




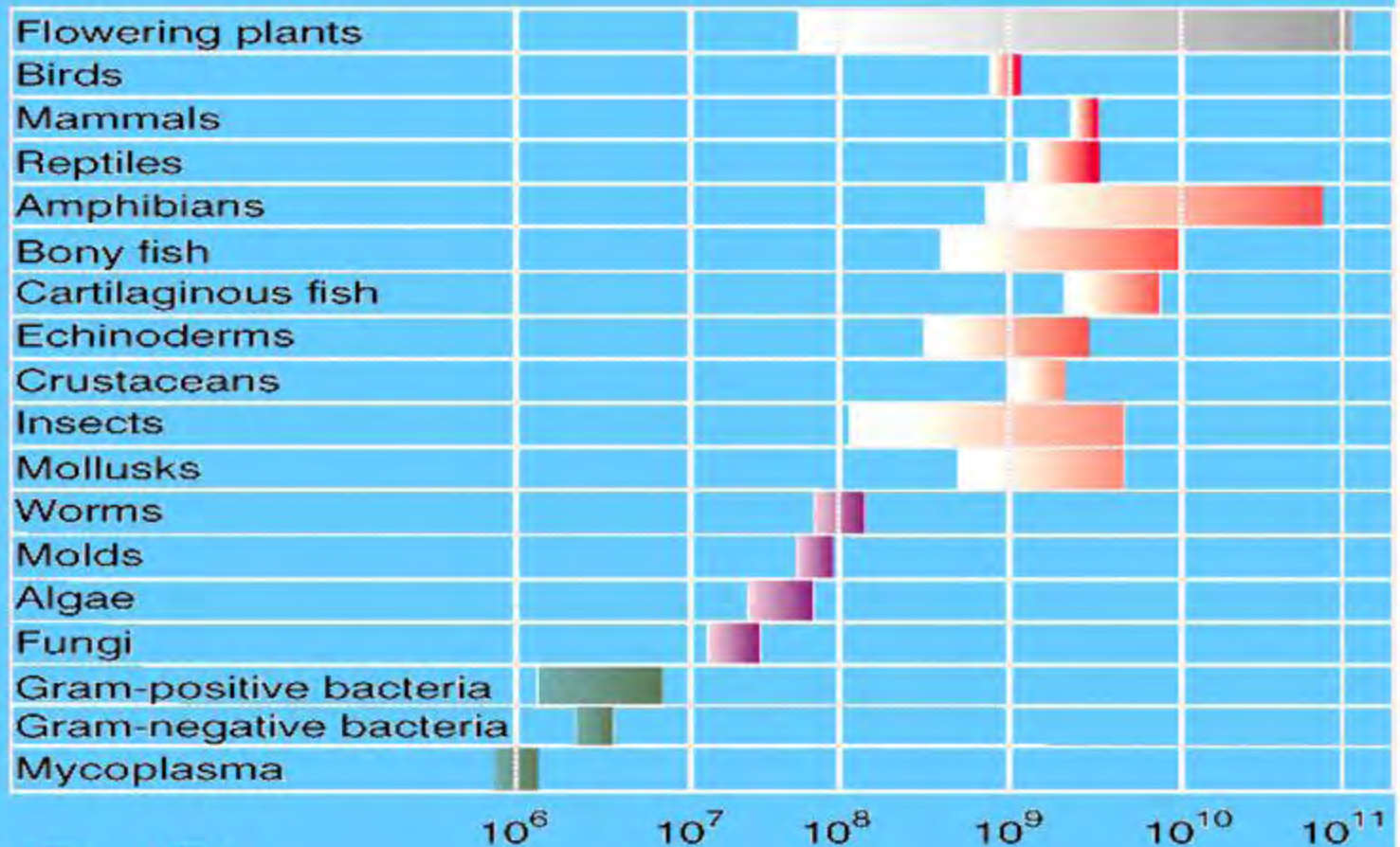
Le Modificazioni dell'informazione genetica

Gli aspetti trattati:

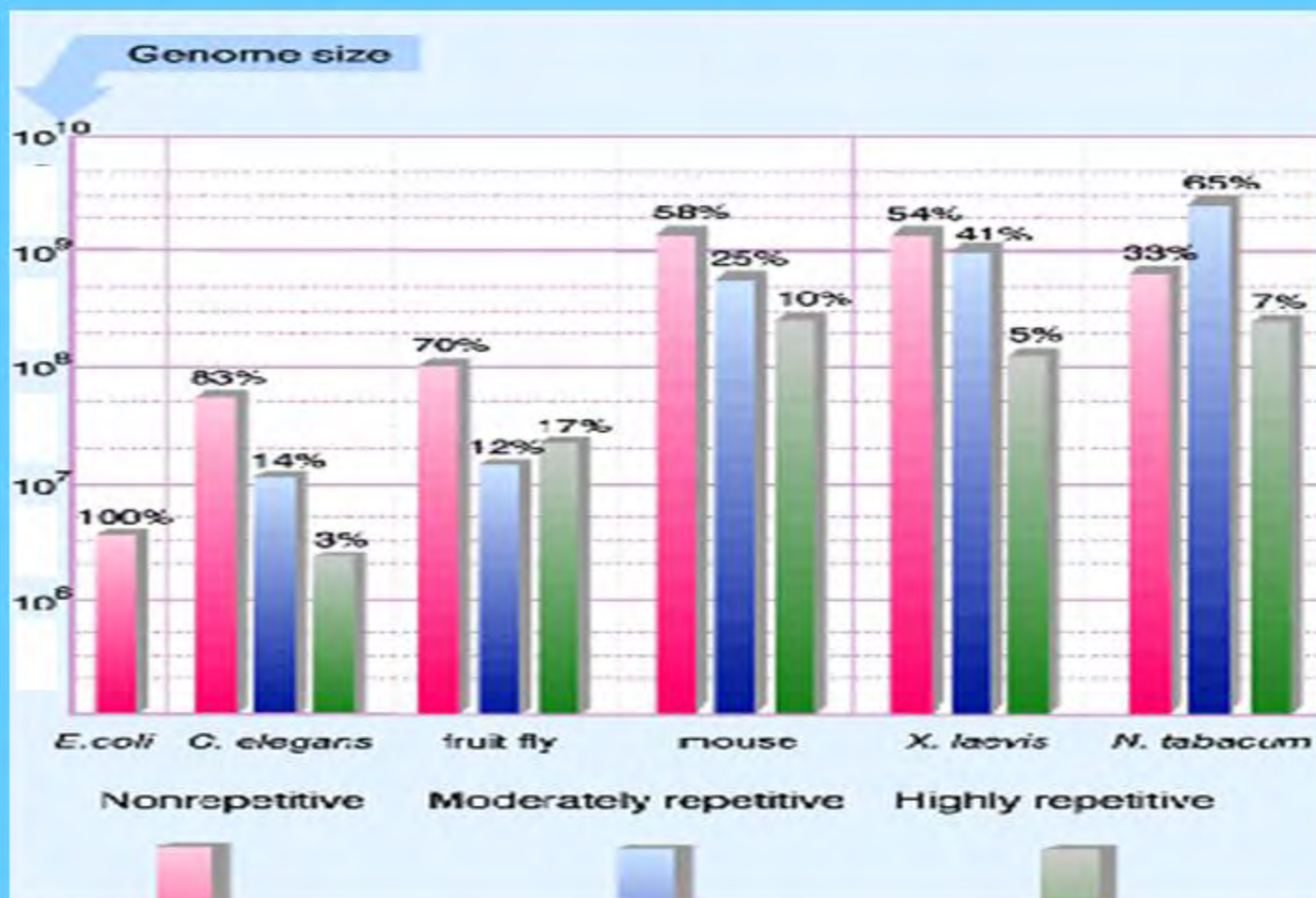
-  Il Genoma degli Eucarioti
-  Le mutazioni genetiche e le malattie
-  Gli Animali Transgenici



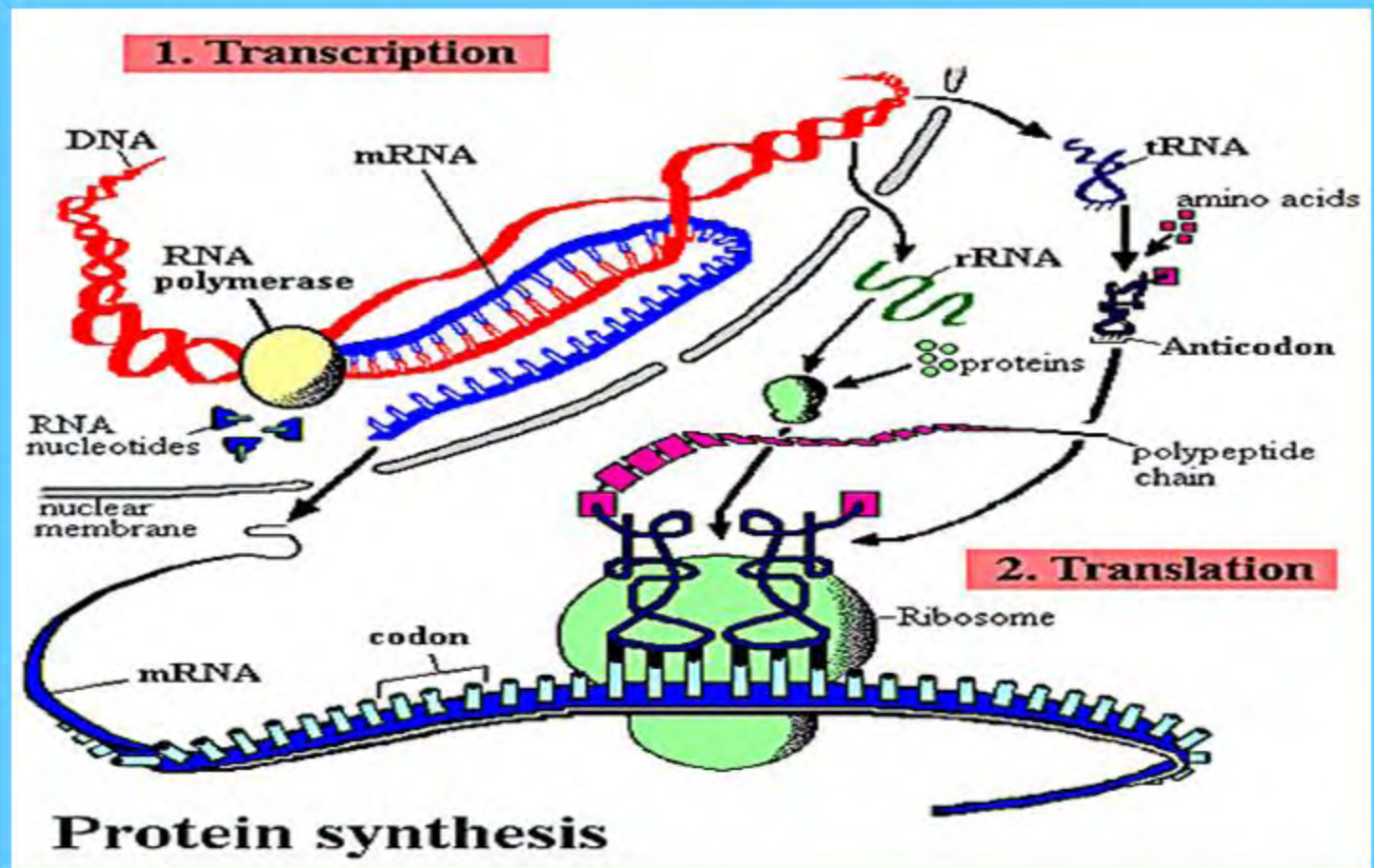
Il genoma degli eucarioti contiene geni interrotti e nel complesso contiene più DNA rispetto ai procarioti








Il genoma degli eucarioti contiene una elevata percentuale di sequenze ripetute



I geni sono sequenze di DNA che codificano la produzione di proteine



Il Codice Genetico

UUU UUC	UCU UCC	UAU UAC	UGU UGC
UUA UUG	UCA UCG	UAA UAG	UGA UGG
CUU CUC CUA CUG	CCU CCC CCA CCG	CAU CAC CAA CAG	CGU CGC CGA CGG
AUU AUC AUA AUG	ACU ACC ACA ACG	AAU AAC AAA AAG	AGU AGC AGA AGG
GUU GUC GUA GUG	GCU GCC GCA GCG	GAU GAC GAA GAG	GGU GGC GGA GGG
Third base relationship		Third bases with same meaning	Number of codons
	third base irrelevant	U, C, A, G	32
	} purines differ from pyrimidines	U or C	14
		A or G	10
	} unique definitions	U, C, A	3
		G only	2



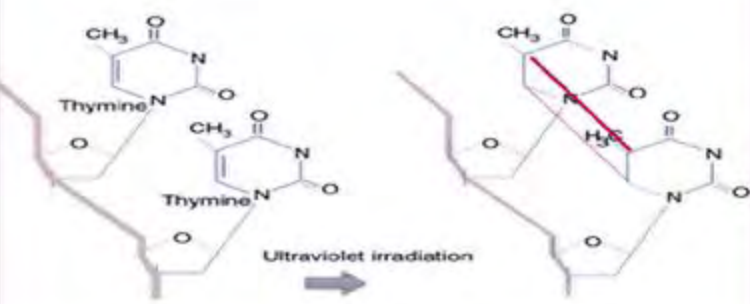
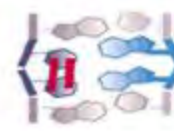
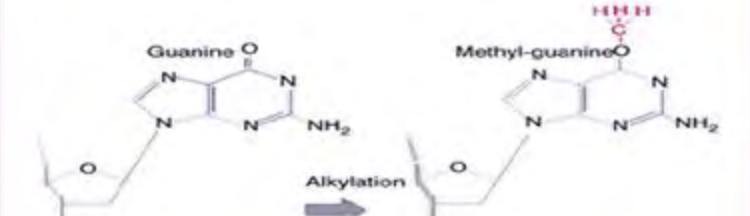

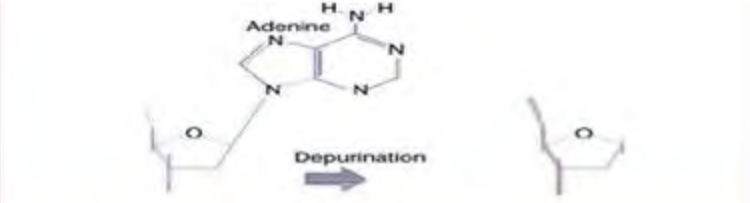

**Il DNA è una molecola che può subire
alterazioni chimiche**

**Il cambiamento della sequenza di
nucleotidi è detta mutazione**



Mutazioni

Figure 14.26
Modifications or removal of bases may cause structural defects that prevent replication or induce mutations in each replication cycle until they are removed.

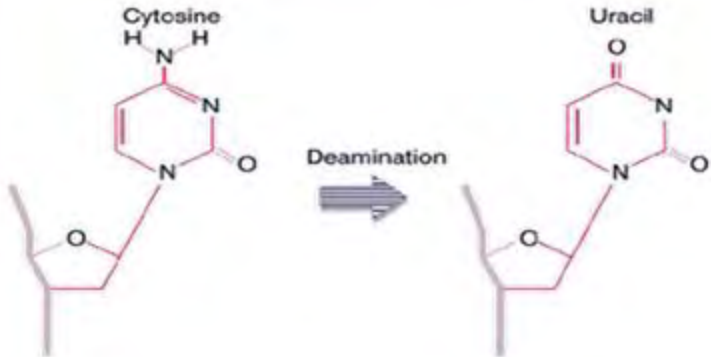
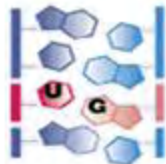
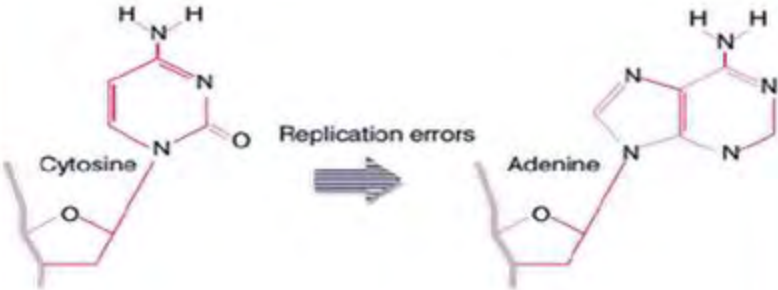
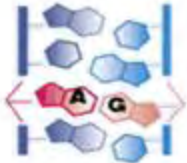
Nature of mutation	Consequences
 <p>Ultraviolet irradiation</p>	<p>Thymine dimer distorts duplex</p>  <p>Corrected by excision</p>
 <p>Alkylation</p>	<p>Methyl group distorts double helix</p>  <p>Corrected by dealkylation</p>
 <p>Depurination</p>	<p>Purine is missing</p>  <p>Corrected by insertion</p>



Mutazioni

Figure 14.25

Substitutions of individual bases create mismatched pairs that may be corrected by replacing one base; if uncorrected they cause a mutation in one daughter duplex.

Nature of mutation	Consequences
 <p style="text-align: center;">Deamination</p>	<p>U-G replaces C-G</p>  <p>Corrected by removing U</p>
 <p style="text-align: center;">Replication errors</p>	<p>Purine pair distorts duplex</p>  <p>Corrected by removing G</p>

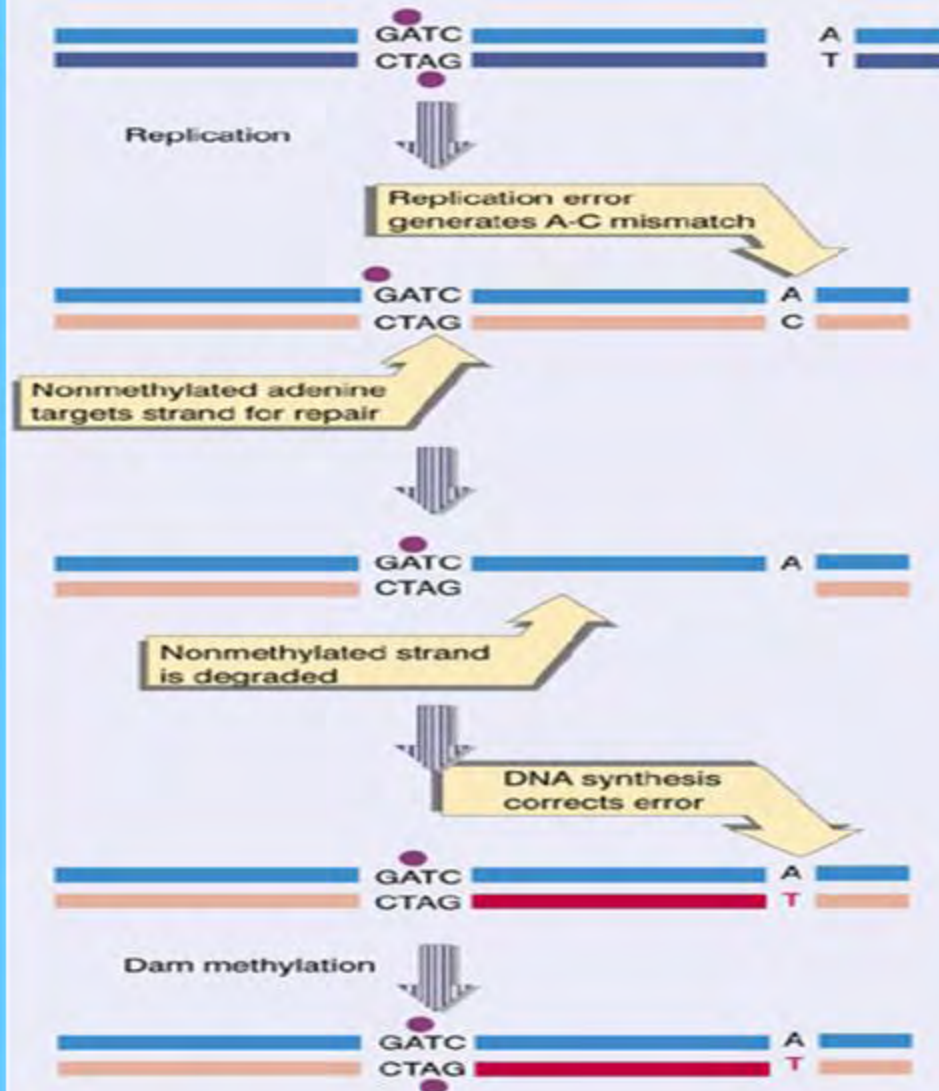


Il DNA è soggetto a modificazioni relativamente frequenti anche durante la normale replicazione, ma esistono dei sistemi di “riparo” in grado di ripristinarne l’integrità.



Riparo del DNA

Figure 14.29 GATC sequences are targets for the Dam methylase after replication. During the period before this methylation occurs, the nonmethylated strand is the target for repair of mismatched bases.

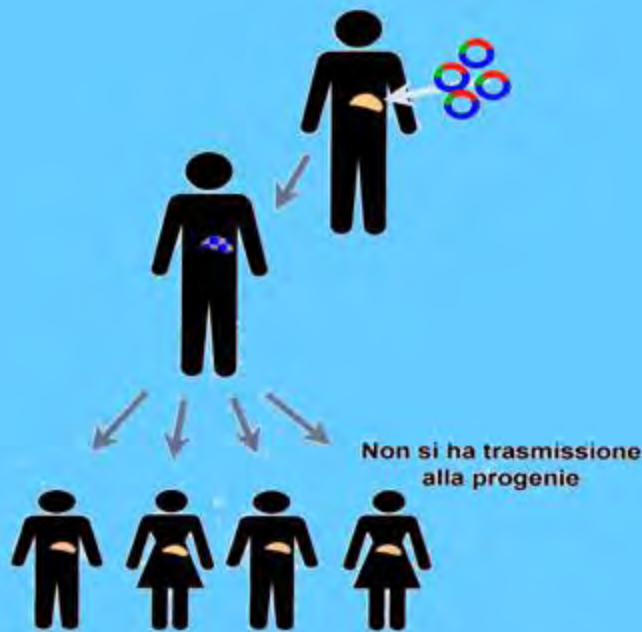


Le mutazioni possono modificare le informazioni portate dai geni

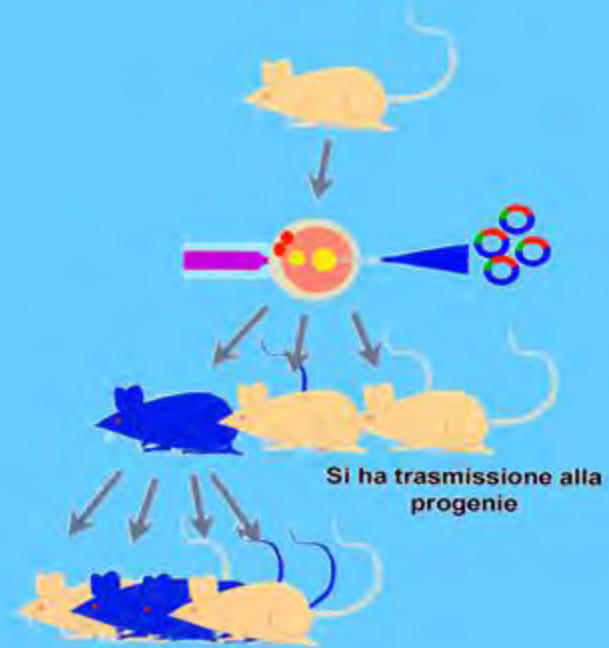


Una mutazione nelle cellule germinali si trasmette alla prole, una mutazione alle cellule somatiche interessa solo la cellula colpita e quelle che derivano dalla sua divisione.

Modificazione delle cellule somatiche



Modificazione delle cellule germinali.



Le malattie genetiche sono originate da mutazioni delle cellule germinali

Le mutazioni genetiche possono manifestarsi allo stato eterozigote ed essere “dominanti” o omozigote ed essere perciò recessive: Emofilia, Fibrosi Cistica

Alcune mutazioni possono dare luogo a dei parziali vantaggi dal punto di vista evolutivo: Talassemia ed Anemia Falciforme



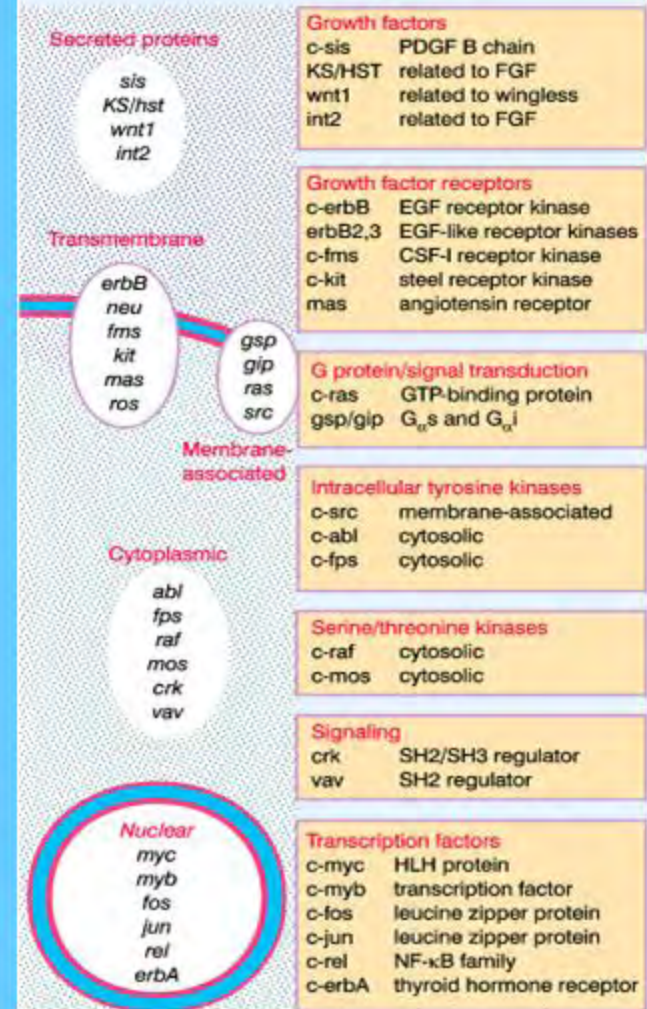
**I tumori sono provocati da mutazioni
che colpiscono alcuni geni nelle
cellule somatiche**



Gli Oncogeni

I numerosi geni che regolano la divisione cellulare, se alterati, possono costituire degli oncogeni

Figure 28.14 Oncogenes may code for secreted proteins, transmembrane proteins, cytoplasmic proteins, or nuclear proteins.



**Fattori genetici possono influenzare
l'insorgenza dei tumori**

**Fattori ambientali possono aumentare
l'incidenza delle mutazioni
(Fumo, fattori alimentari)**

**Il processo neoplastico è un processo
progressivo a tappe successive**



L'ingegneria genetica applicata alla generazione di organismi transgenici

Perchè trasferire i geni?

Introduzione di nuove caratteristiche non disponibili nel patrimonio genetico della specie (nuovi geni o copie aggiuntive di un gene)

Introduzione di geni in nuove posizioni del genoma (con differente *linkage*)

Modificazioni mirate si possono ottenere in tempi più brevi che con la selezione tradizionale. (in termini di generazioni animali)



Organismi Transgenici

Si dice **Transgenico** un organismo nel quale sia stata introdotta una sequenza di DNA aggiuntiva (**transgene**) rispetto a quelle derivate dal patrimonio genetico dei progenitori.

*Tale DNA potrà essere **integrato** nel genoma dell'organismo stesso oppure, in casi particolari, replicare autonomamente all'interno delle cellule (**episoma**).*

Tale gene potrà essere presente nel genoma di tutte le cellule dell'organismo, comprese le cellule riproduttive, e trasmettersi perciò spontaneamente alle generazioni successive. Potrà al contrario essere presente soltanto nelle cellule di alcuni tessuti dell'organismo senza interessare le cellule riproduttive e senza perciò essere trasmesso alla discendenza (transgenesi somatica).

*Nell'accezione più comune del termine si definiscono però transgenici solo gli organismi nei quali il transgene sia **integrato nel genoma e trasmissibile alla progenie**.*



Tecniche di Introduzione di Transgeni in Organismi Animali

Integrazione “Random”

Microiniezione pronucleare

Applicabile a molte specie

necessita di zigoti

Integrazione casuale del transgene



Vettori Retrovirali, Vettori Lentivirali

L'integrazione avviene nelle cellule in divisione (generazione di “mosaici”) o anche non in divisione (lentivirus)

Sito di integrazione non prevedibile anche se non del tutto casuale

Elettroporazione, vettori liposomali

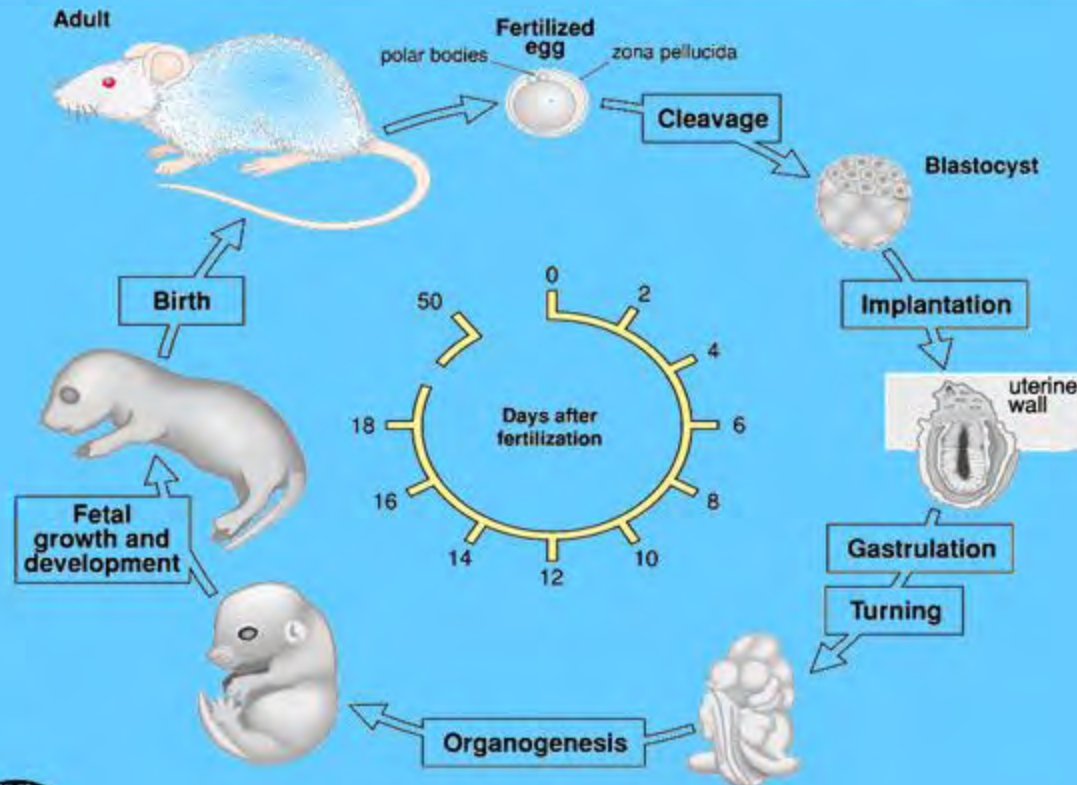
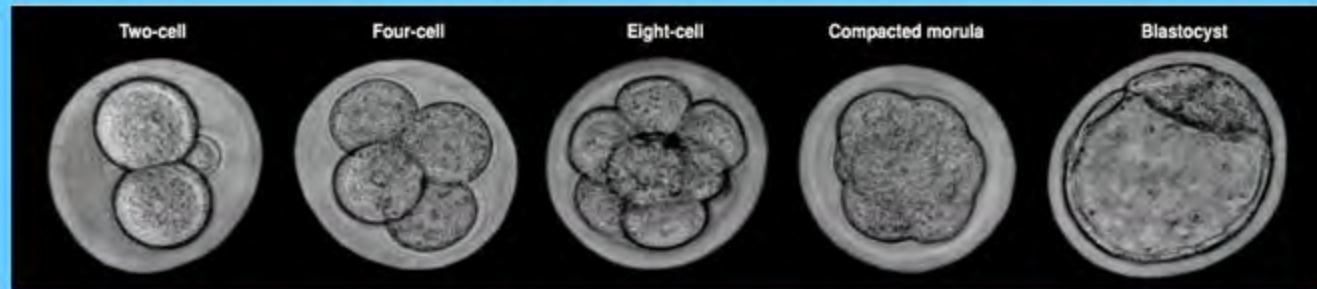
Integrazione casuale

alta percentuale di ricombinazione e di inattivazione dei transgeni

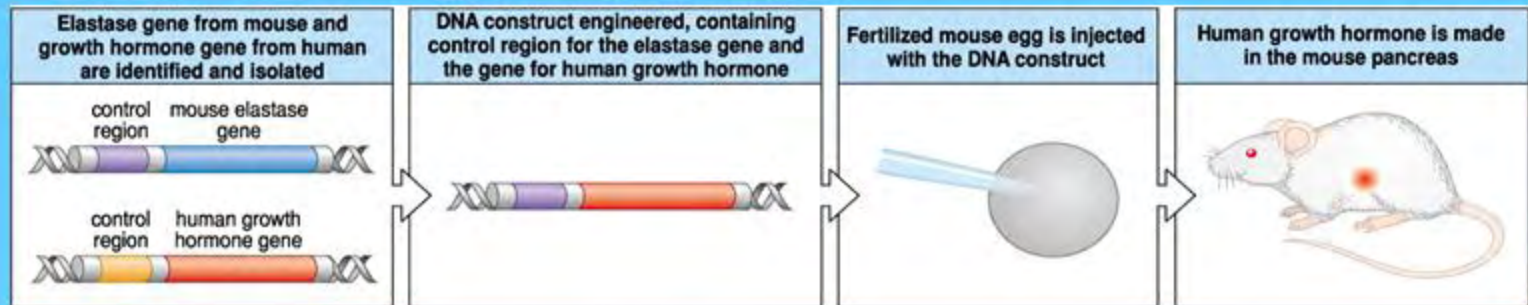
Sperm-Mediated DNA transport



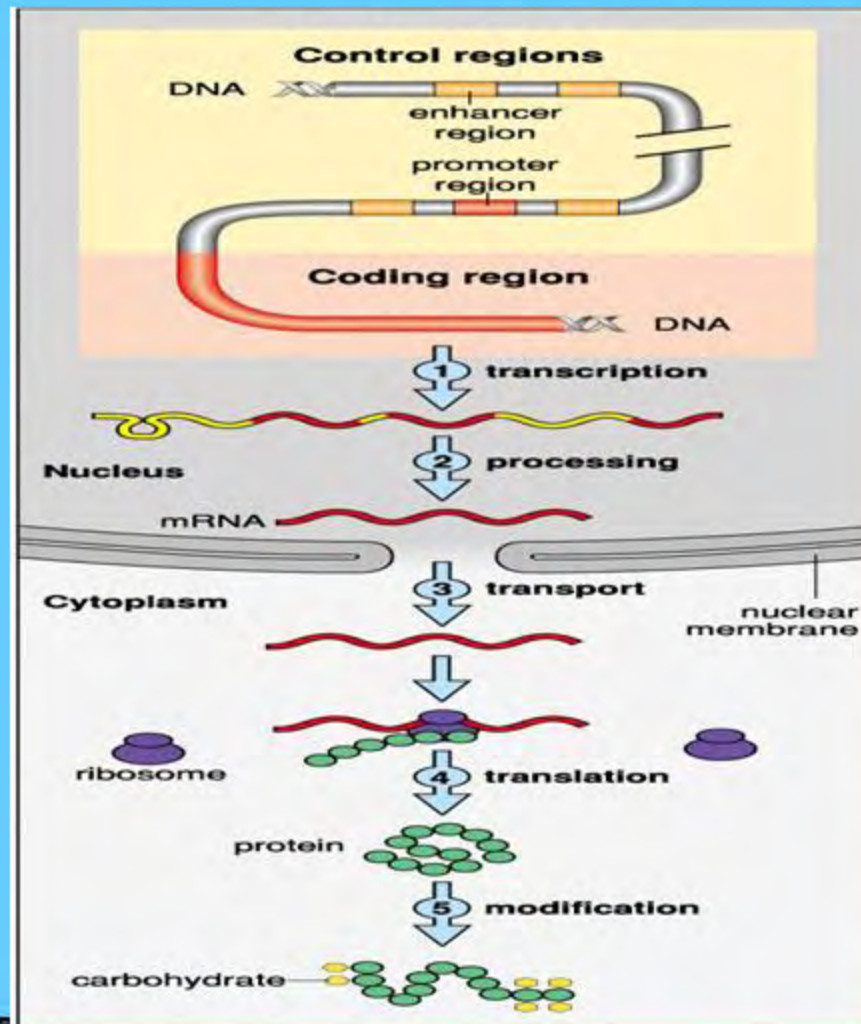
Sviluppo embrionale



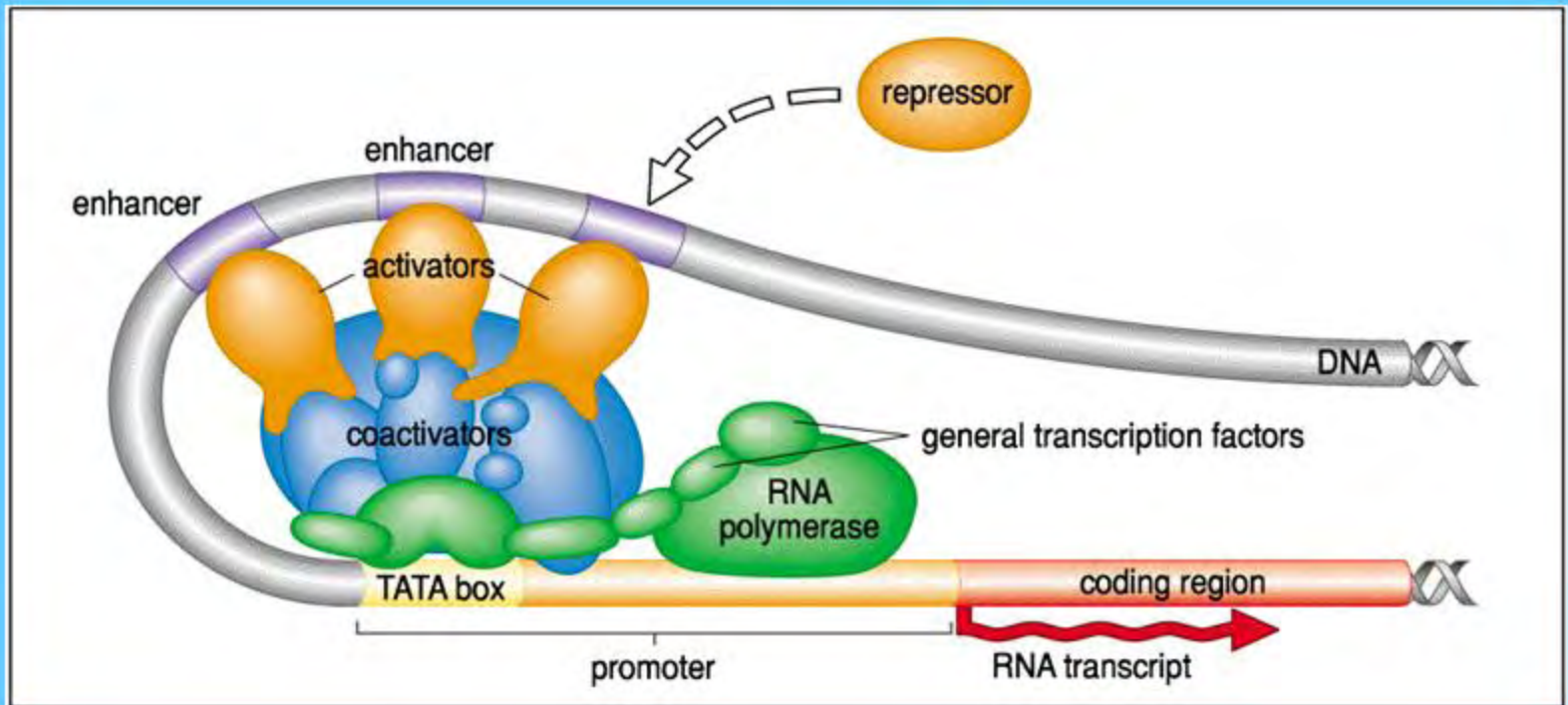
Microiniezione Pronucleare



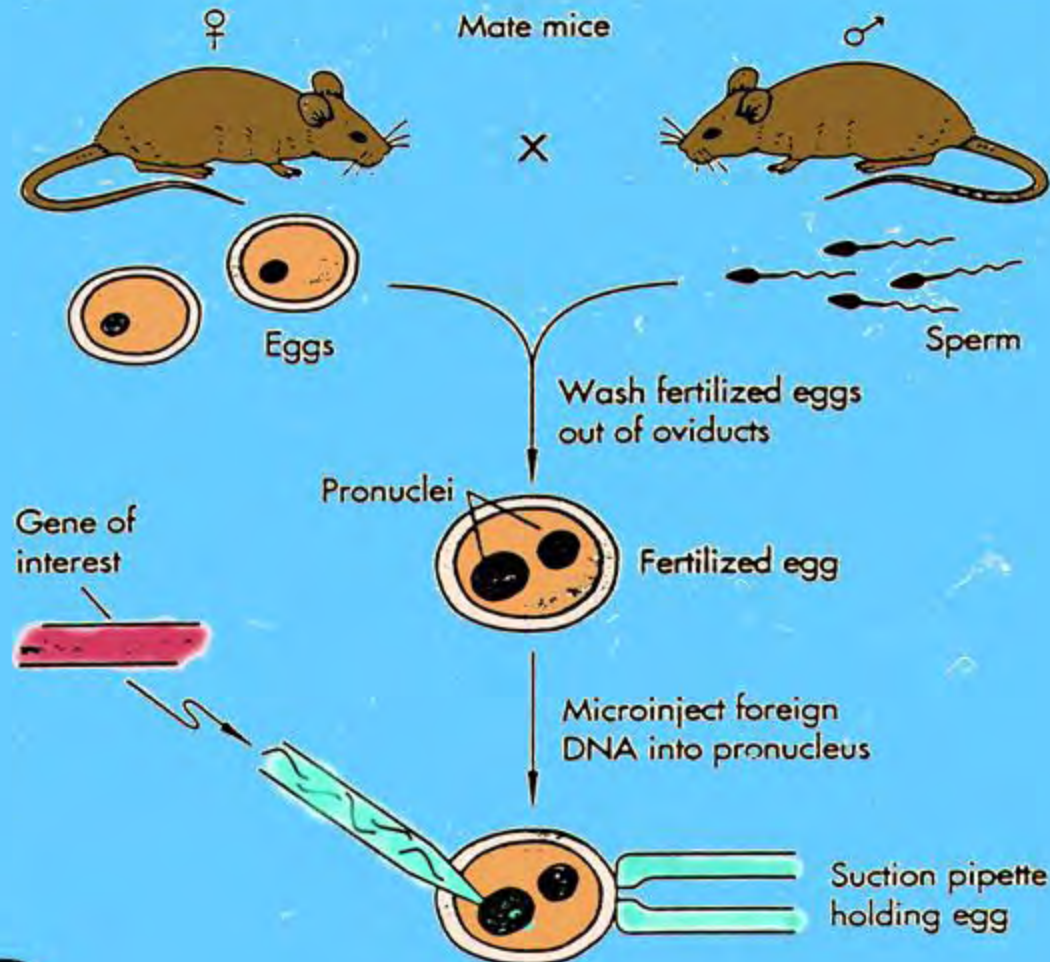
Regolazione dell'espressione



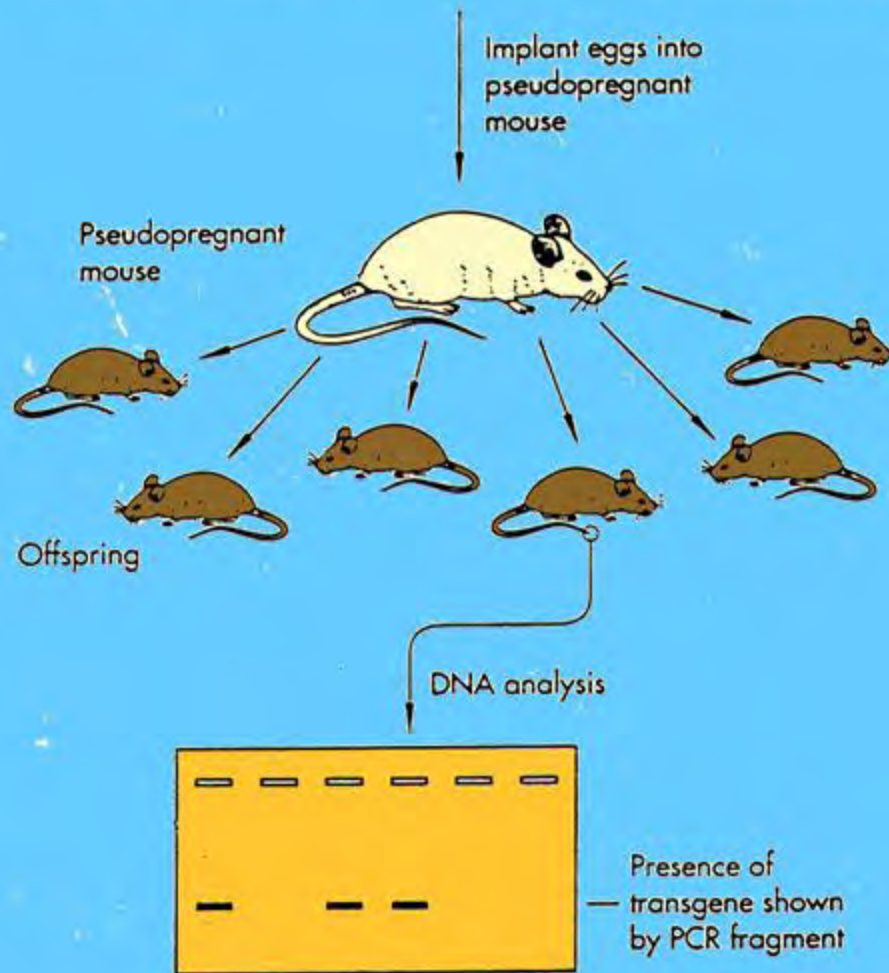
Ruolo del promotore



Procedura di microiniezione nel topo



Procedura di microiniezione nel topo (2)



Esempio di efficienza della tecnica di transgenesi per microiniezione nel bovino

Oociti recuperati		2470	(100%)
Oociti maturati		2297	
Oociti fertilizzati		1358	
Zigoti microiniettati		1154	
Zigoti sopravvissuti		981	
Embrioni sviluppati in vitro		687	
Embrioni trasferiti	(100%)	129	
Vitelli nati		21	
Vitelli transgenici	(1.5%)	2	(0,08%)

da Krimpenfort, 1991



PUNTI CRITICI

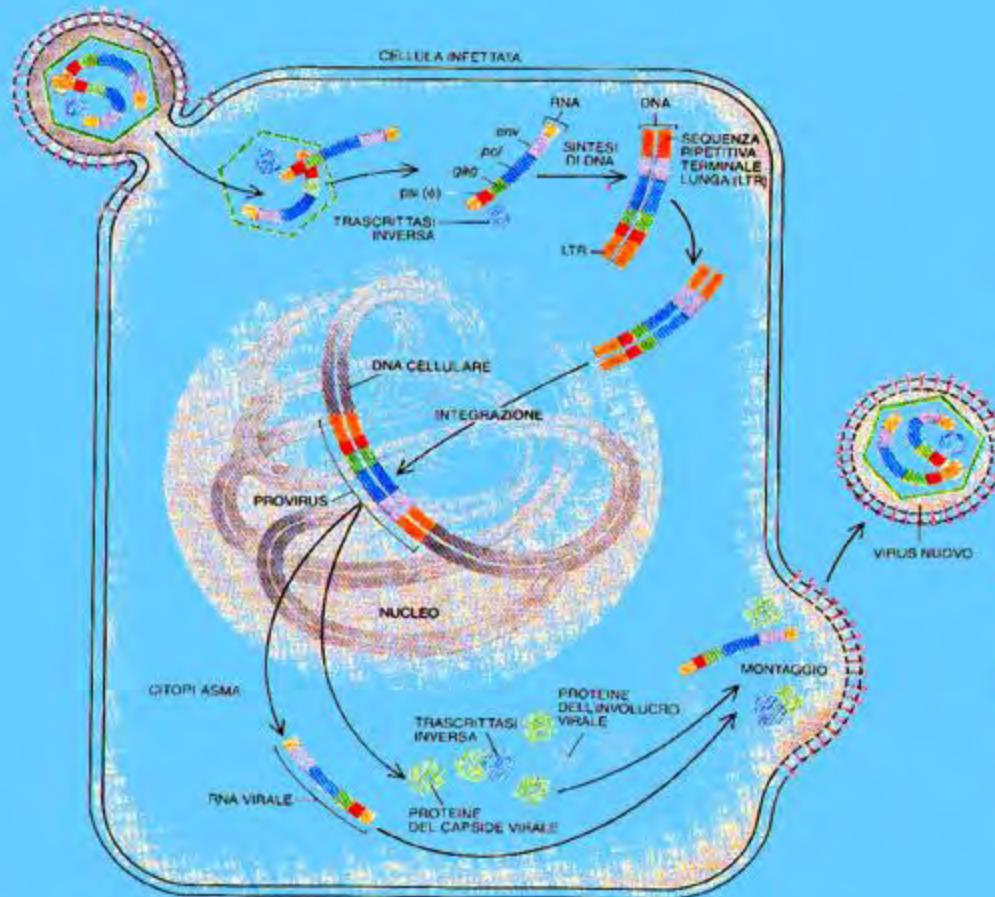
Efficienza e costi

Regolazione e livello di espressione

Previsione degli effetti collaterali



Ciclo biologico dei retrovirus

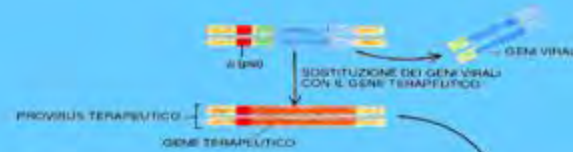


- ❖ Geni dell'involucro (gag, env)
- ❖ Segnali per l'assemblaggio (psi)
- ❖ Segnali per l'integrazione (LTR)
- ❖ Geni per la Replicazione (Pol)

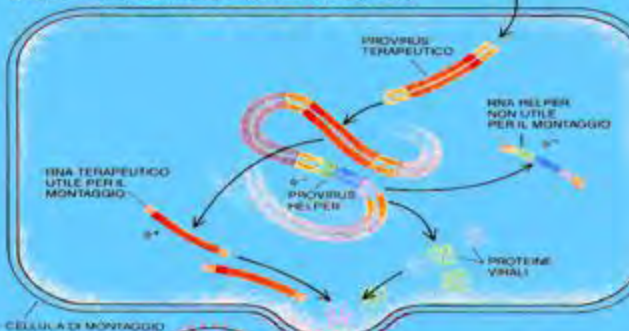


Vettori Retrovirali

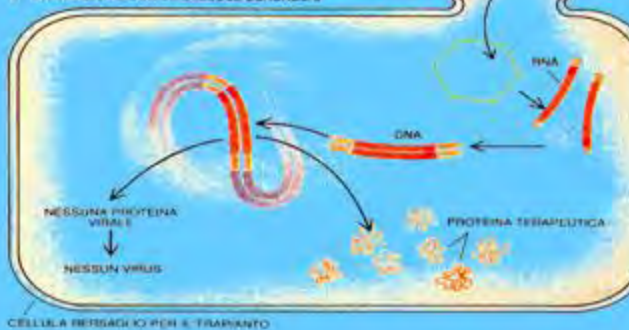
A COSTRUZIONE DEL PROVIRUS VETTORE DEL GENE SELEZIONATO



B INSERIMENTO IN UNA CELLULA ADATTA PER IL MONTAGGIO



C INCUBAZIONE CON LE CELLULE BERSAGLIO



Dal Genoma di un retrovirus, per delezione di alcuni geni, si possono ottenere dei vettori retrovirali.

Questi sono delle particelle in grado di entrare nella cellula e di esprimere alcuni transgeni di cui sono portatrici. Non sono però in grado di replicarsi ne' di infettare altre cellule.

- ❖ Geni dell'involucro (gag, env)
- ❖ Segnali per l'assemblaggio (psi)
- ❖ Segnali per l'integrazione (LTR)
- ❖ Geni per la Replicazione (Pol)



Tecniche di Introduzione di Transgeni in Organismi Animali

Integrazione Mirata

Ricombinazione omologa in E.S.Cells e derivazione di animali chimerici

Integrazione mirata del transgene

Applicabile soltanto al Topo

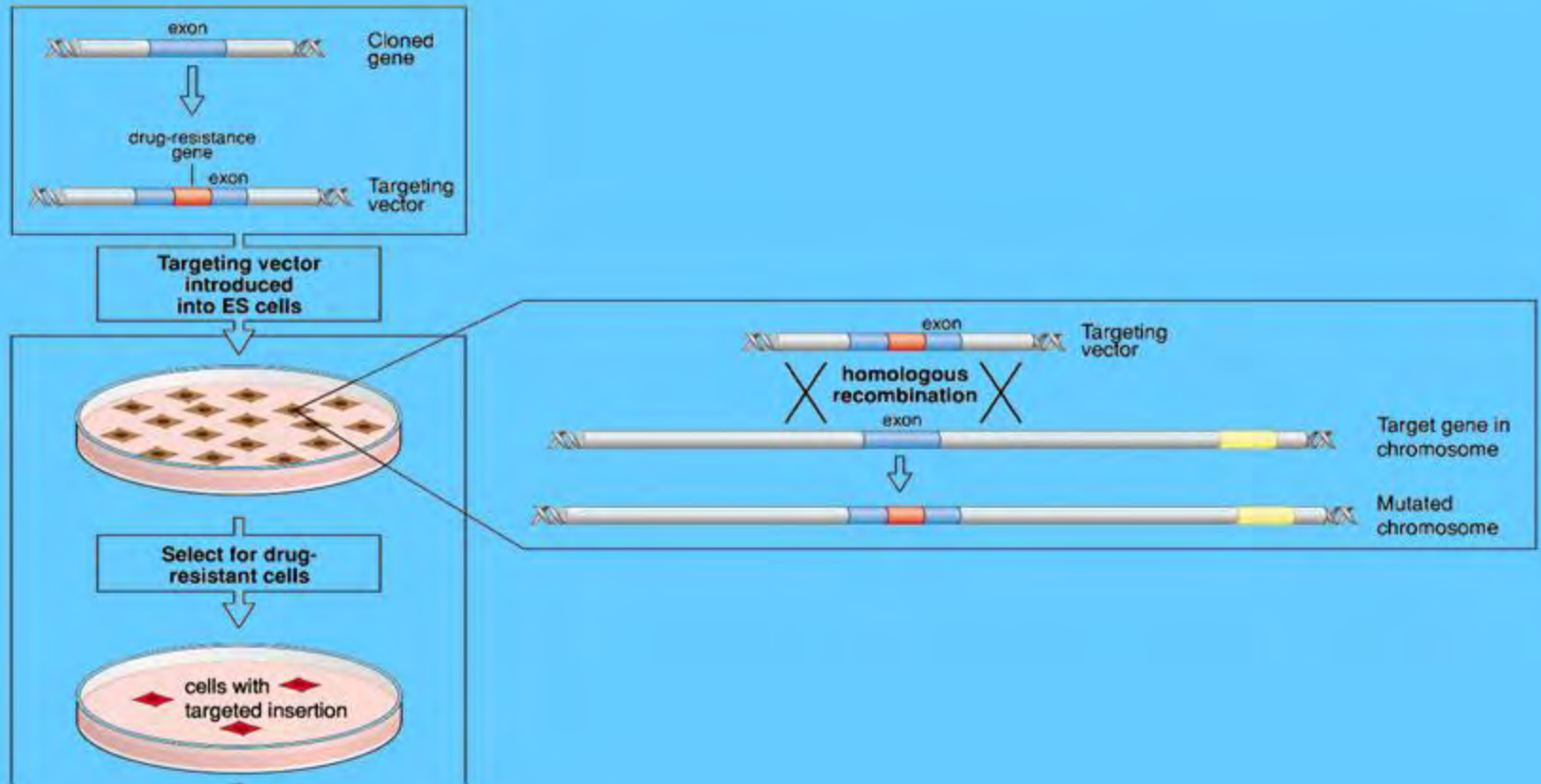
Nuclear transfer da cellule geneticamente modificate

E' la tecnica più recente ed appare come la più promettente.

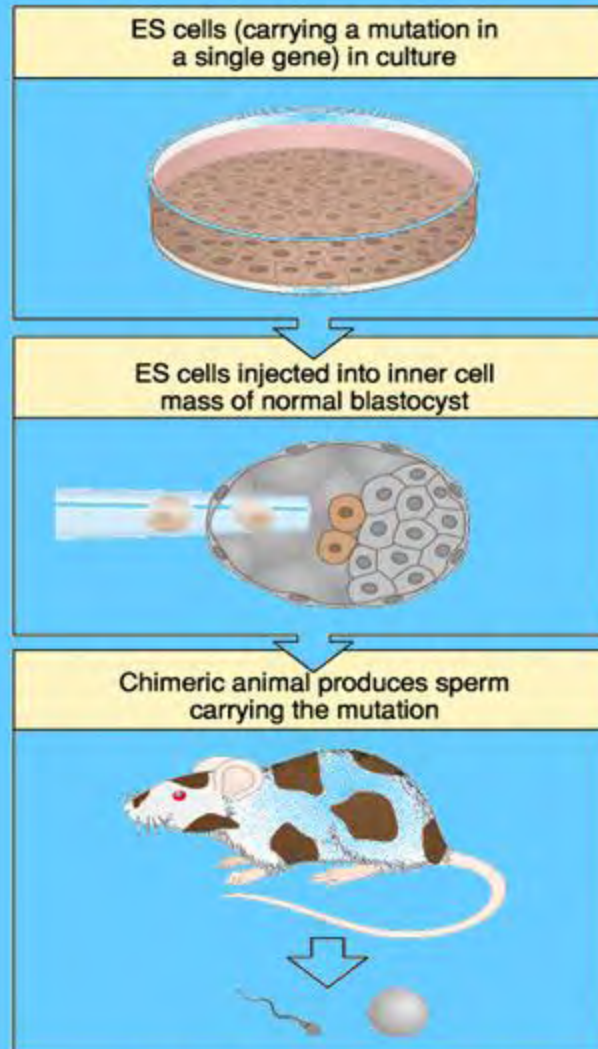
Introduzione mirata del transgene. Elevata efficienza. Applicabile a diverse specie di animali domestici



Ricombinazione omologa



Iniezione in Blastocisti



Le cellule staminali embrionali

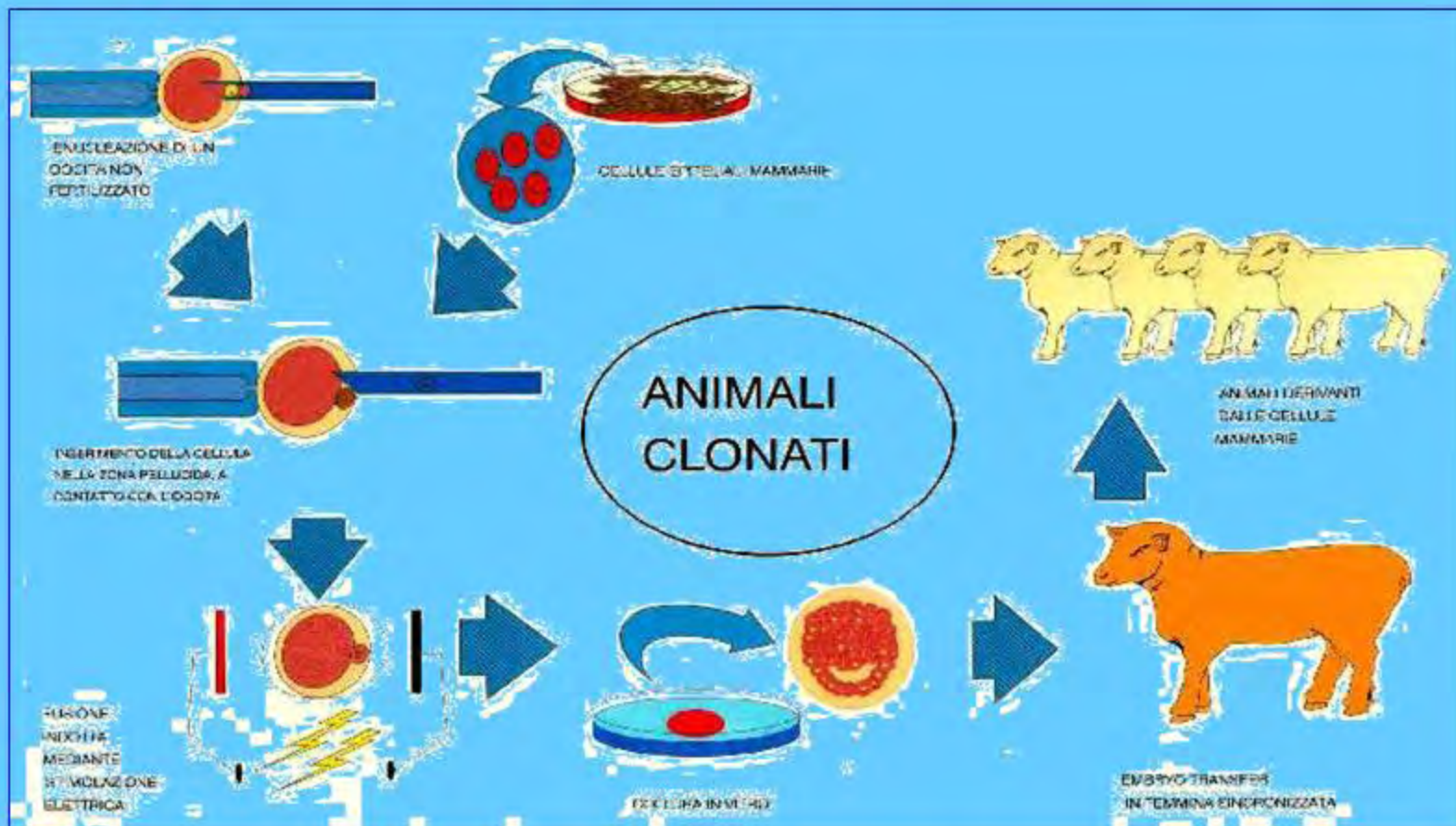
Limite nelle specie zootecniche:

Molto difficili da isolare

Chimerismo e lunghi intervalli di
generazione



Il trapianto nucleare nella pecora : Dolly



Il trapianto nucleare

Animali clonati: Dolly, Galileo, Prometea...

Animali clonati da cellule trasfettate: pecora che esprime il fattore IX umano

Animali clonati da cellule trasformate per ricombinazione omologa: ovino e suino. Sono stati clonati bovini da fibroblasti ottenuti da biopsia e coltivati in vitro per lunghi periodi (30 divisioni)



Grazie per l'attenzione

