamento migra al 3' dove si appaia con una regione primer resistente alla RNasi H e produce il filamento di DNA- complementare all'RNA stampo originale. La RNasi H degrada l'RNA ibrido.

Raggiunto il 5' ho due regioni complementari che possono appaiarsi (strand exchange) e far avviare la sintesi del DNA+ intero. La DNA polimerasi lavora in modo bidirezionale.

La molecola DNA ds viene internalizzata nel nucleo e integrata in un punto casuale del genoma grazie alla integrasi.

Alla fine del processo ho una nuova copia del trasposone originale

Retrotrasposoni con poly-A

detti anche “**non virali**”, non hanno sequenze invertite molto abbondanti nell'uomo

Sequenze LINE 20%

Long Interdispersed Nucleotide Elements

solo L1 (attive, 6-7 kb), L2 e L3 non attive da ~250 milioni di anni

┌ 15% del genoma
└ codificano RNA binding protein, RT e integrasi

Sequenze SINE

Short Interdispersed Nucleotide Elements, non autonome, si spostano usando le proteine delle L1

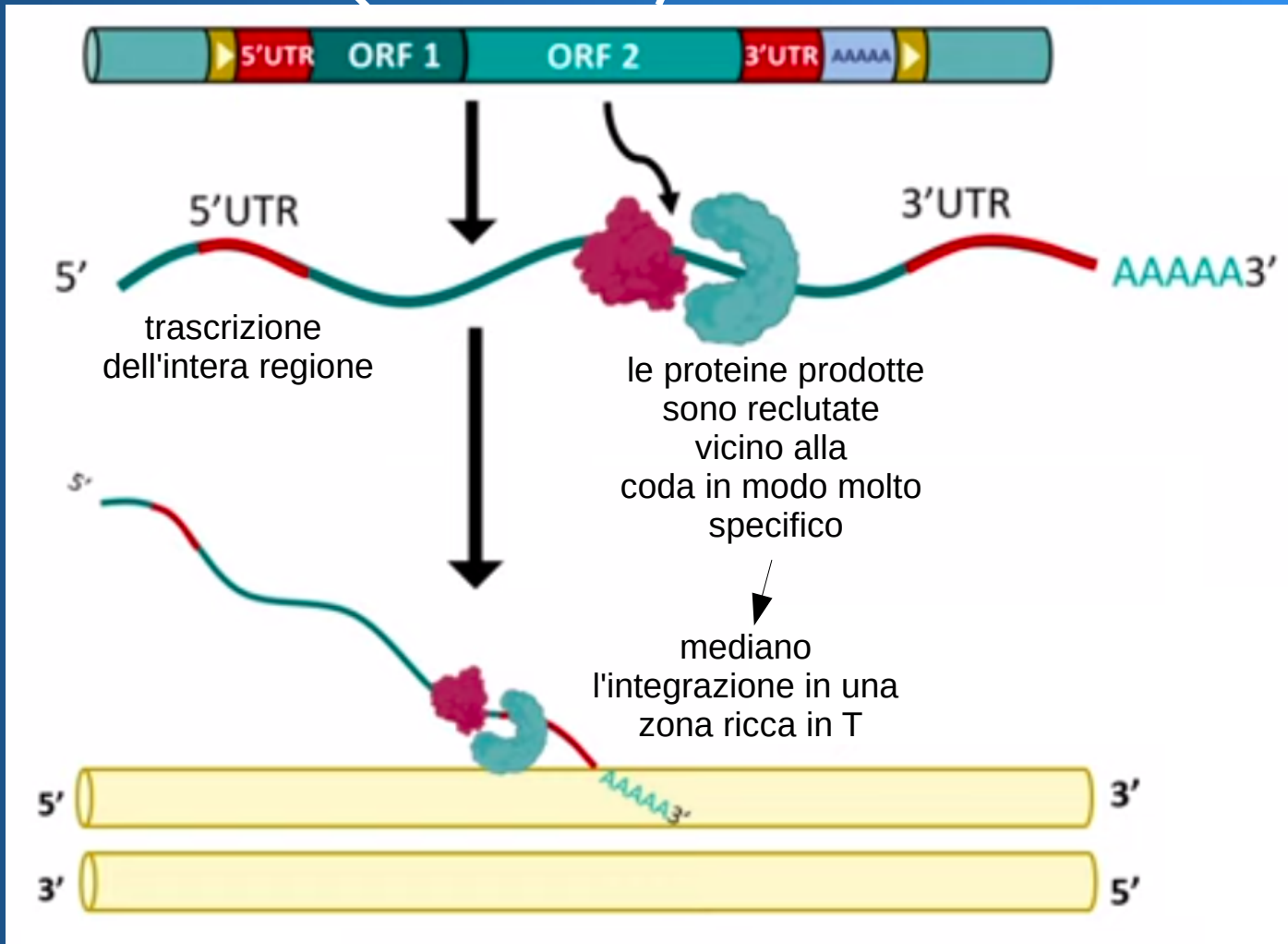
Sequenze ALU

300 basi x 10^6 ripetizioni, **10% del genoma**, 30% delle metilazioni umane (sono ricche in GC)

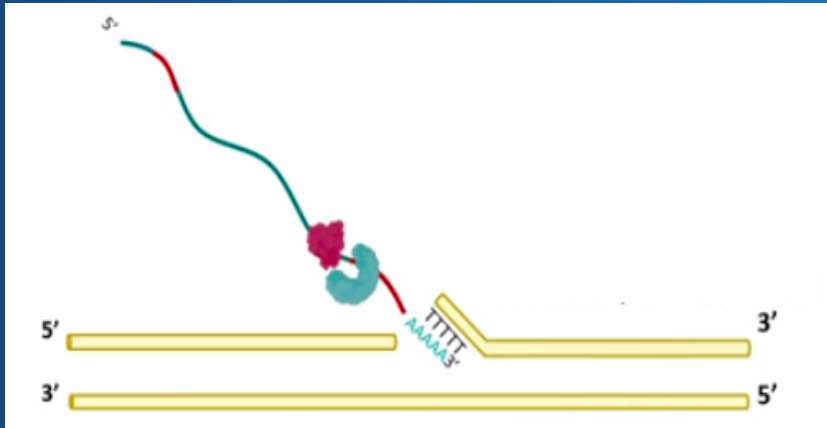
Trasposizione di una LINE

RNA binding protein

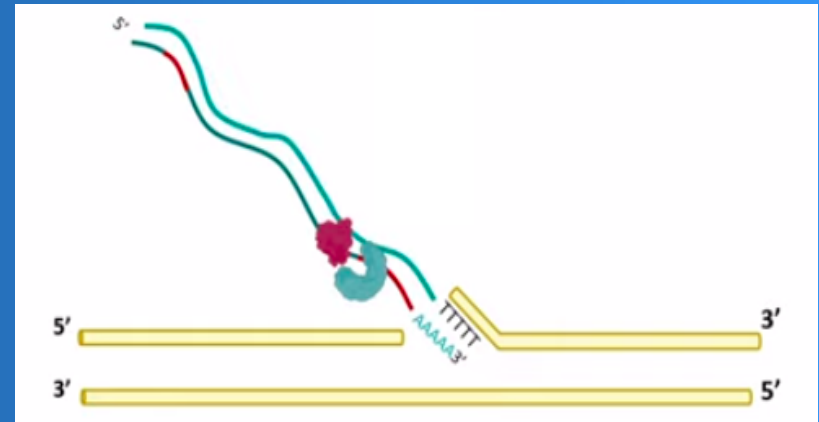
endonucleasi e trascrittasi inversa



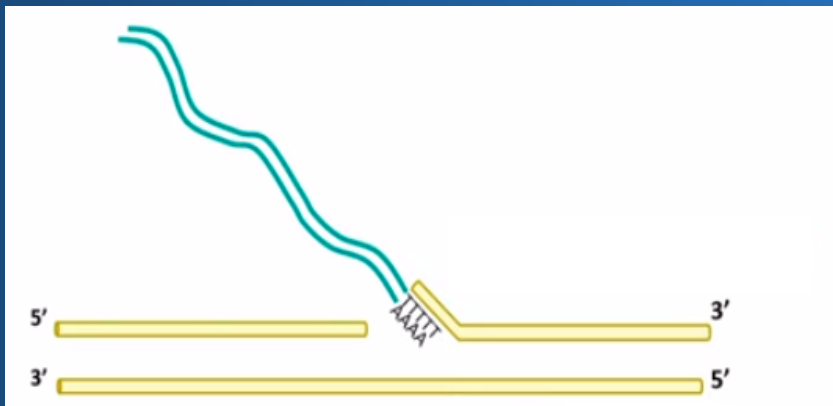
Trasposizione di una LINE



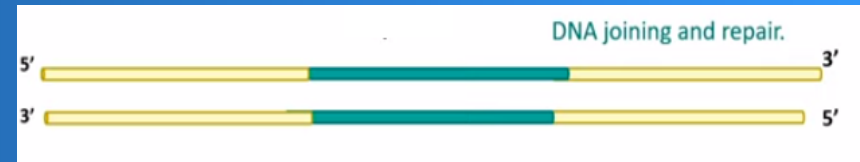
Il sito di ingresso viene tagliato formando un ibrido DNA/RNA



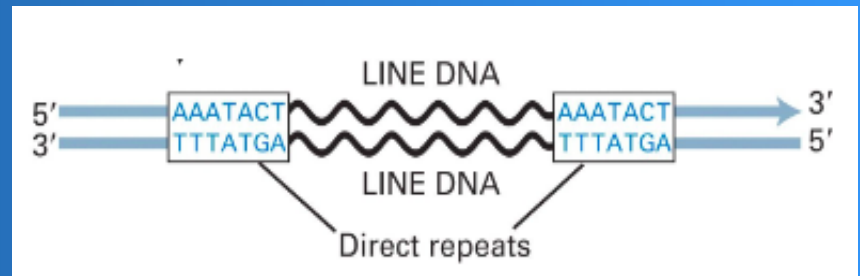
La trascrittasi inversa polimerizza il filamento senso di DNA



Un DNA polimerasi sintetizza il filamento complementare



Il meccanismo di riparazione del DNA chiude l'integrazione del trasposone



Tipi di RNA

Costitutivi (housekeeping)

- ✓ rRNA ribosomal, traduzione (anche procarioti)
- ✓ tRNA transfer, traduzione (anche procarioti)
- ✓ snRNA small nuclear, splicing
- ✓ snoRNA small nucleolar, assemblaggio ribosomi
- ✓ 7SL RNA secrezione delle proteine

mRNA (anche procarioti)

Regolativi

- ✓ miRNA micro
- ✓ siRNA small interfering
- ✓ lncRNA long non coding

Il flusso dell'informazione genetica

PROCARIOTI: controllo trascrizionale

EUCARIOTI: molti livelli di controllo

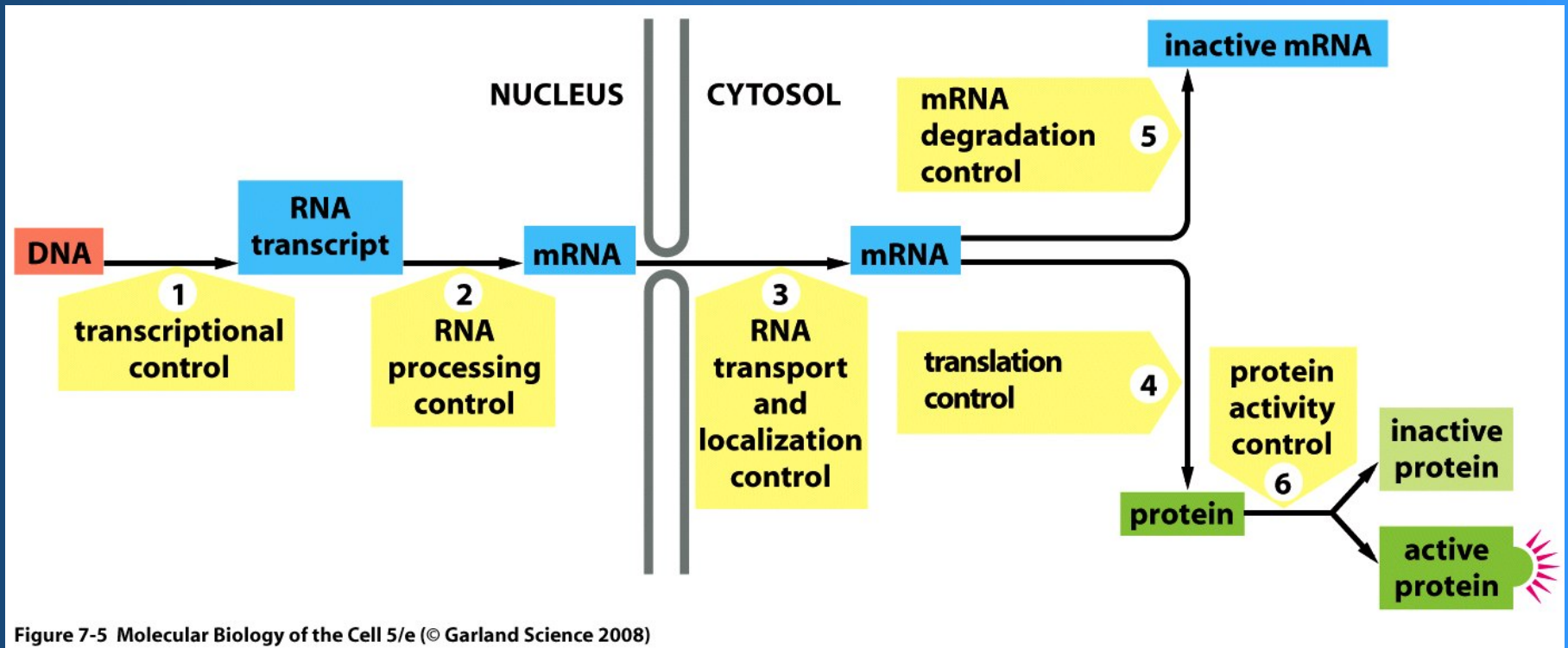


Figure 7-5 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

Interferenza a RNA

Premio Nobel 2006



Craig Mello



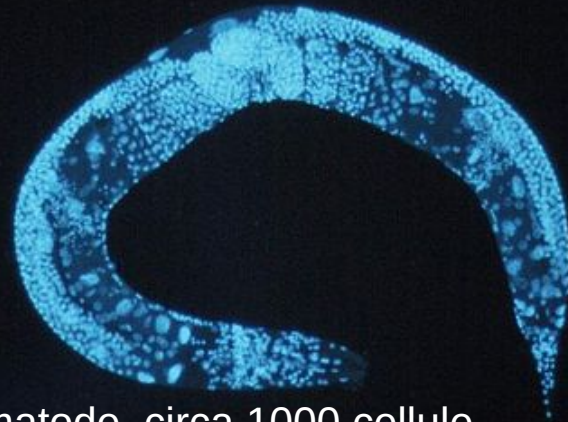
Andrew Fire

Arabidopsis thaliana



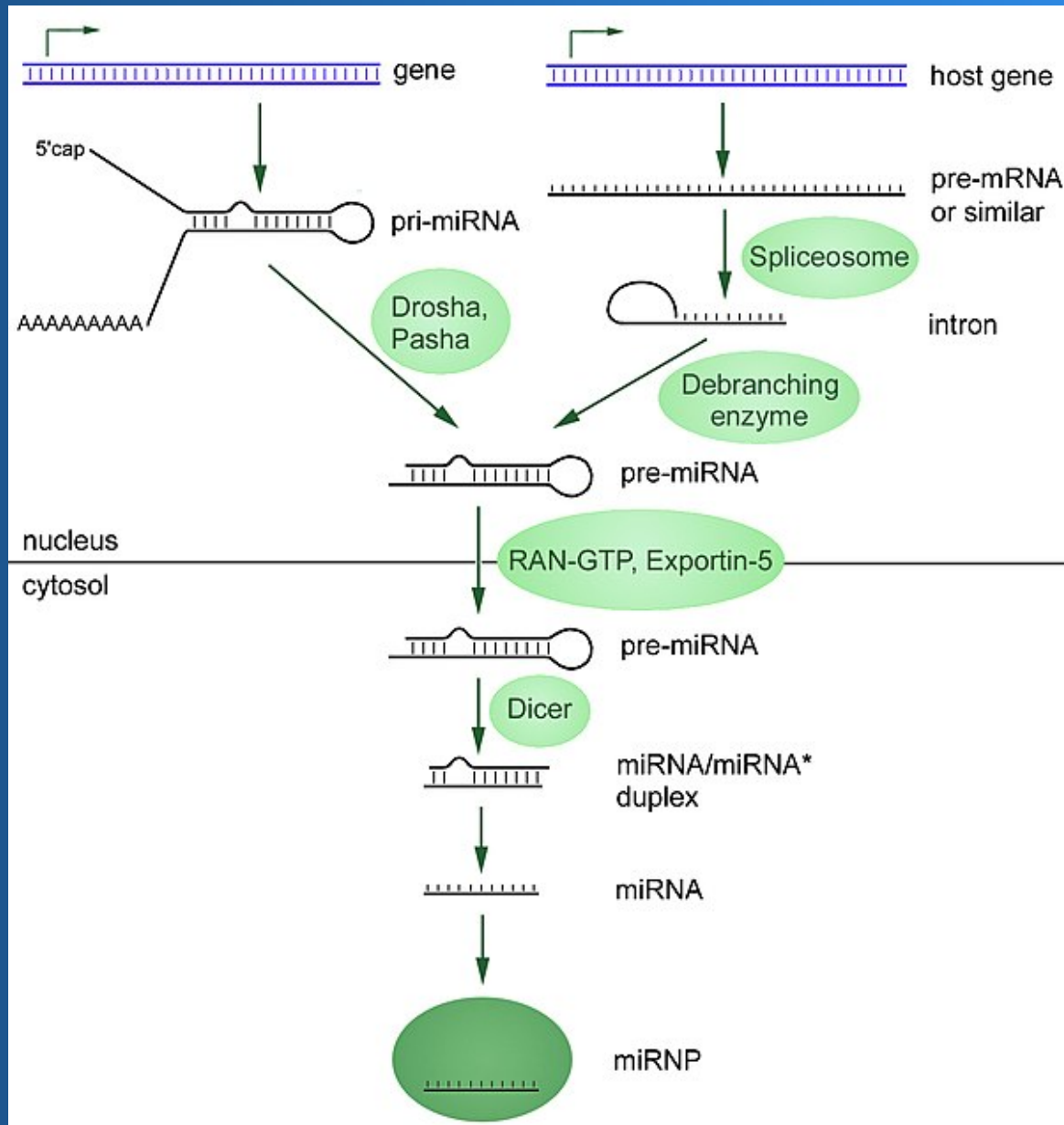
Pianta erbacea,
125 milioni di paia di basi, 5 cromosomi

Caenorhabditis elegans

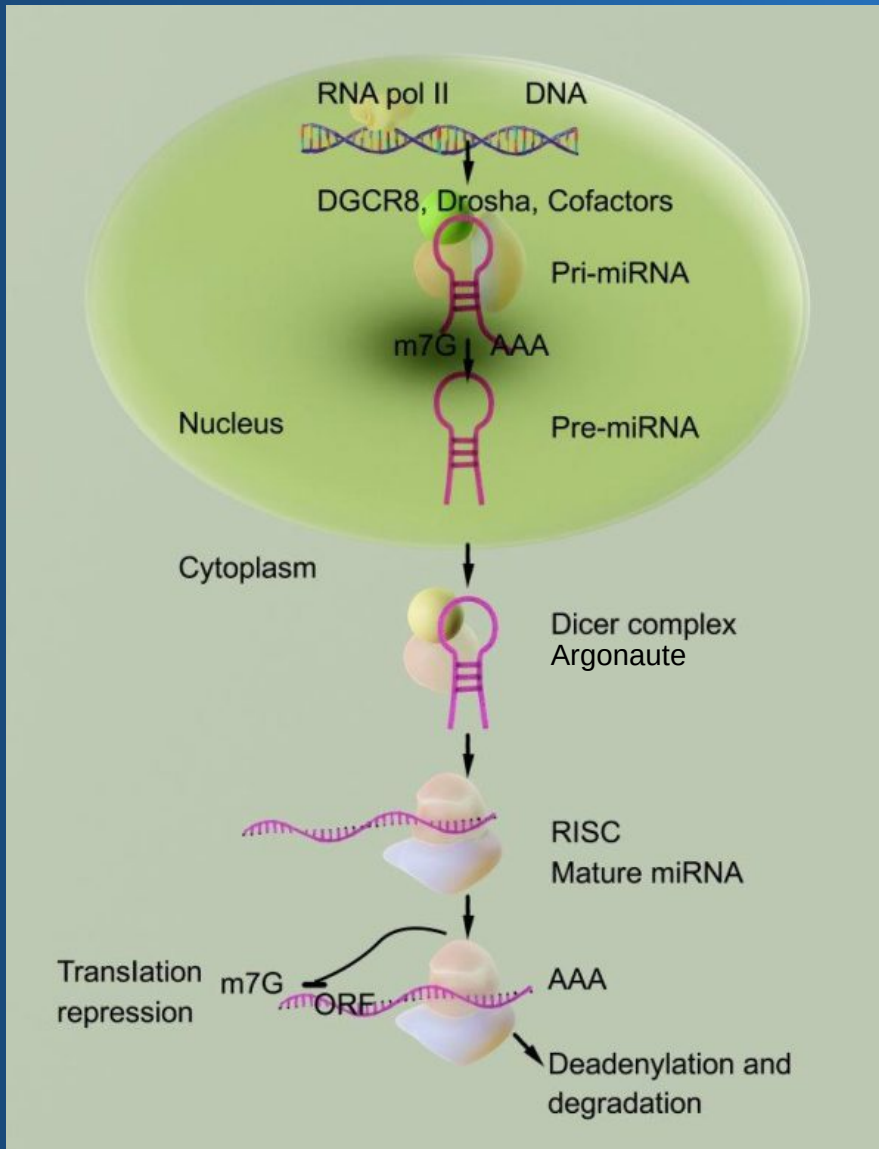


Nematode, circa 1000 cellule
100 milioni di paia di basi, 12 cromosomi

I microRNA (miRNA)



Biogenesi dei microRNA



I geni dei miRNA tramite la **pol II** producono i **pri-miRNA** (con cap e polyA)

I pri-miRNA vengono tagliati dall'enzima **Drosha** in frammenti più piccoli, a doppio filamento, chiamati **pre-miRNA**.

I pre-miRNA vengono esportati nel citoplasma e tagliati in **RNA a doppio filamento** più piccoli da un altro enzima chiamato **Dicer**.

Uno dei due filamenti viene **degradato** (grazie alla proteina **Argonaute**) e si forma il miRNA maturo, lungo solitamente tra i **19 e i 25 nucleotidi**

Il miRNA maturo viene incorporato in un complesso proteico chiamato

RISC
(RNA-induced silencing complex)

Azione di Drosha e Dicer

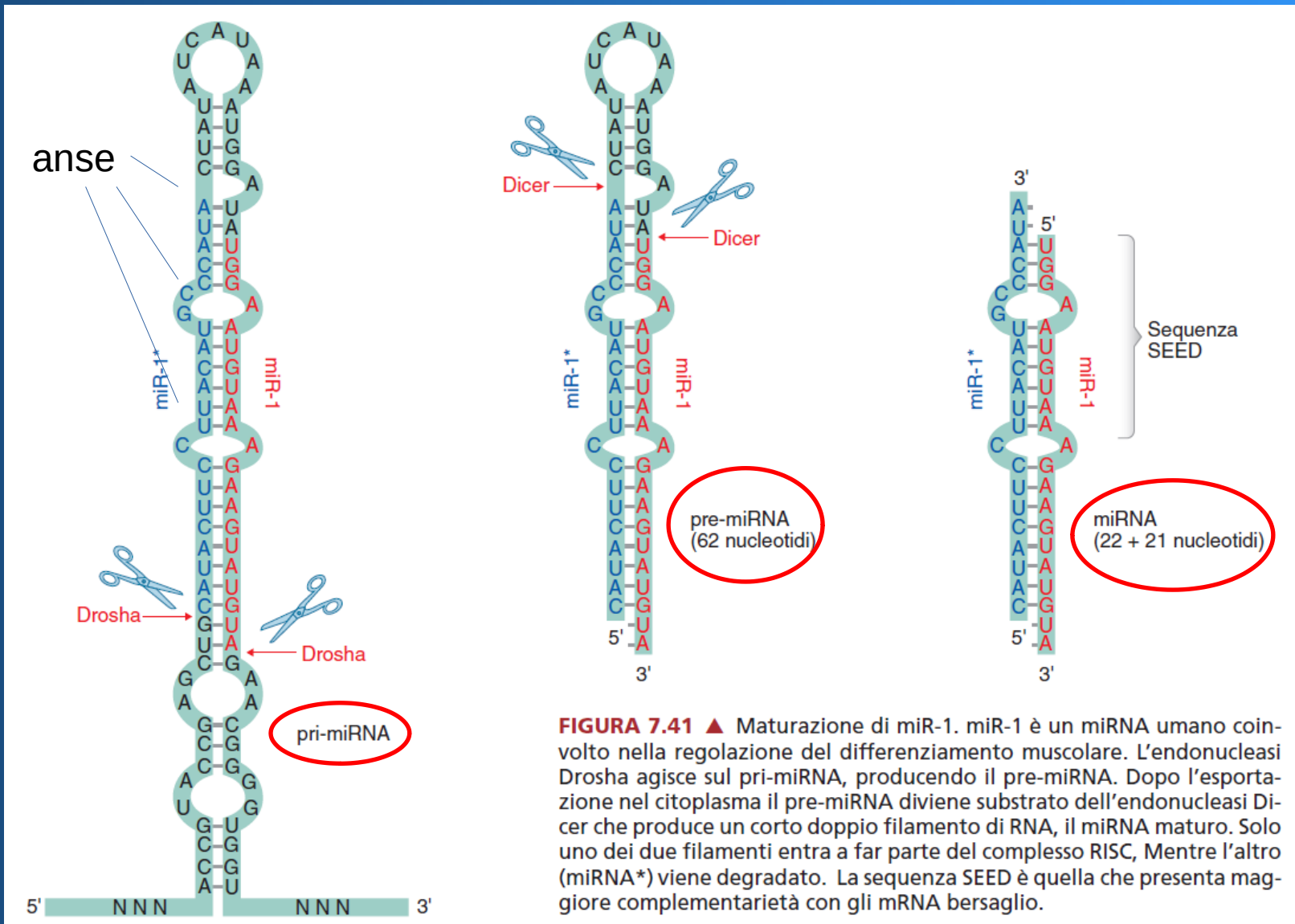
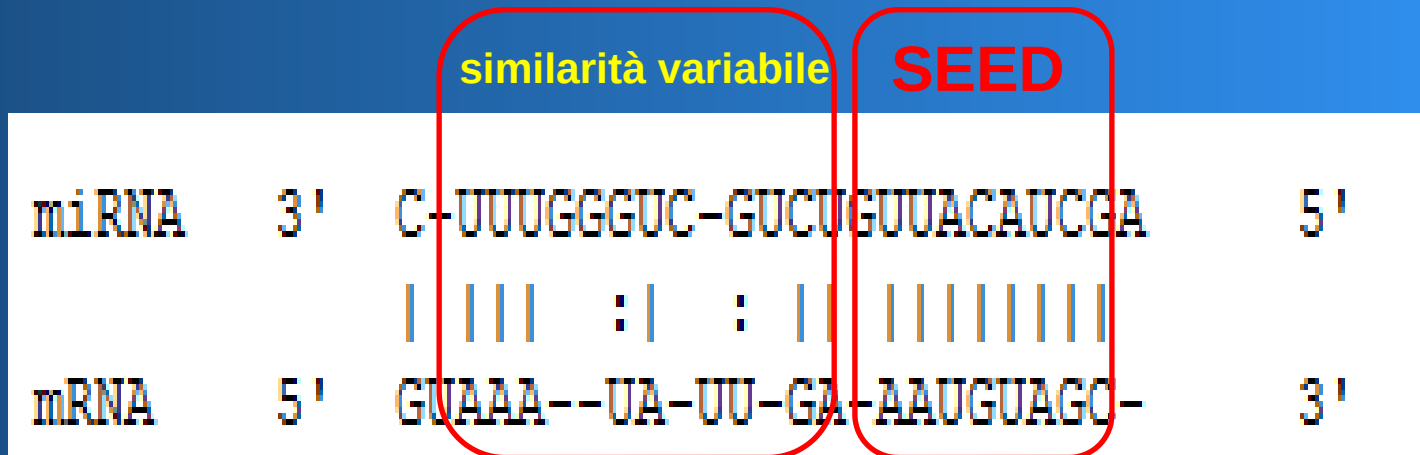


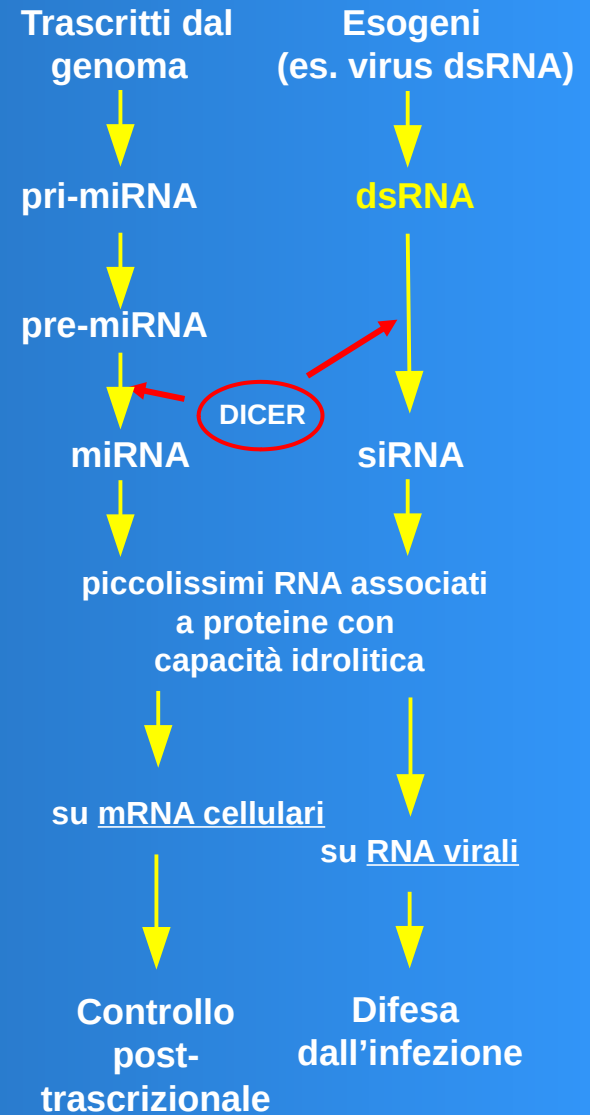
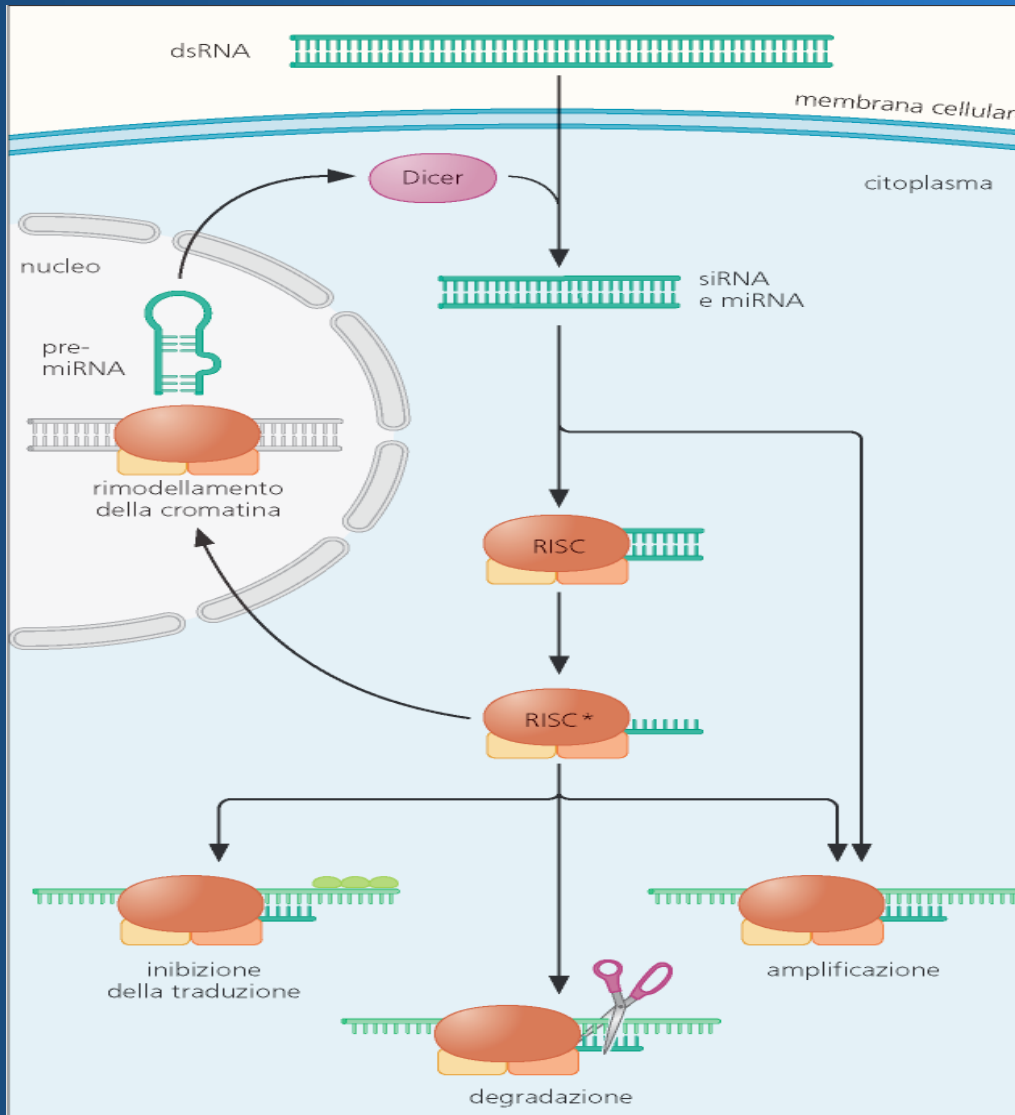
FIGURA 7.41 ▲ Maturazione di miR-1. miR-1 è un miRNA umano coinvolto nella regolazione del differenziamento muscolare. L'endonucleasi Drosha agisce sul pri-miRNA, producendo il pre-miRNA. Dopo l'esportazione nel citoplasma il pre-miRNA diviene substrato dell'endonucleasi Dicer che produce un corto doppio filamento di RNA, il miRNA maturo. Solo uno dei due filamenti entra a far parte del complesso RISC, Mentre l'altro (miRNA*) viene degradato. La sequenza SEED è quella che presenta maggiore complementarità con gli mRNA bersaglio.

Caratteristiche dei microRNA

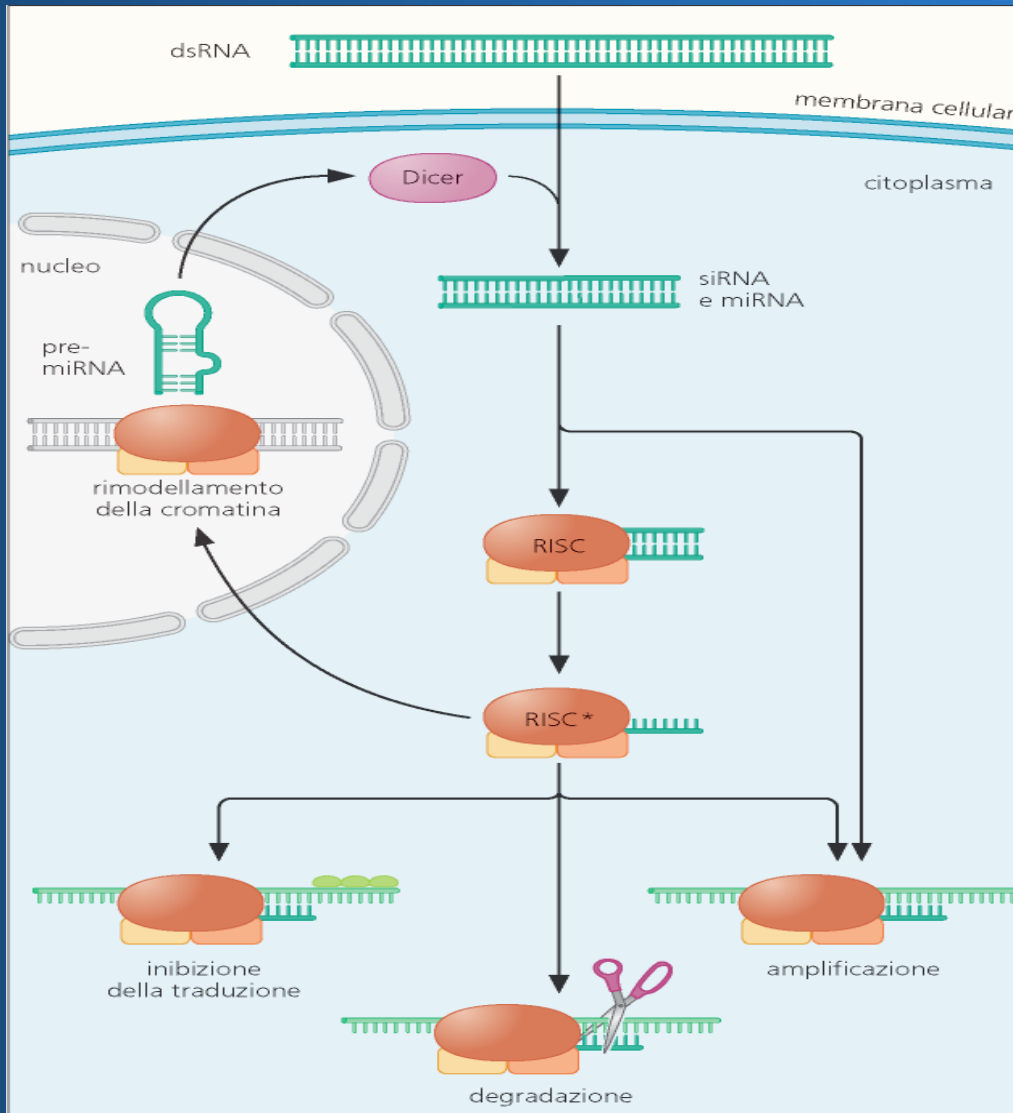


- ✓ La regione iniziale (5') del miRNA è chiamata seed e sembra essere la regione più importante nel silenziamento.
- ✓ E' lunga solitamente tra i 7 e i 10 nucleotidi, ma esistono casi di seed più corti o più lunghi.
- ✓ Il seed è solitamente appaiato in modo perfettamente complementare al suo target.
- ✓ Il primo nucleotide del miRNA non è determinante e può non essere appaiato.

miRNA come sistema di difesa



Ruolo dei microRNA



In alcuni organismi (es. lievito *S.cerevisiae*) il processo è andato completamente perso

Meccanismo antico (solo come siRNA) per difesa da virus e da trasposoni.

Nelle piante è soprattutto una sorta di sistema immunitario antivirale (siRNA, di origine esogena).

Piante e nematodi possono amplificare i miRNA mediante l'enzima RdRP (RNA polimerasi RNA-dipendente)

I miRNA hanno anche la capacità, in alcuni casi, di bloccare la trascrizione dei loro geni bersaglio, agendo a livello nucleare.

L'esistenza di DICER e Argonauta ha permesso l'evoluzione dei miRNA come sistemi per la regolazione dell'espressione genica.

BIOTECNOLOGIE



possibilità di inibire trascrizione e traduzione di specifici geni

Long non-coding RNA

transcripts of more than 200 nucleotides
that are not translated into protein

