

"Elementi di patologia molecolare"



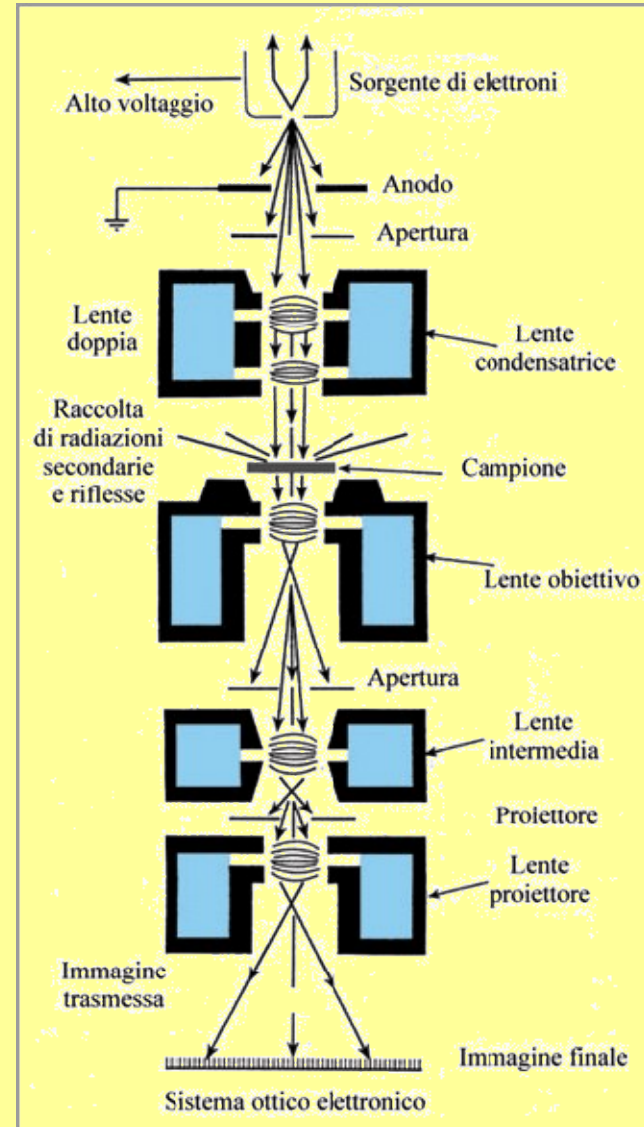
Il microscopio elettronico

Il microscopio elettronico si basa essenzialmente sugli stessi principi di quello ottico, ma fornisce ingrandimenti maggiori. La sorgente luminosa è sostituita da un fascio di elettroni accelerati nel vuoto; le lenti sono sostituite da campi magnetici ed elettrici che hanno un effetto convergente sugli elettroni.

Il microscopio elettronico può essere a trasmissione o a scansione: nel primo gli elettroni attraversano il preparato, nel secondo incidono sulla materia, determinando l'emissione di elettroni secondari che, raccolti, forniscono immagini dettagliate della superficie degli oggetti dei quali risulta una visione tridimensionale.

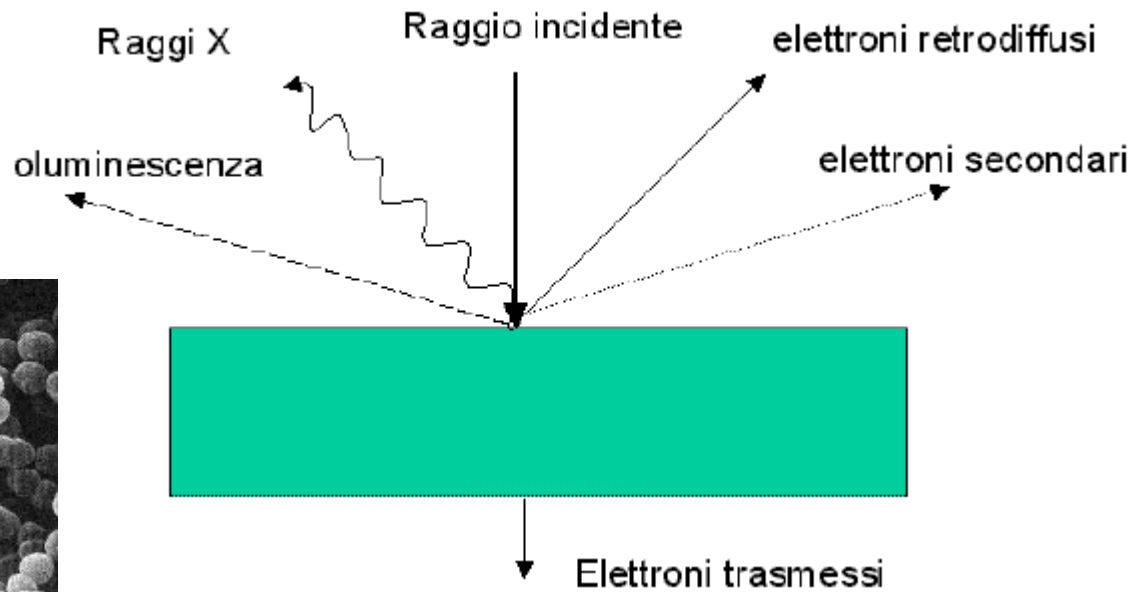
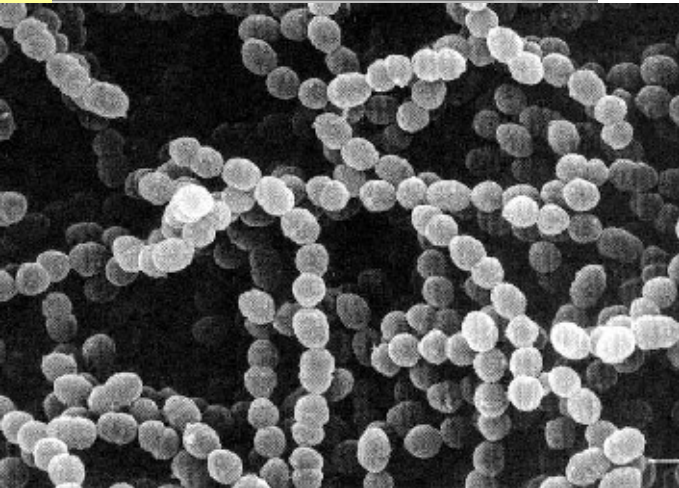
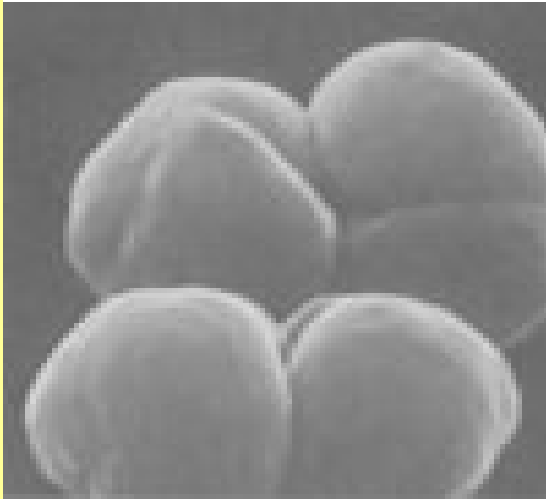
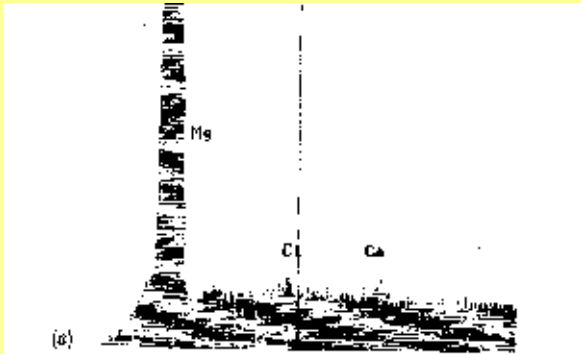


Con il metodo TEM, l'immagine è ricostruita solo con gli elettroni che passano attraverso il campione (che quindi dovrà avere spessore sufficientemente limitato).

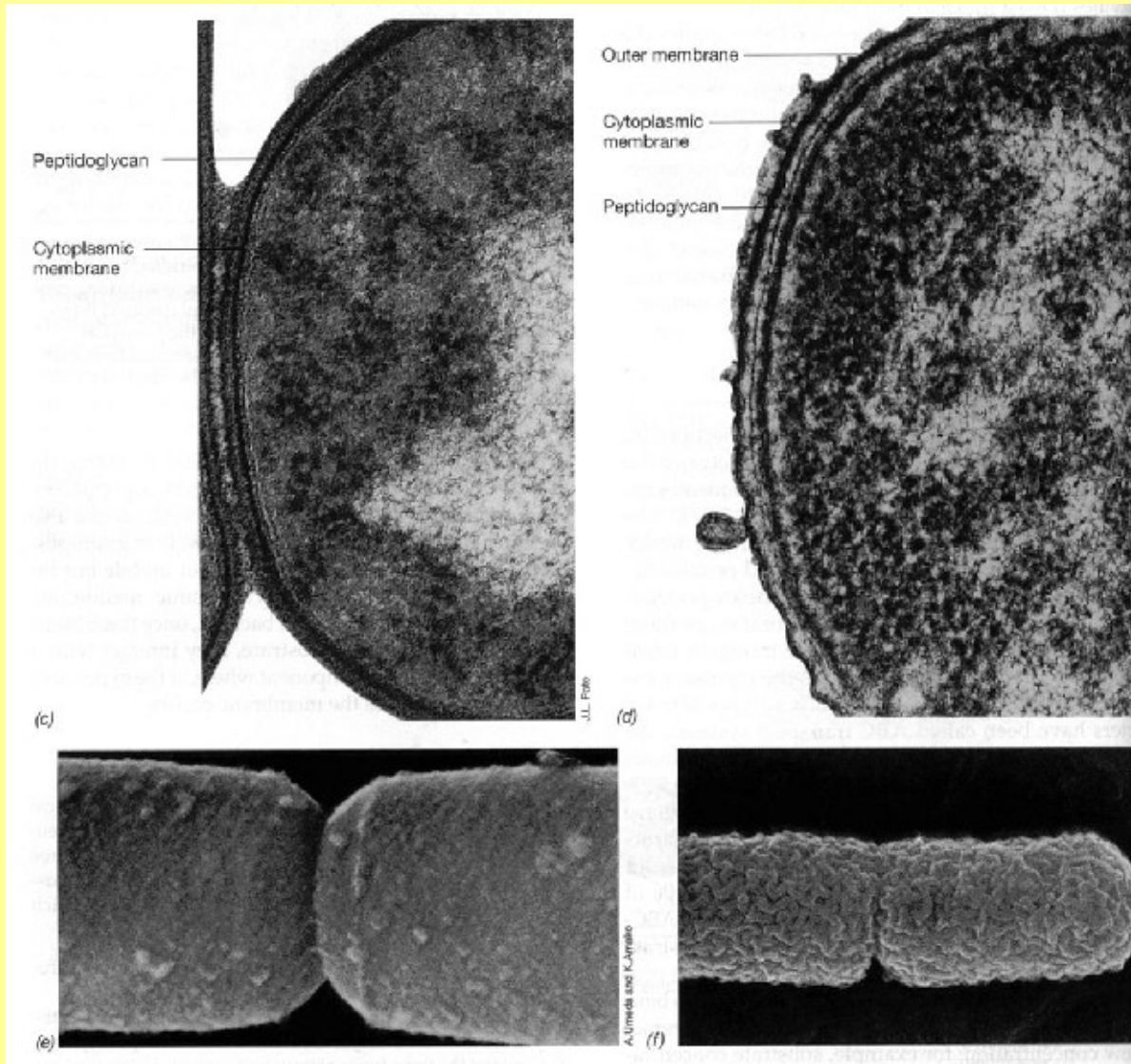


Microscopio elettronico a scansione (SEM)

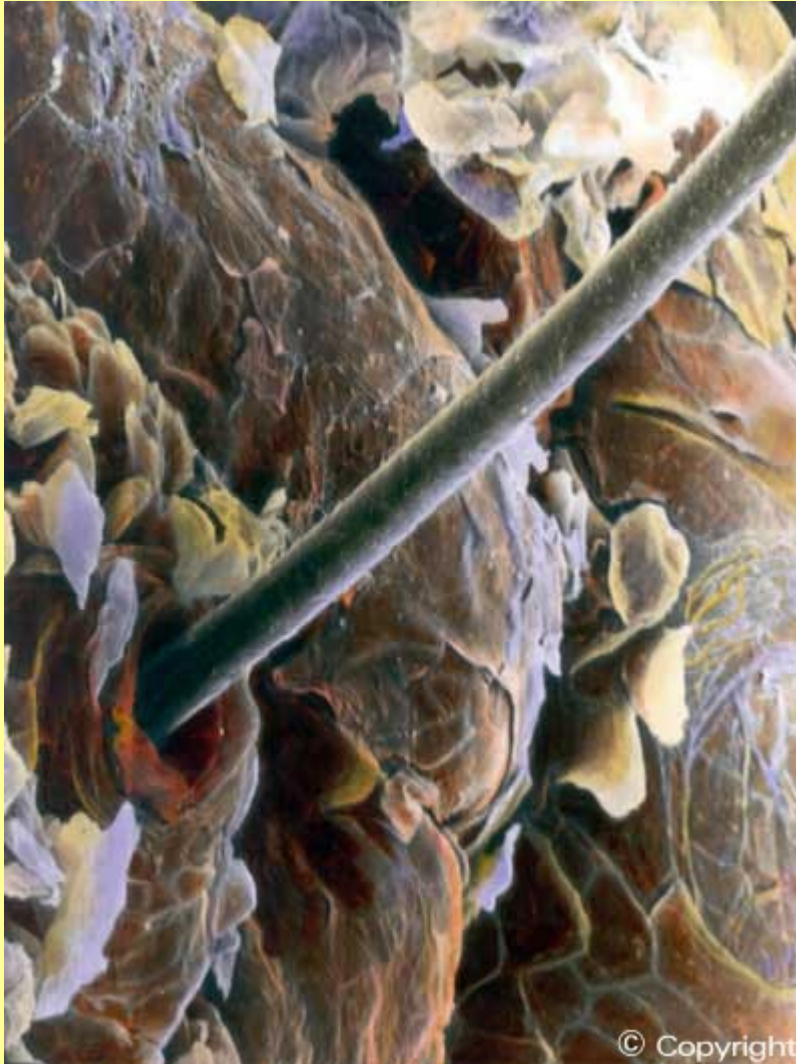
Lo strumento impiega un fascio di elettroni focalizzato, che viene scandito su una superficie prescelta del campione. Gli elettroni (secondari) emessi dalla superficie sono impiegati per la ricostruzione dell'immagine, che in ultimo viene riprodotta su un tubo catodico come un'immagine televisiva "classica".



Confronto fra immagini di microrganismi al SEM e al TEM

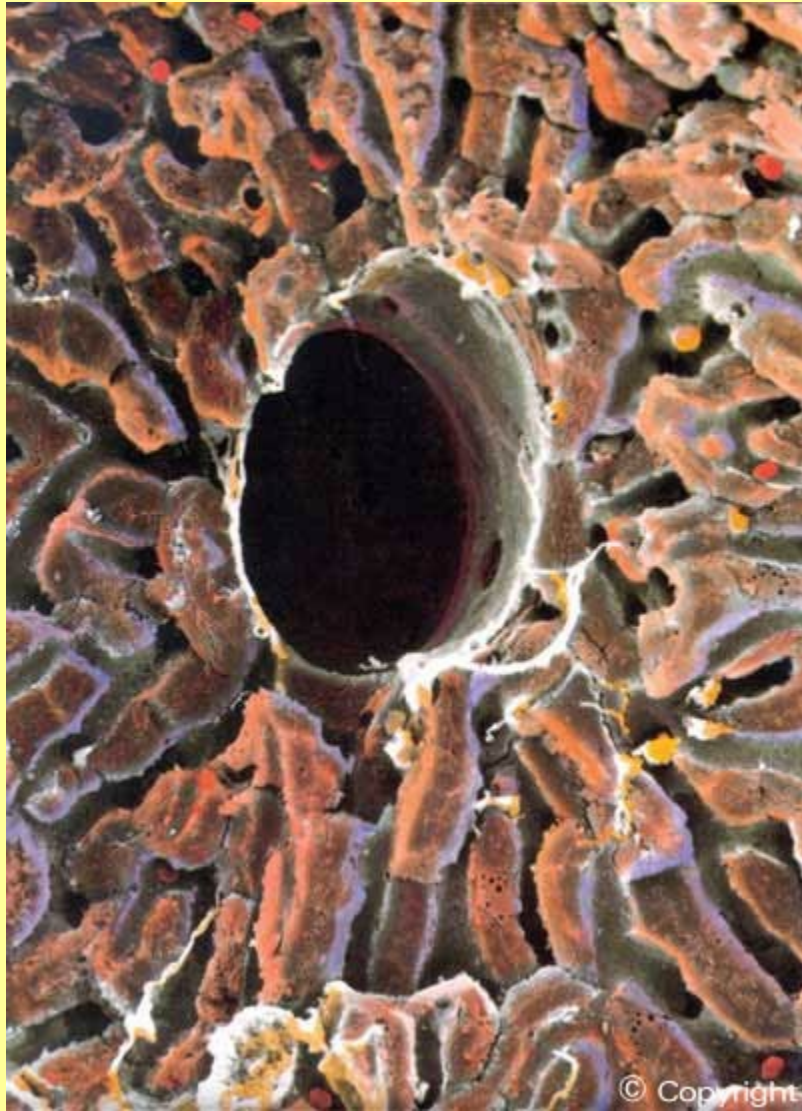


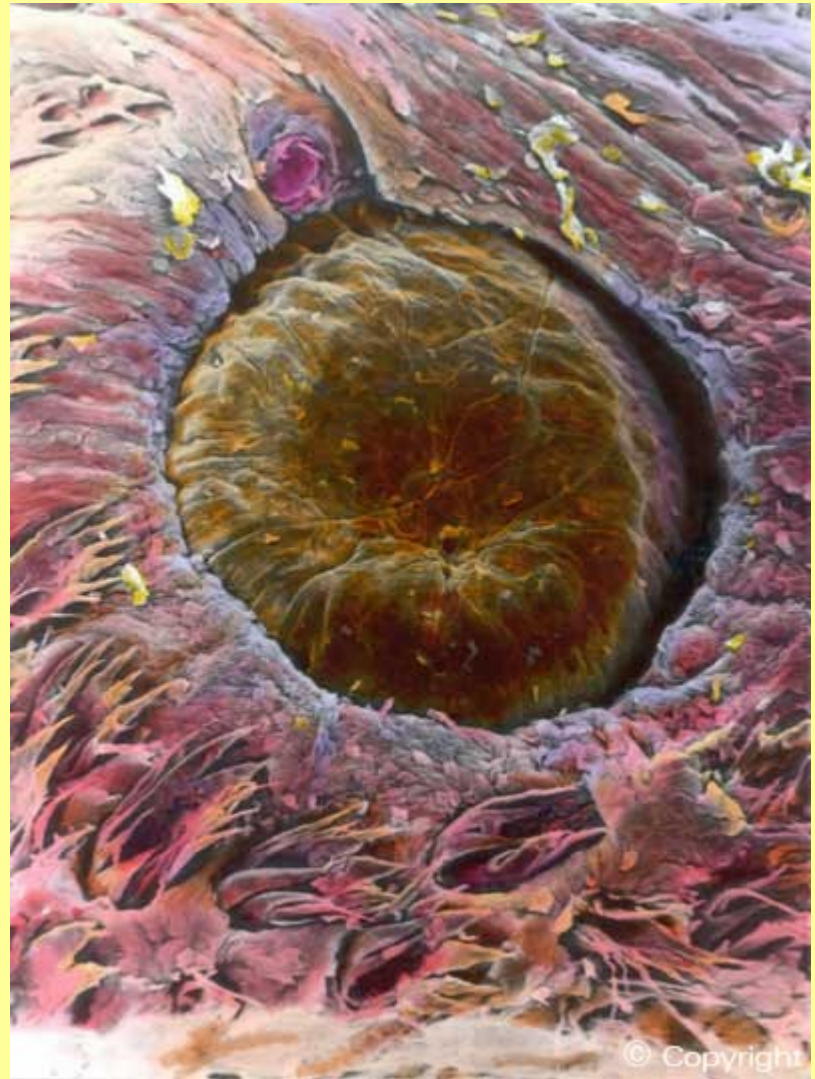
IMMAGINI AL MICROSCOPIO ELETTRONICO A SCANSIONE DEI VARI ORGANI DEL CORPO UMANO

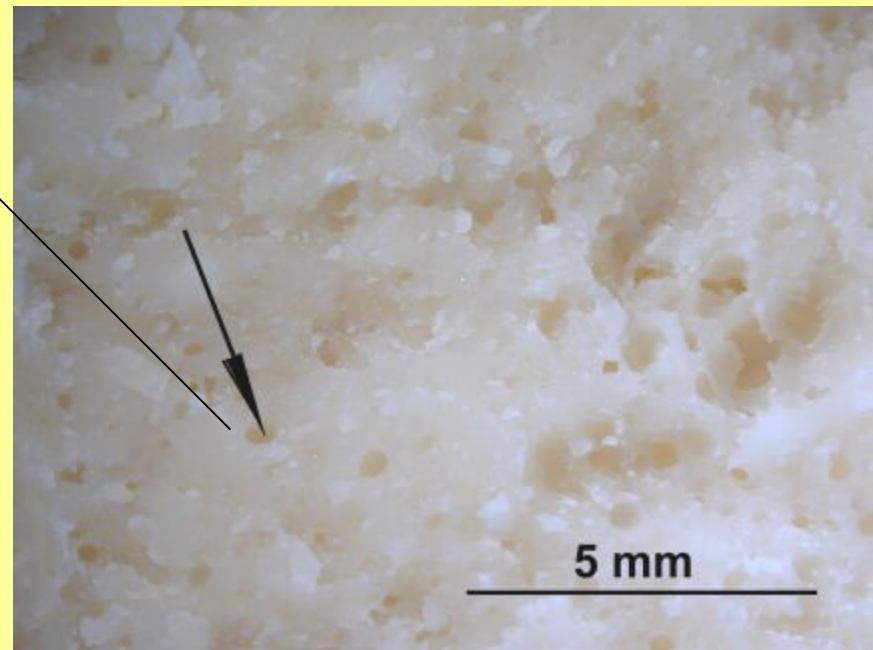
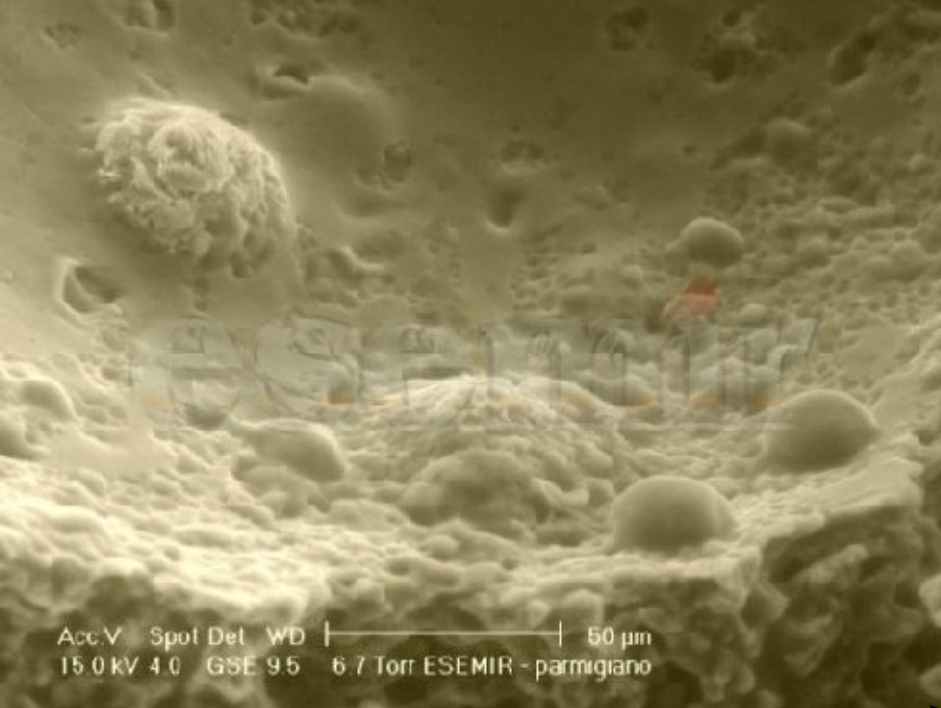


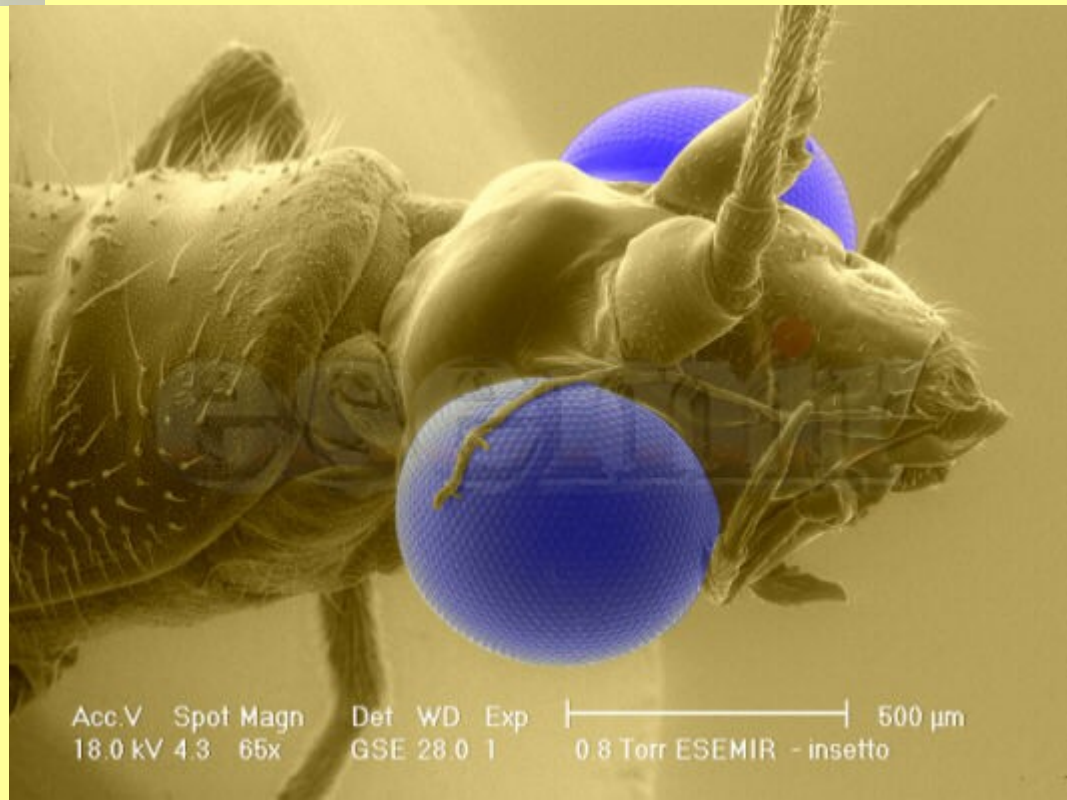
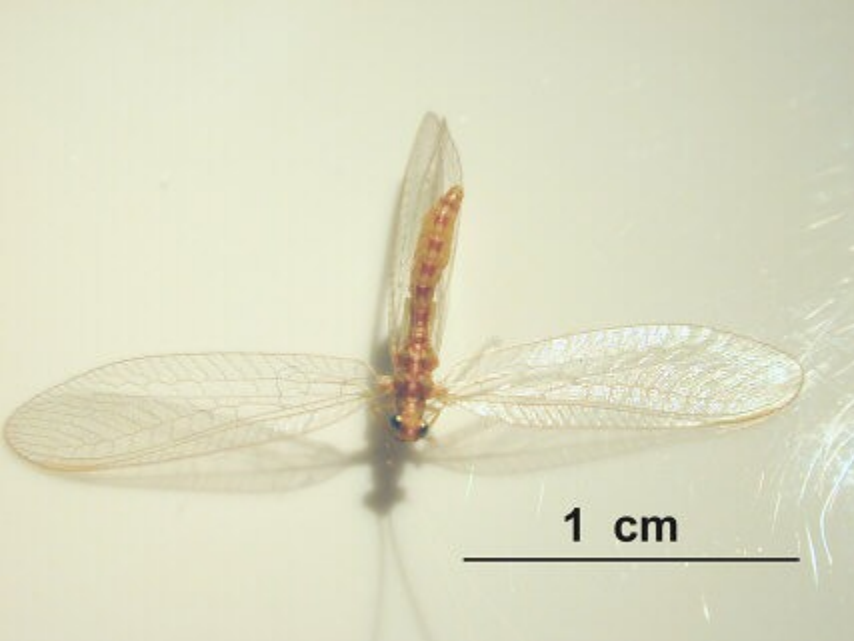
1 - IL PELO

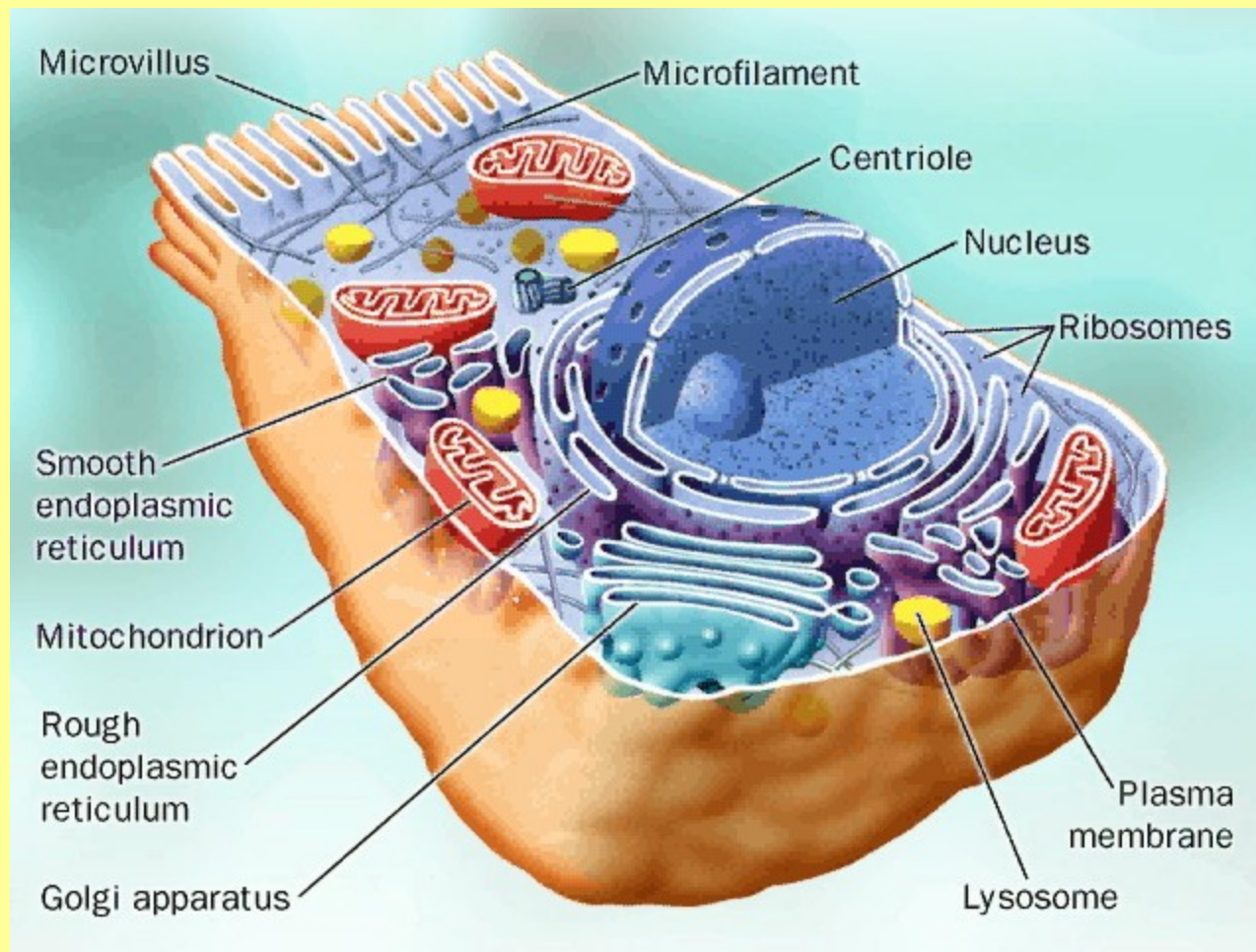
Il pelo di un braccio, così come appare al microscopio elettronico a scansione, assomiglia ad un tronco d'albero che cresce su uno strano terreno, pieno di foglie morte: cioè la cute, con le sue cellule desquamate.

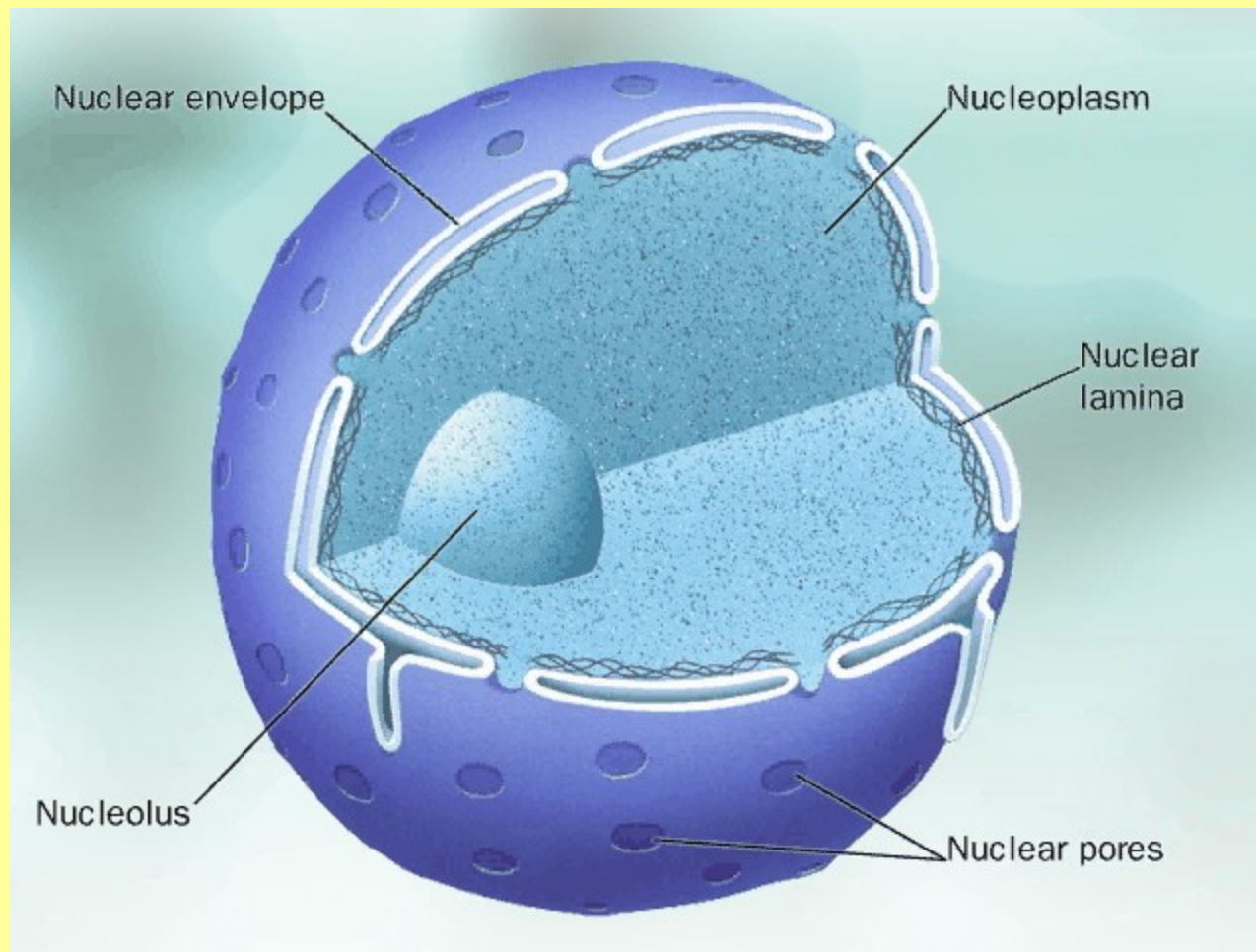


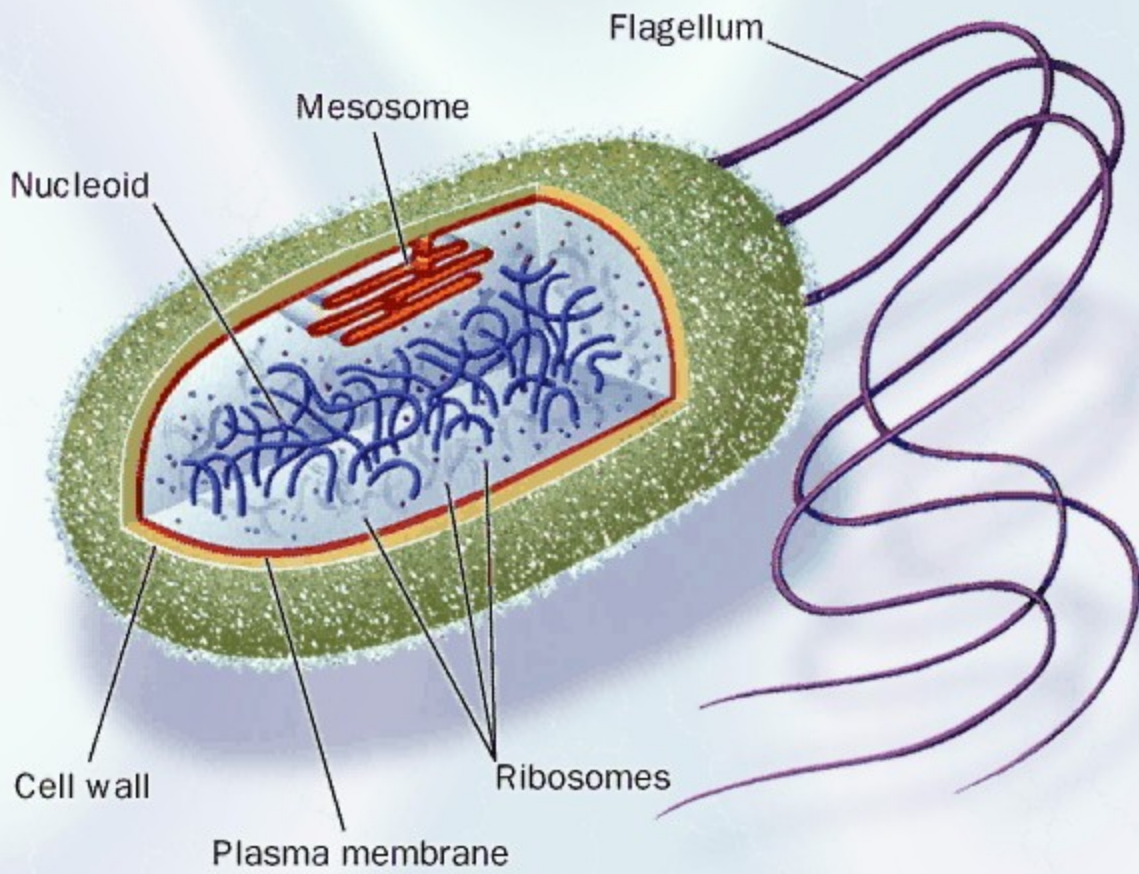


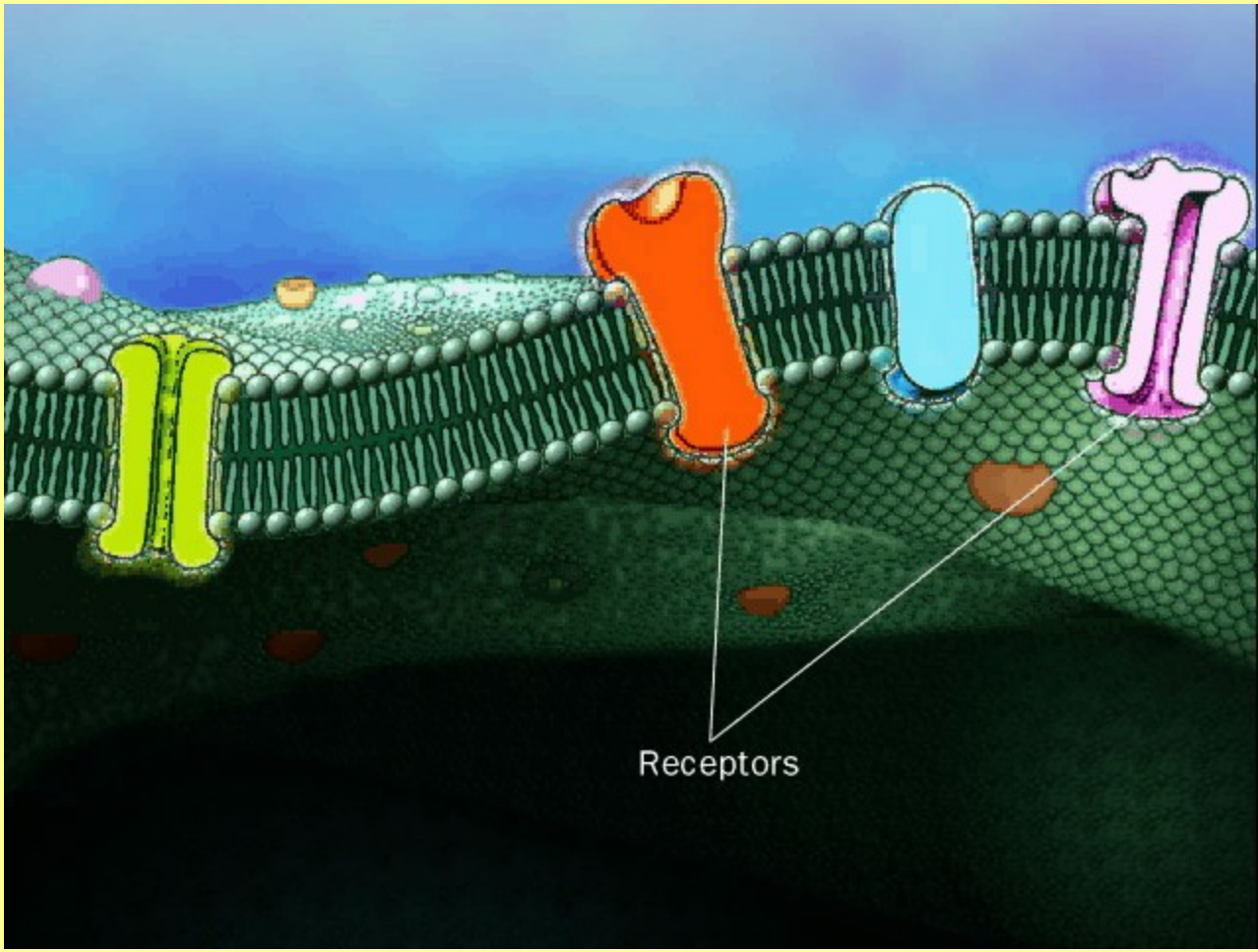






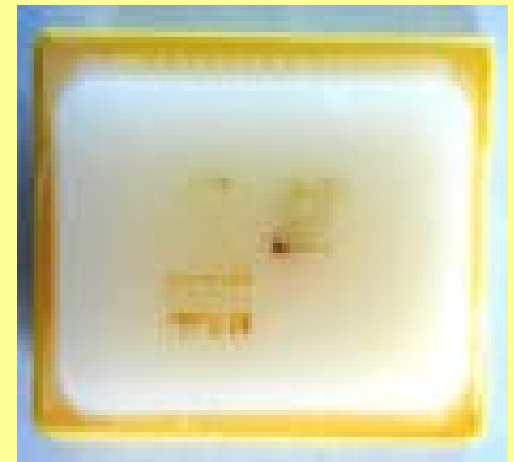
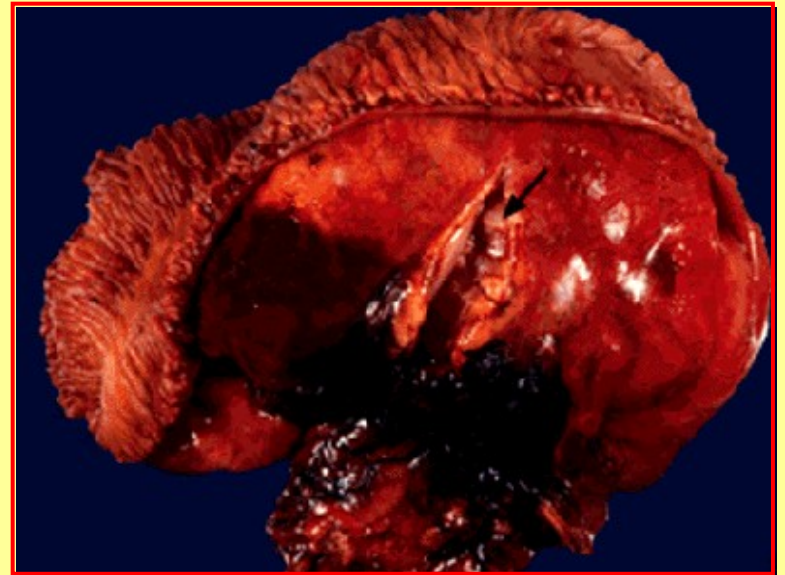






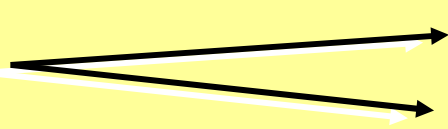
Receptors

Giovan Battista Morgagni



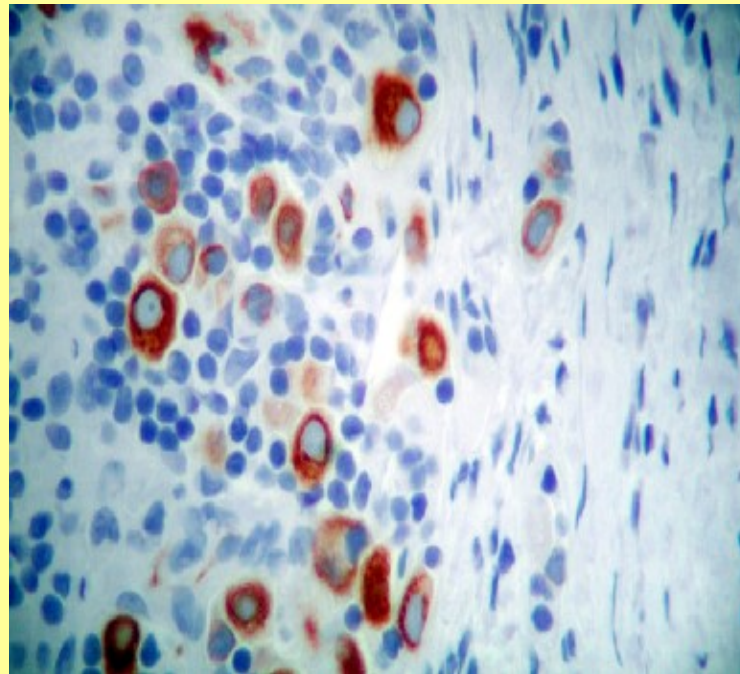
DOGMA: Un tessuto fissato ed incluso era considerato come un tessuto morto utile solo per uno studio morfologico

~~DOGMA:~~



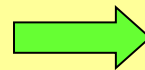
IMMUNOISTOCHIMICA

BIOLOGIA MOLECOLARE



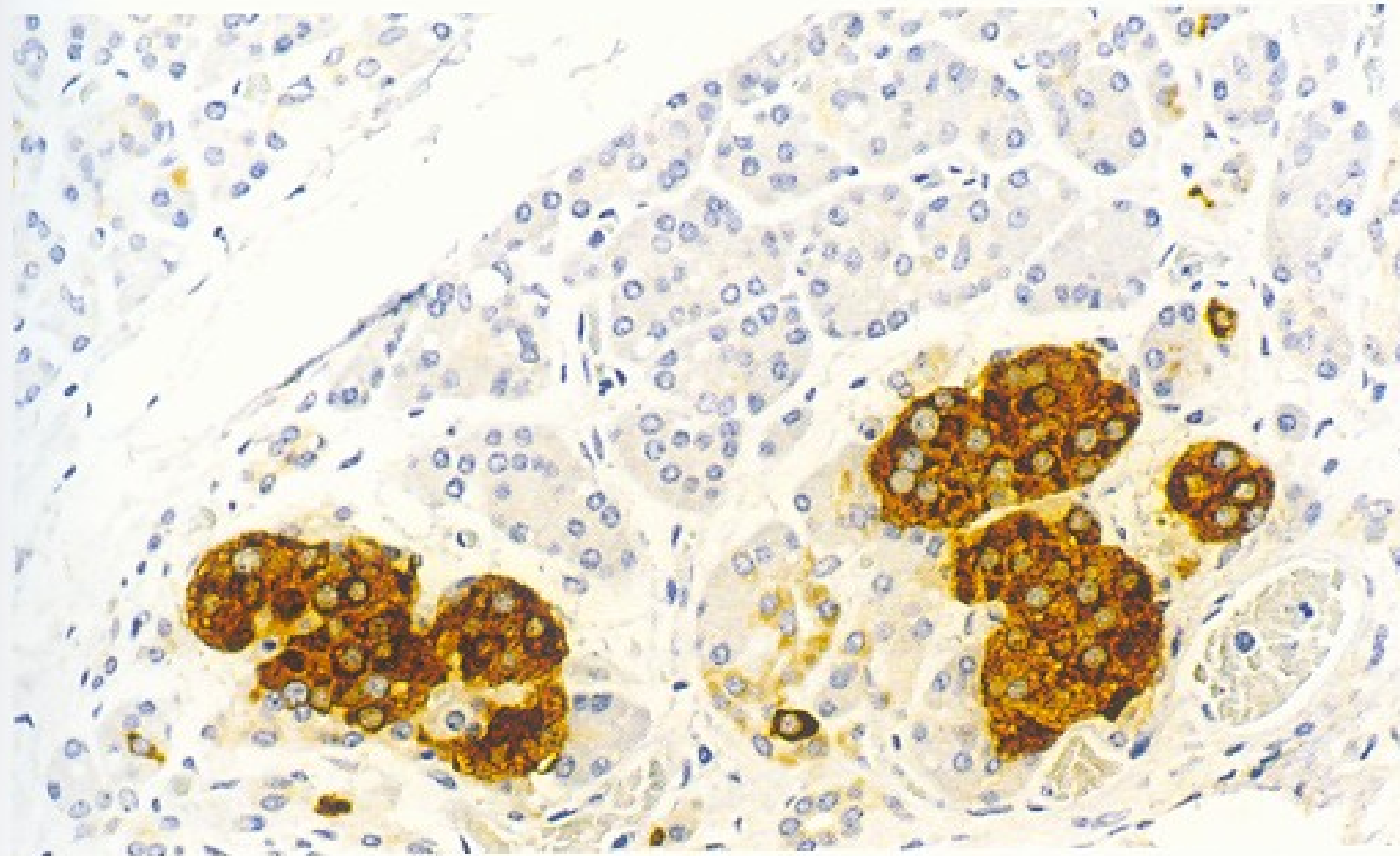
PROTEINE

MORFOLOGIA

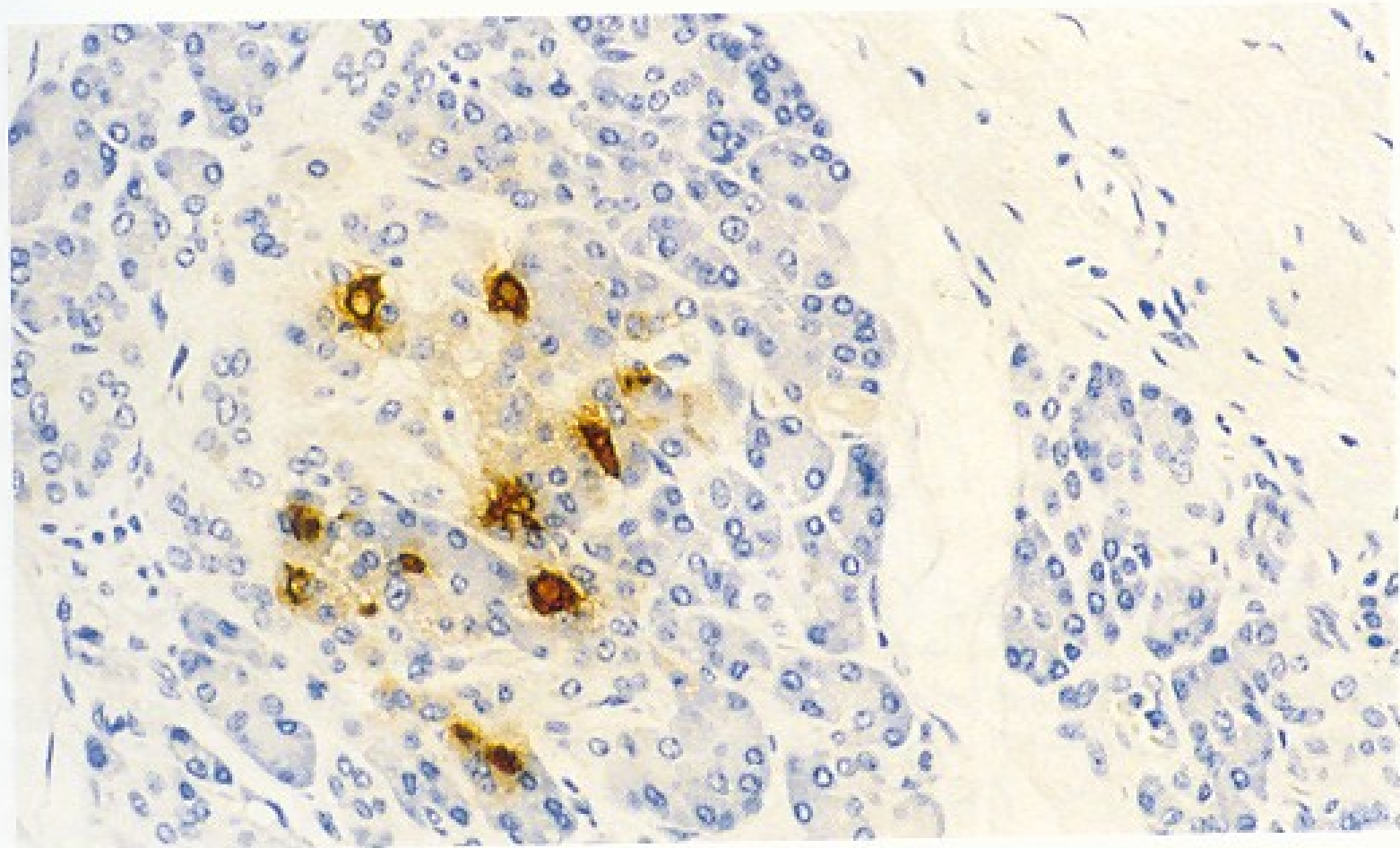


BIOLOGIA

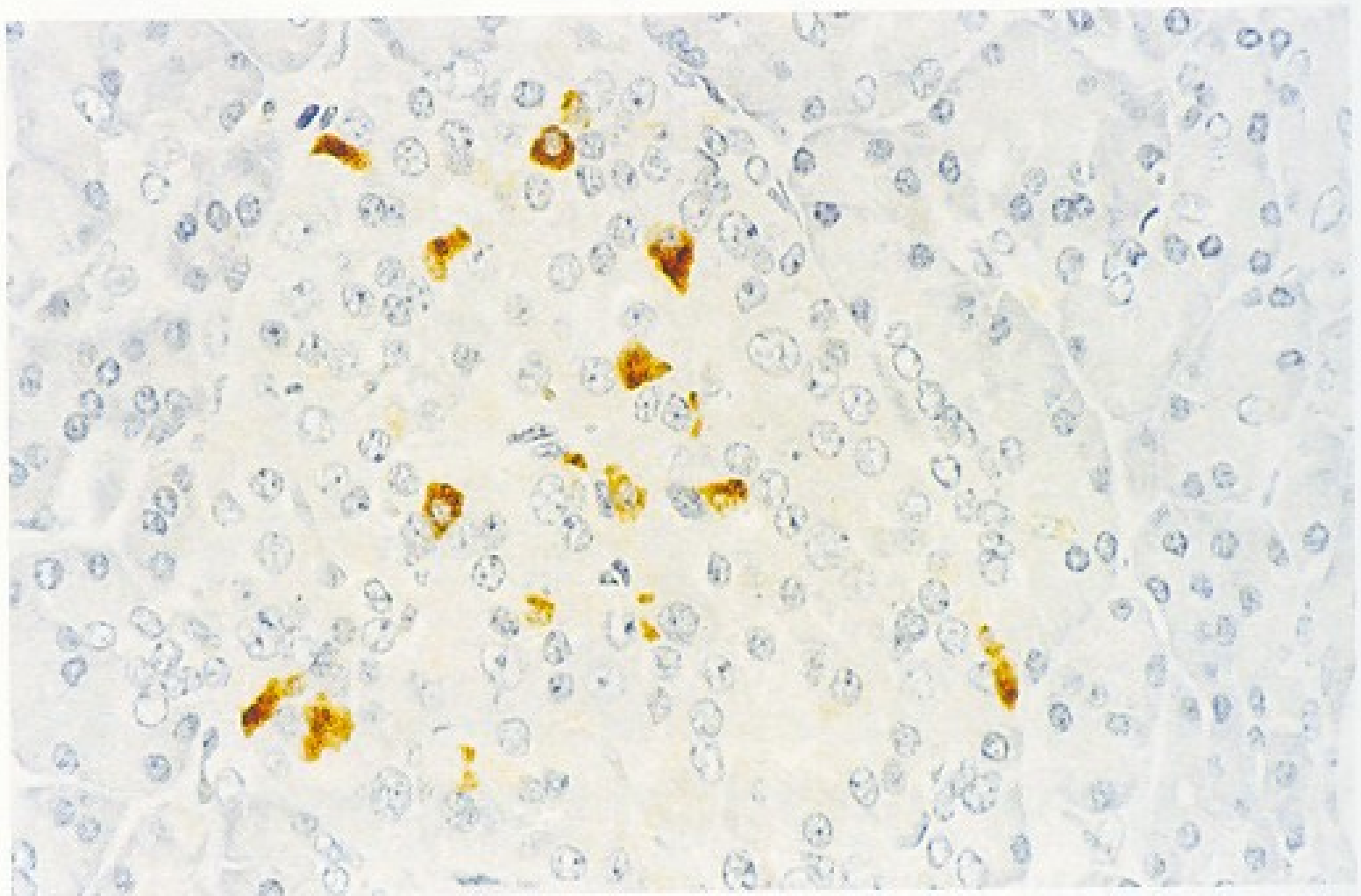
L'immunoistochimica viene considerata come l'insieme di tecniche, applicabili sia alla microscopia ottica che a quella elettronica, che con l'uso di anticorpi specifici identifica sostanze di varia natura, presenti nei tessuti normali e patologici.



Normal human pancreas: immunohistochemical staining for proinsulin using NCL-PROIN-1G4. Note strong cytoplasmic staining of beta cells. Paraffin section.



Normal human pancreas: immunohistochemical staining of pancreatic polypeptide using NCL-PPp. Note intense cytoplasmic staining of alpha cells in islet cell clusters in the exocrine pancreatic parenchyma. Paraffin section.



Normal human pancreas: immunohistochemical staining of somatostatin polypeptide using NCL-SOMATOp. Note staining of delta cells within the pancreatic islets. Paraffin section.



Fig. 20.11 Trabecular insulinoma showing immunoreactivity for proinsulin in the paranuclear Golgi area.

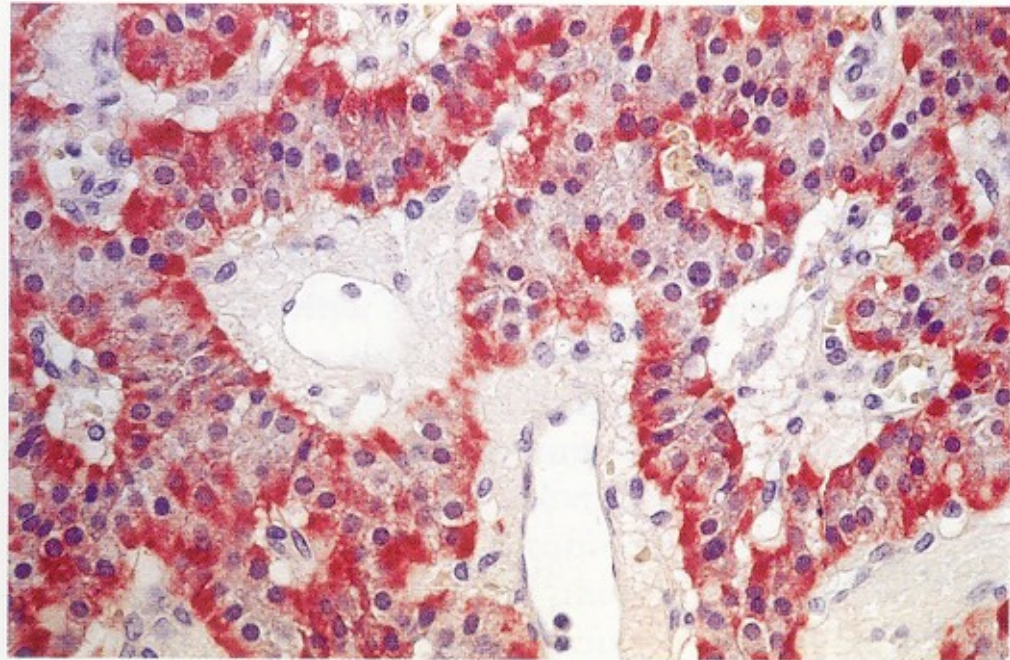


Fig. 20.12 Trabecular insulinoma showing immunoreactivity for insulin at the secretory pole of the tumor cells.

ANTIGENE: molecole proteiche, lipoproteiche o glicoproteiche in grado di evocare una risposta immune da parte del sistema immunitario.

L'EPITOPE (determinante antigenico): porzione della molecola dell'antigene che reagisce con l'anticorpo.

ANTICORPO: immunoglobuline (glicoproteine prodotte dalle plasmacellule) in grado di legarsi ai determinanti antigenici

| | IgG | IgM | IgA | IgD | IgE |
|---------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| Peso molecolare (kD) | 146-170 | 970 | 160 | 184 | 188 |
| Carboidrati | 2-3% | 12% | 7-11% | 9-14% | 12% |
| Fissazione complemento | + | + | - | - | - |
| Passaggio placenta | + | - | - | - | - |
| Legame proteina A stafil. | + | - | - | - | - |
| Legame neutrofili | + | - | + | - | - |
| Legame basofili | - | - | - | - | + |
| Legame linfociti | + | + | + | - | + |

Gli anticorpi (ac.) usati nell'immunoistochimica appartengono generalmente alla classe delle IgG.

La sintesi degli ac. è un punto di cruciale importanza. Gli ac. Possono essere ottenuti in diversi modi; il sistema più semplice è quello di ottenere siero intero da sangue di un animale precedentemente immunizzato con la proteina o la parte della proteina che ci interessa.

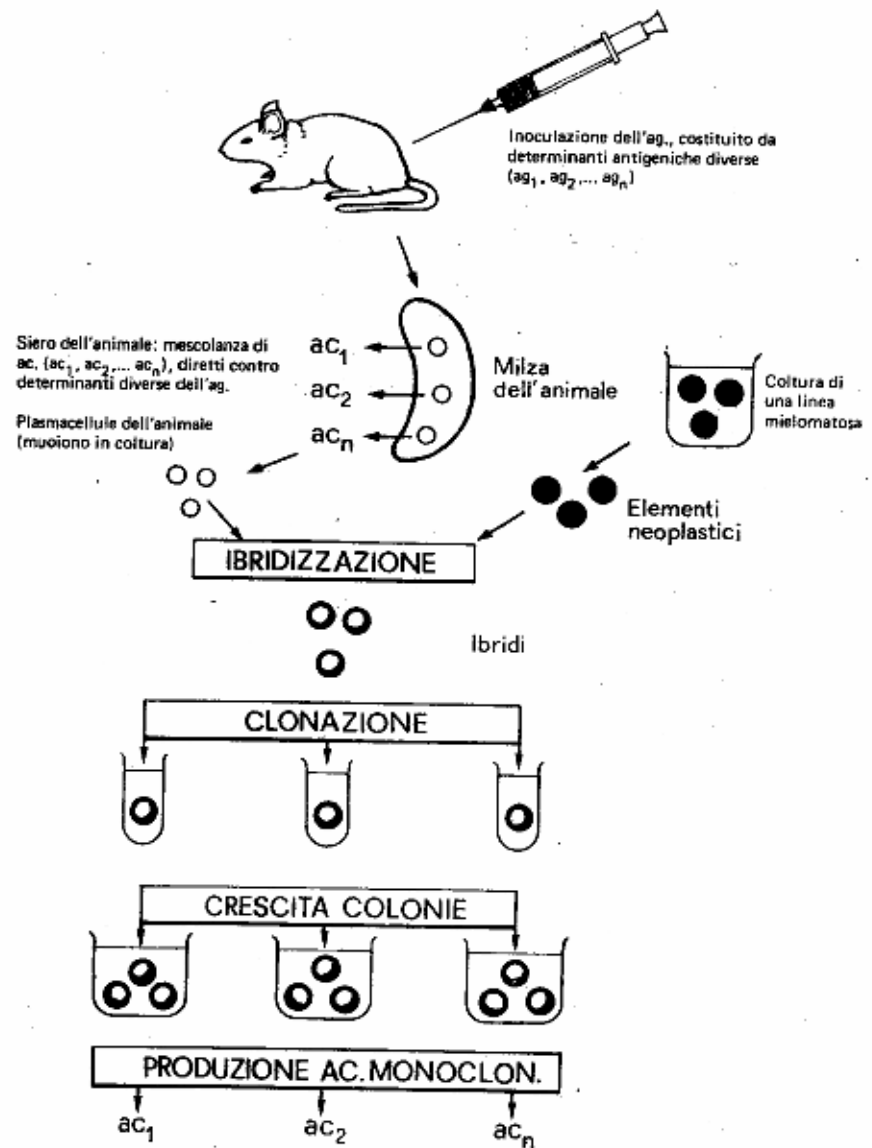


Fig. 6: Rappresentazione schematica delle modalità di produzione degli anticorpi monoclonali.

1941: Coons, anticorpo coniugato con un tracciante fluorescente

1950: anticorpo marcato con fluoresceina su sezioni tissutali

1959: Singer, anticorpi coniugati con molecole elettrone-dense

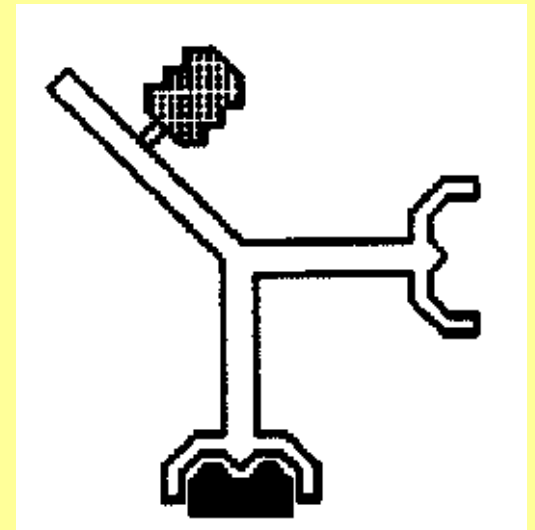
1966: marcatura degli anticorpi con enzimi

1969: immunocomplesso perossidasi-anti-perossidasi.

1970: metodo a ponte (PAP bridge)

1980: anticorpi con biotina (vitamina H) e legame con avidina e perossidasi.

Il principio dell'immunoistochimica si basa sul riconoscimento di un antigene mediante l'utilizzo del rispettivo anticorpo



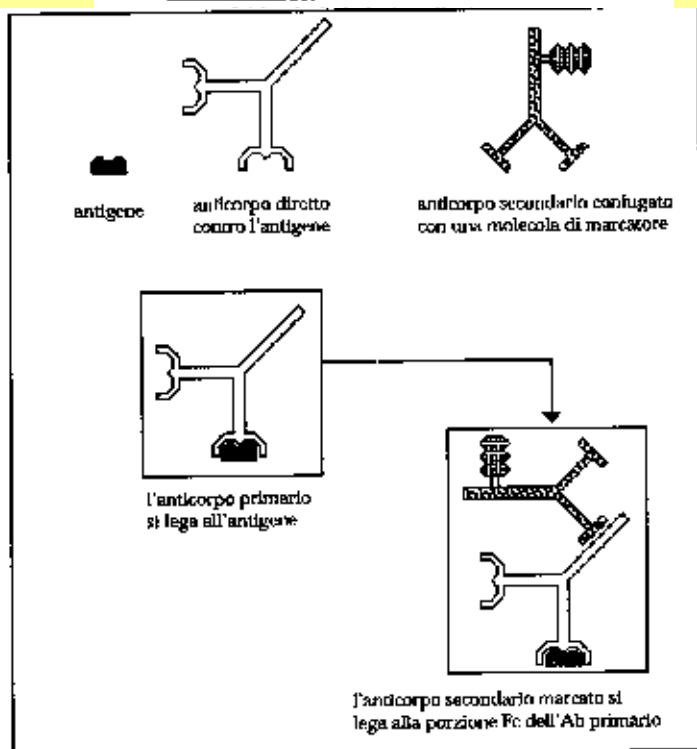
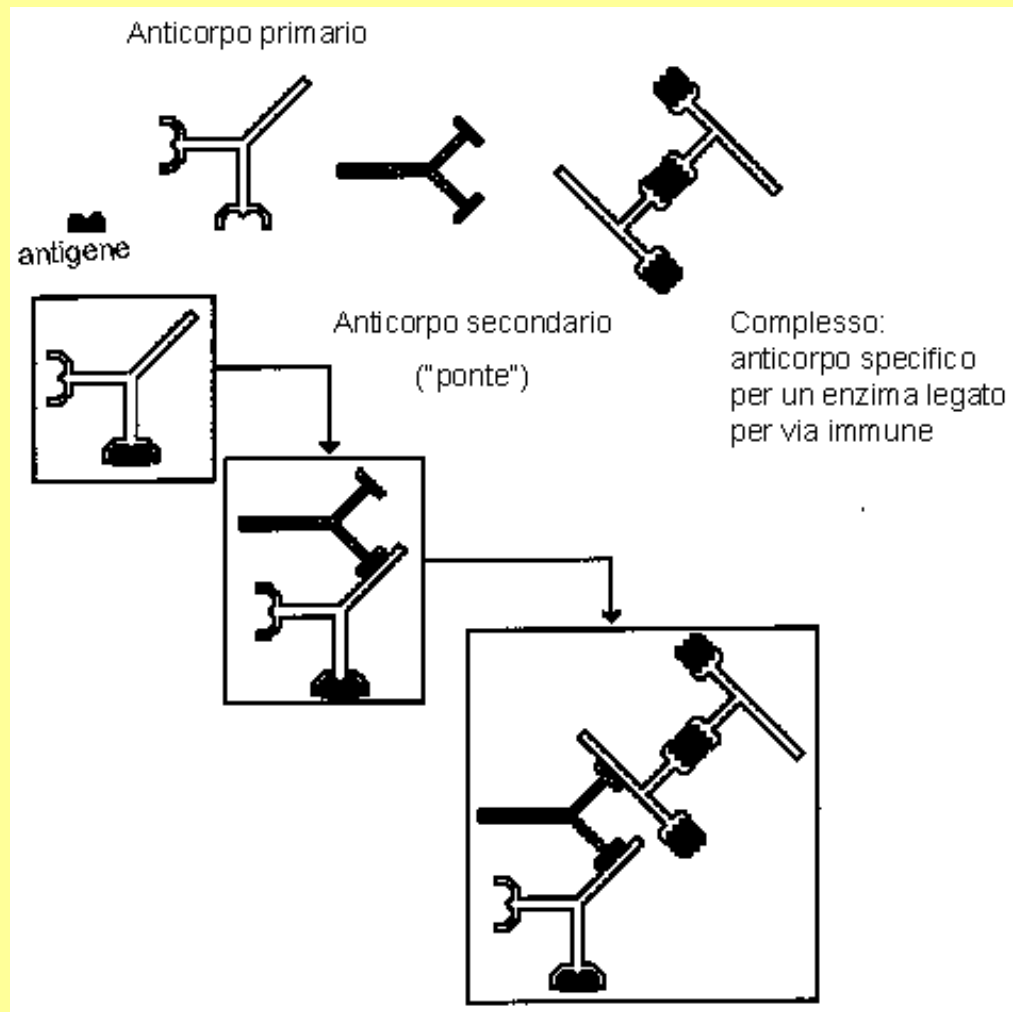
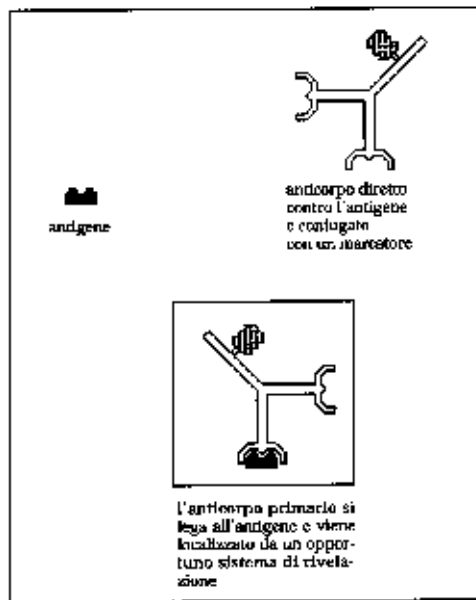


Figura 8. Metodo di rivelazione indiretto.

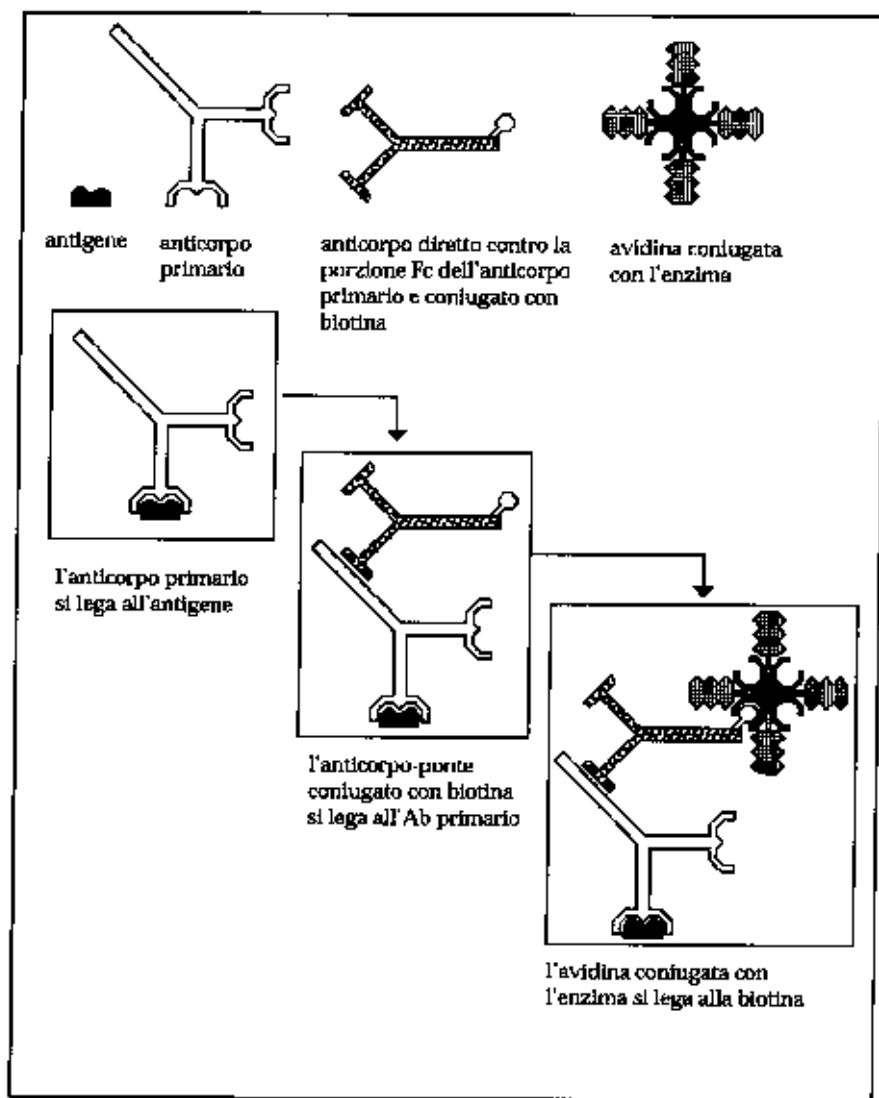


Figura 8b. Metodo indiretto con avidina e biotina.

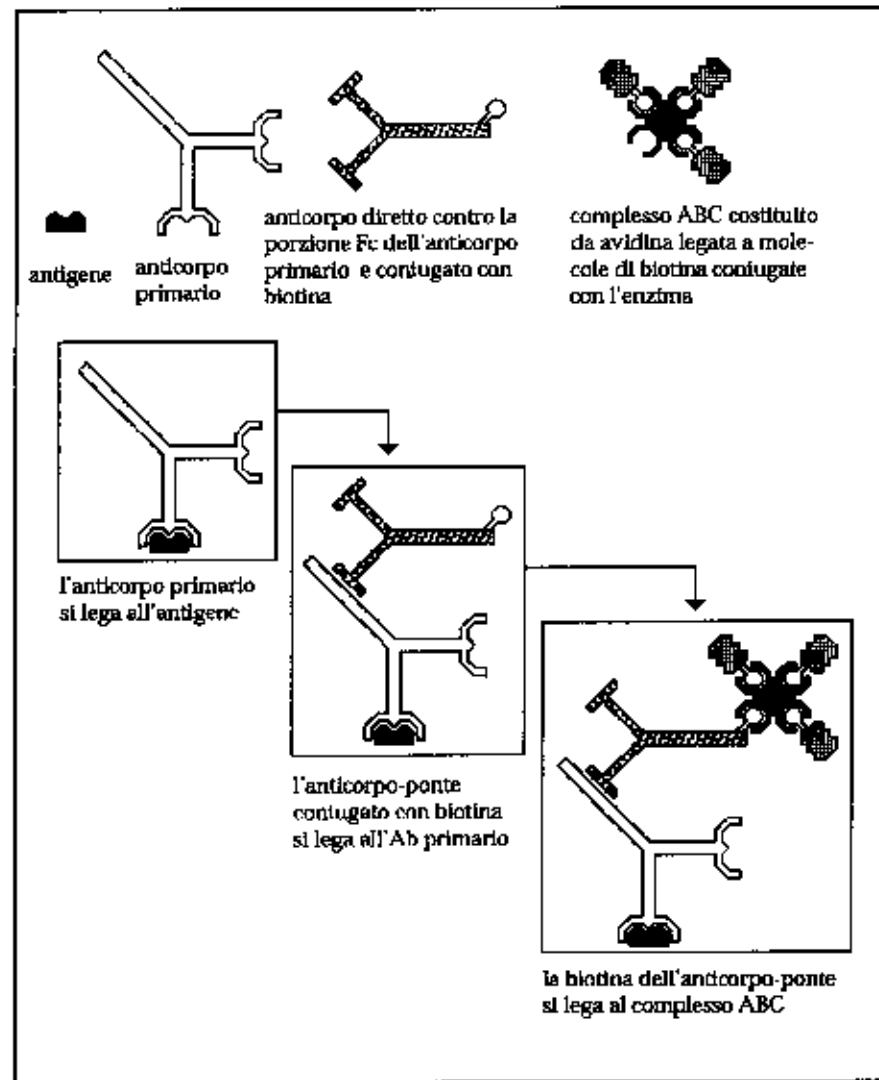


Figura 8c. Metodo con avidina e biotina denominato ABC.

CITOCHERATINE

Filamenti intermedi (tra microfilamenti e microtubuli)

Citocheratine: famiglia di circa 20 proteine che vanno da 44 a 68 kilodalton. Almeno una citocheratina è presente in tutte le cellule di derivazione epiteliale.

Citocheratine a basso peso molecolare: epiteli semplici o viscerali

Citocheratine ad alto peso molecolare: epiteli complessi e desquamizzanti.

Con un cocktail di citocheratine, virtualmente tutte le neoplasie epiteliali sono positive (escluso alcuni carcinomi adeno-corticali).

CK7 - CK20

L'espressione delle citocheratine nei tumori è simile a quella presente nei tessuti di origine normali. Le CK 7 e 20 sono le più usate per determinare il sito primario di origine della neoplasia di un carcinoma non differenziato

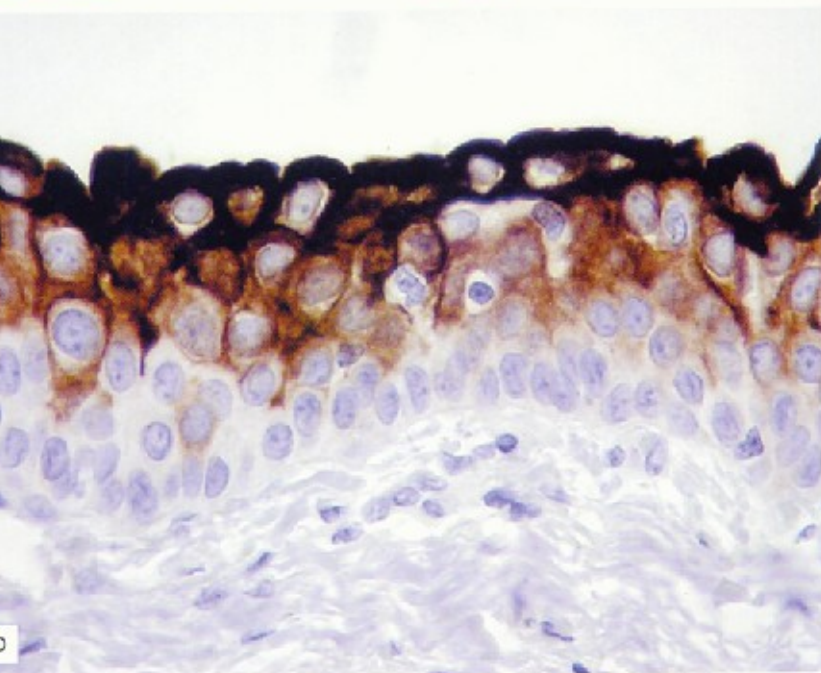
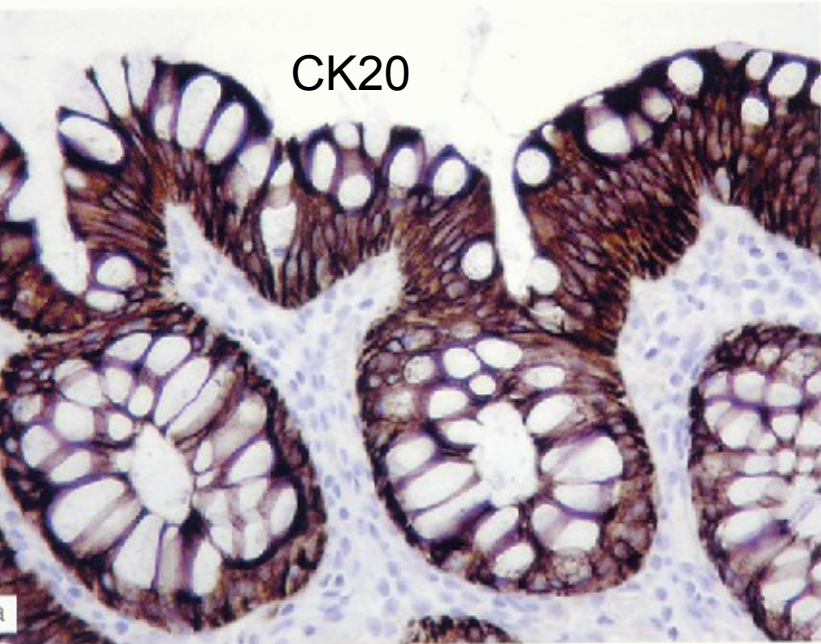


Figure 2. Colon (a) and bladder mucosa (b) stained with anti-cytokeratin 20, clone K₁₂20.8. Note abundant staining of intestinal epithelium (a) and predominant staining of the luminal umbrella cells of the urothelium (b).

Neoplasia epatica

Epatotocarcinoma

CK8 e 18 positivi

Colangiocarcinoma

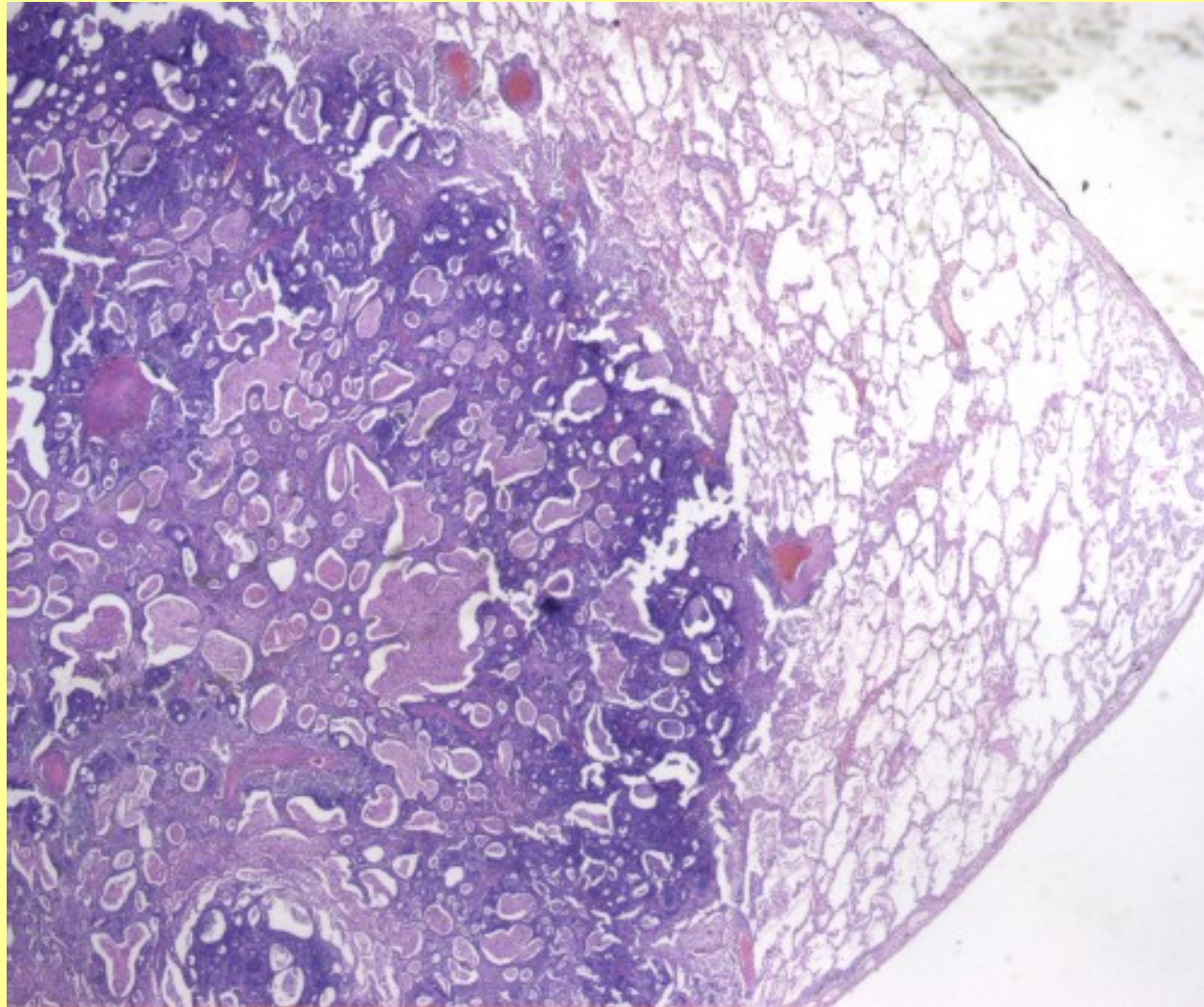
CK 7 e 19 positivi

Caso 1: neoplasia epatica CK18 positiva e CK 19 negativa:
Diagnosi finale: epatocarcinoma primitivo.

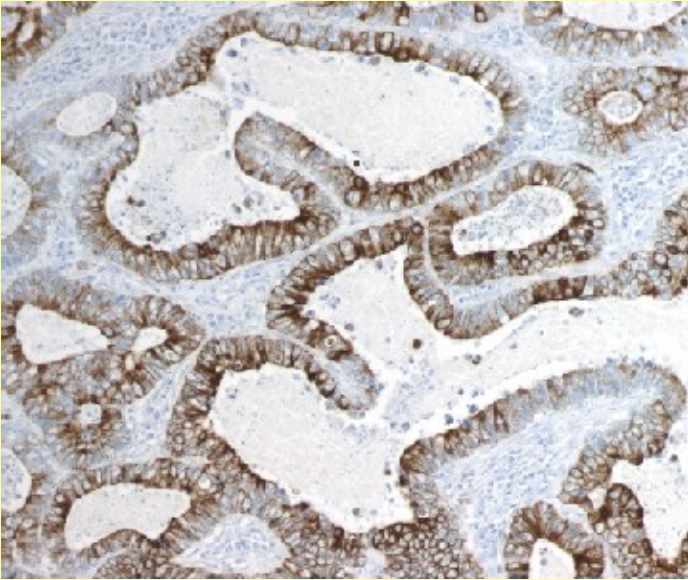
Caso 2: neoplasia epatica CK20 positiva CK 7, 18 e 19 negativa.
Diagnosi finale: probabile metastasi di neoplasia del colon.

Caso 3. Neoplasia del polmone: Diagnosi Differenziale: Metastasi di carcinoma del colon o primitivo?

EE

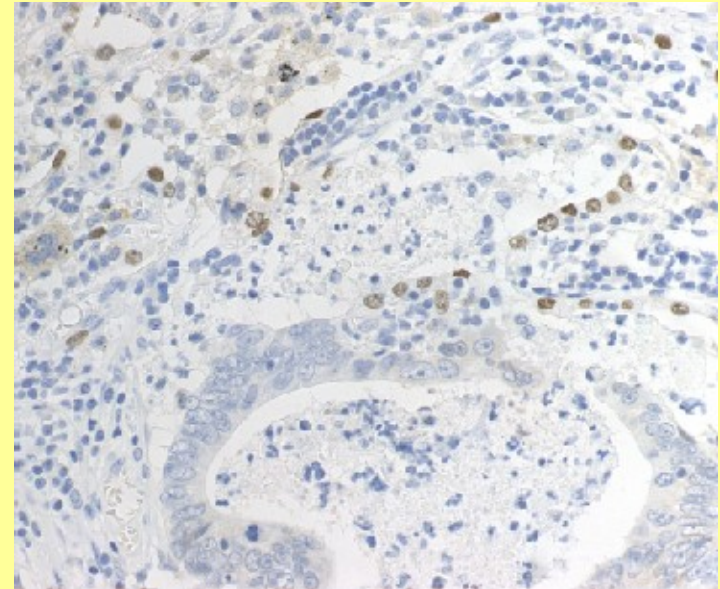


CK20 positivo



Le cellule neoplastiche sono positive.

TTF-1 negativo



Le cellule neoplastiche sono negative, intensa espressione nucleare nelle cellule dell'epitelio alveolare residuo.

Diagnosi Finale: Metastasi di adenocarcinoma del colon

TTF-1 (fattore di trascrizione tiroideo) : eccellente marcatore di primitività polmonare o tiroidea

CK 2,9, 4, 5, 6, 8, 10, 14, 15, 16, 19

CK 1, 5, 6, 8, 10, 14, 18

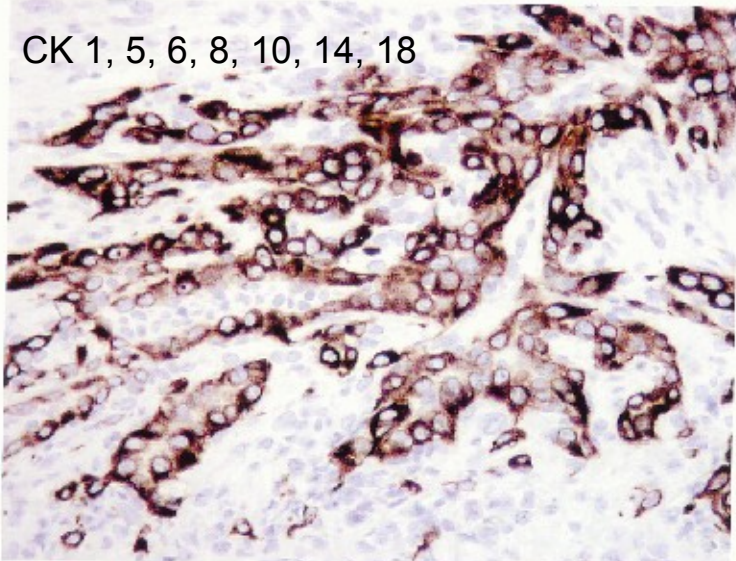


Figure 4. Epithelial malignant mesothelioma stained with Anti-Cytokeratin, Clone 34βE12, code No. M 0680. Note abundant expression of several epithelial CKs despite tubular growth pattern, a feature independent of differential diagnosis against adenocarcinoma.

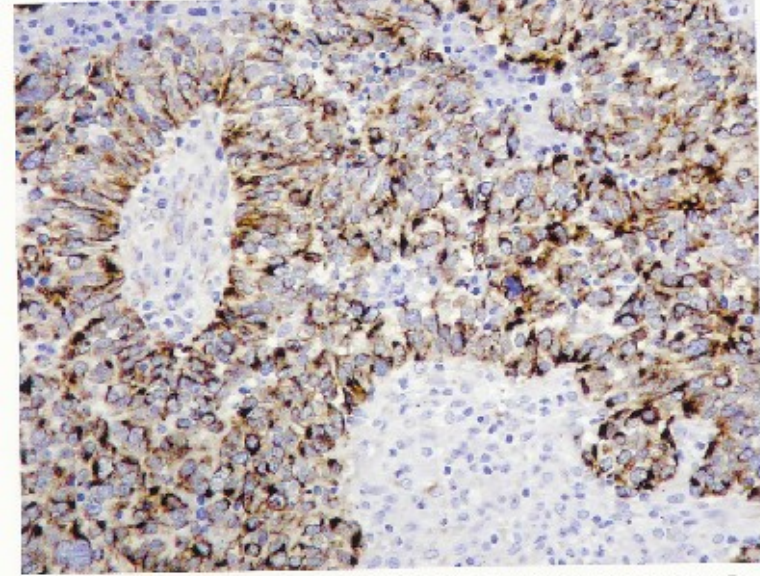


Figure 5. Small cell lung carcinoma stained with Anti-Cytokeratin, Clone AE1/AE3, code No. M 0615. The staining is cocklike in some tumor cells.

CK 1, 5, 6, 8,
10, 14, 18

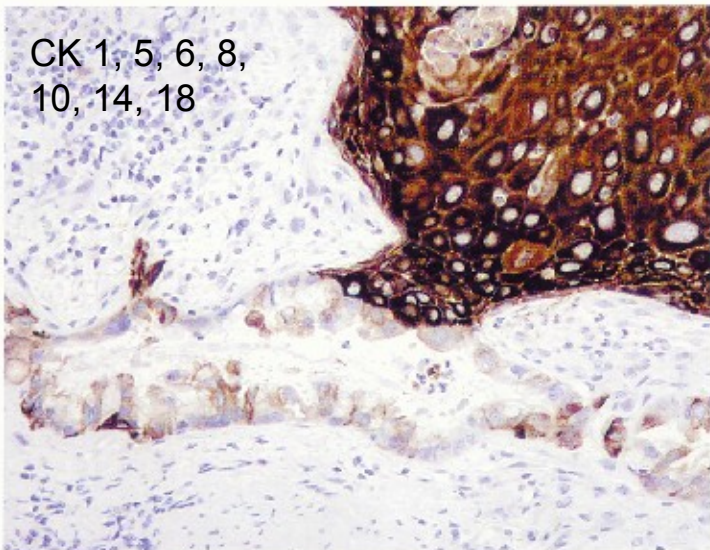


Figure 6. Adenosquamous carcinoma of gall bladder stained with Anti-Cytokeratin, Clone 34βE12, code No. M 0680. Note the strong staining of partially the squamous elements, while the adenomatous part is faintly stained.

CK 5, 6

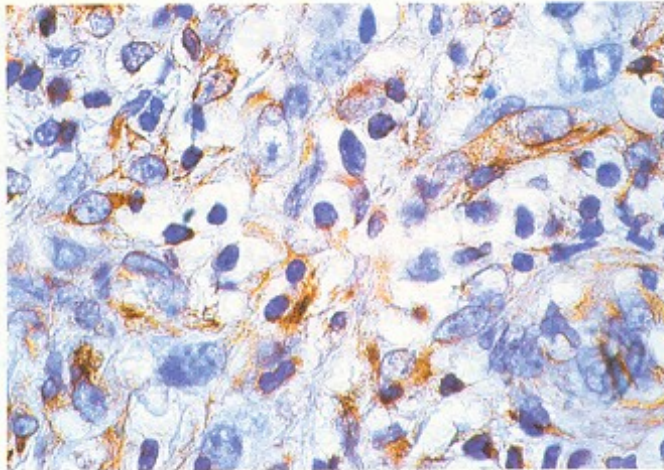


Figure 7. Ductal breast carcinoma stained with Anti-Cytokeratin 5/6, Clone DC10 E4, code No. M 0237. Only the myoepithelial cells are stained using the identification of an in situ lesion which here is retained within the massive ductal carcinoma.

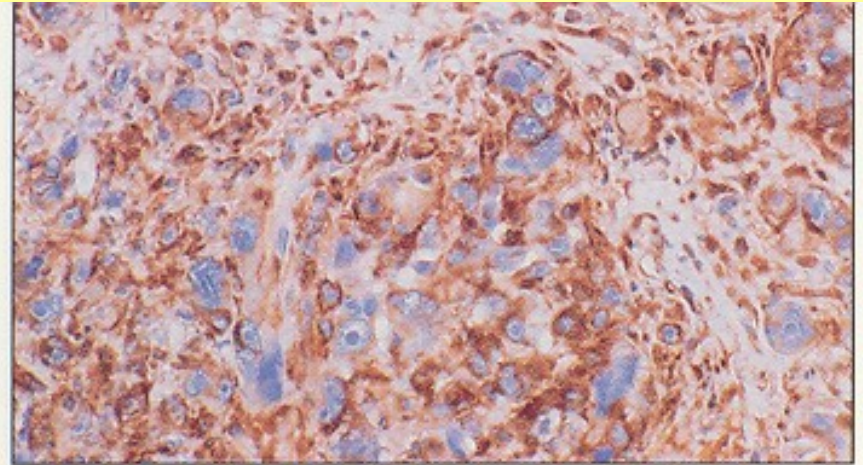
VIMENTINA.

E' il filamento intermedio caratteristico delle cellule mesenchimali e di quelle ematolinfoidi. Il carcinoma della mammella in alcuni casi può esprimere la vimentina (prognosi peggiore).

Una forte positività per la vimentina è caratteristica dei melanomi maligni, perciò una neoplasia epitelioide che è vimentina positiva e citocheratina negativa potrebbe essere un melanoma.



Vimentin (V9): sc-6260. Immunoperoxidase staining of formalin-fixed, paraffin-embedded human breast carcinoma tissue showing cytoskeletal localization.

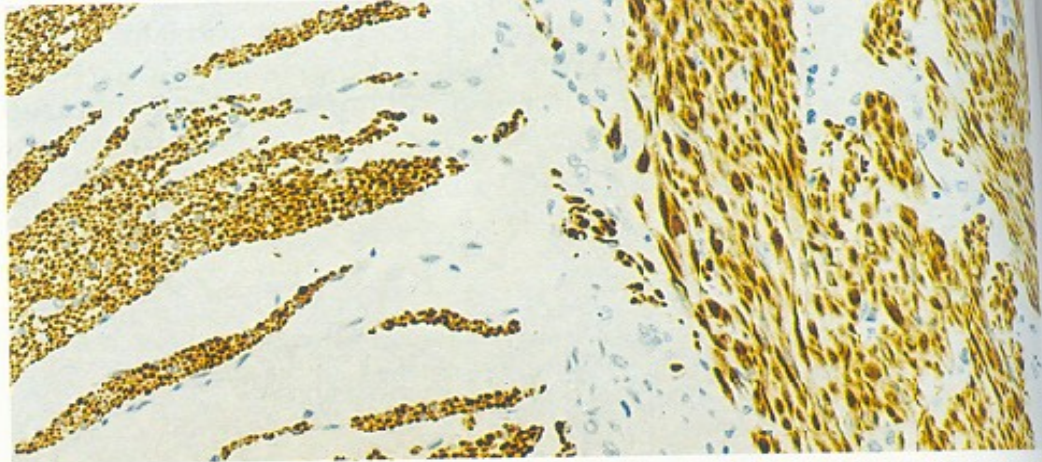


Melanoma stained with anti-Vimentin MAb [V9] using DAB chromogen.

S-100, HMB-45, MART-I,
Melan-A, Tyrosinasi

DESMINA:

Filamento intermedio delle cellule muscolari

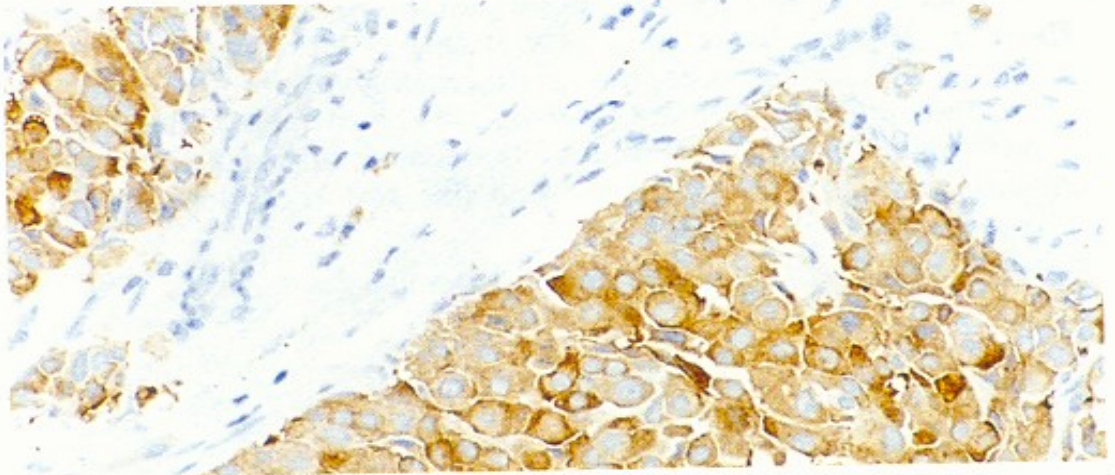


Normal human small intestine: Immunohistochemical staining for desmin using NCL-DES-DE11. Note cytoplasmic staining of muscle cells in the muscularis externa. Paraffin section.

MARKERS NEUROENDOCRINI:

NEUROFILAMENTI: neuroblastomi e cellule epiteliali neuroendocrine.

Cromogranina, Sinaptofisina, CD57



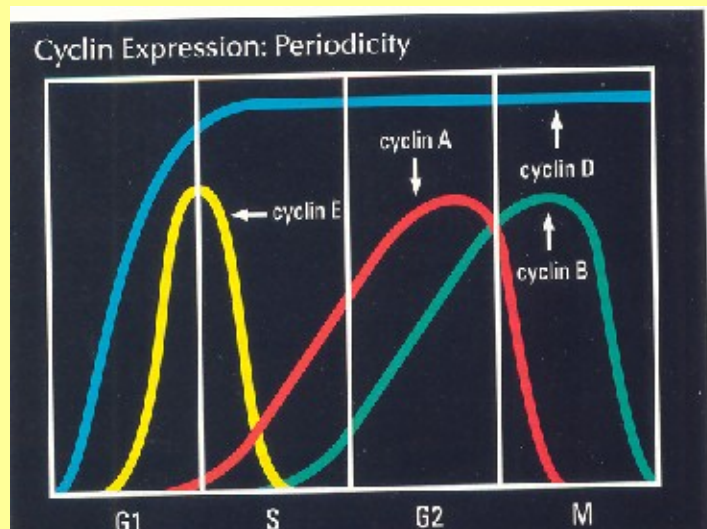
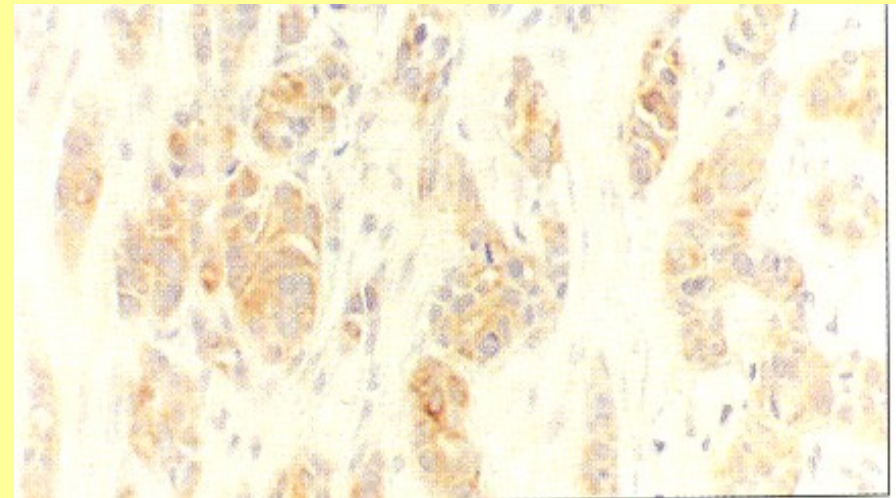
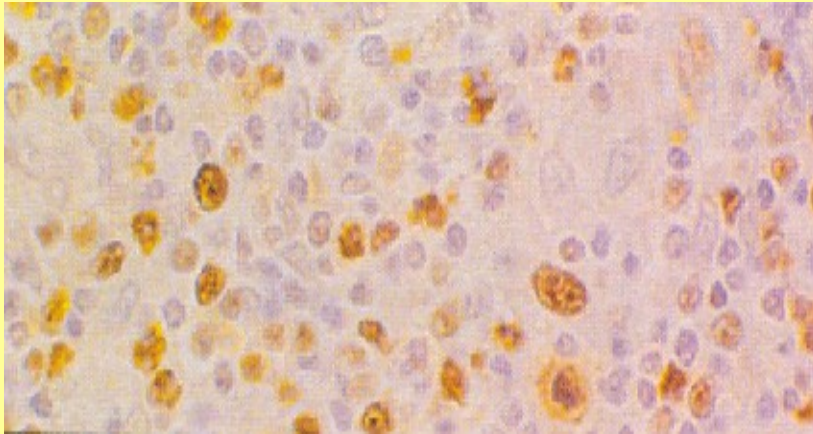
Breast carcinoma showing neuroendocrine differentiation: immunohistochemical staining for synaptophysin using NCL-SYNAP-299. Note cytoplasmic staining of tumour cells. Paraffin section.

MARKERS DI PROLIFERAZIONE:

PCNA (proliferating Cell Nuclear Antigen)

Ki-67 (espresso in G1, S, G2 e in M; è assente nella fase G0)

CICLINE (caratteristiche di diverse fasi del ciclo cellulare)

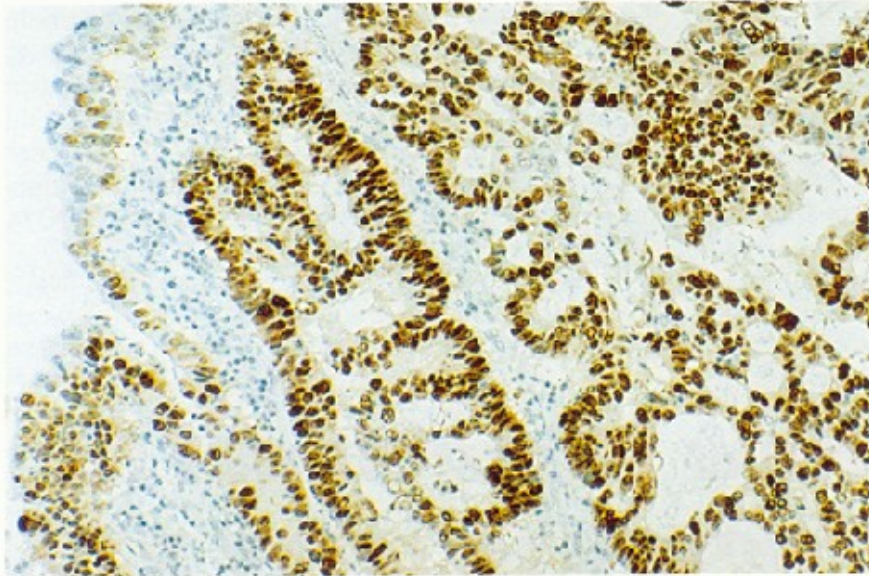


Timidilato Sintasi in un tumore del colon;

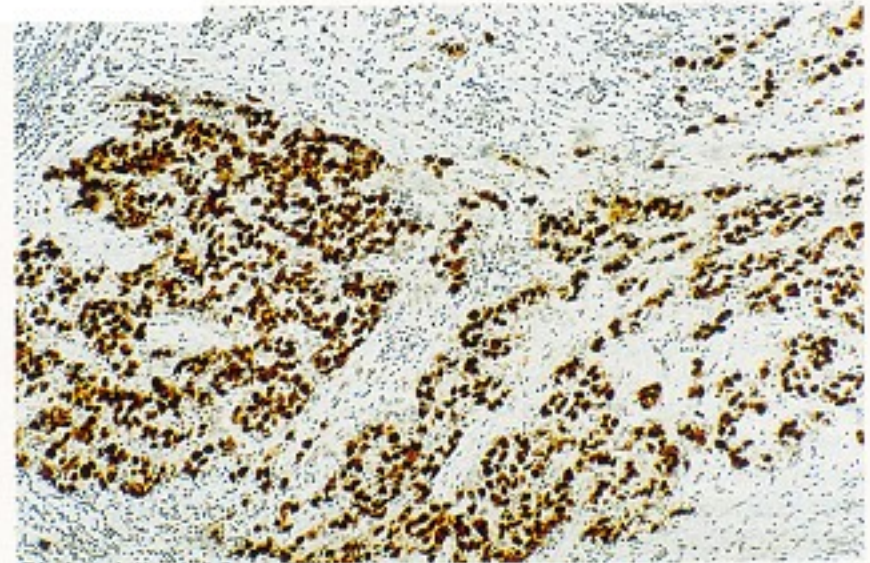
(prognosi , risposta al chemioterapico 5-fluoroacil)

ONCOPROTEINE: P53

Una sovraespressione della p53 in genere riflette la presenza di una mutazione; gene soppressore, riparatore del DNA, apoptosi e proliferazione.



Human colonic adenocarcinoma: immunohistochemical staining for p53 protein using NCL-p53-DO1. Note intense nuclear staining of tumour cells. Paraffin section.



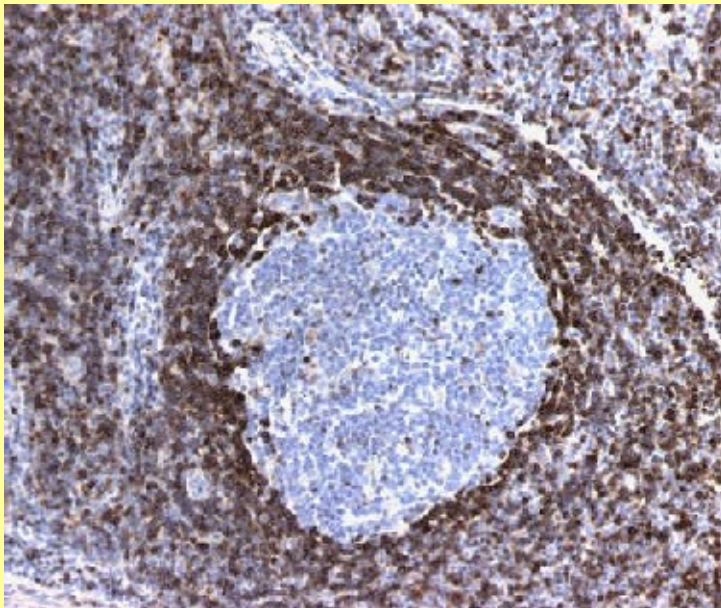
Human breast carcinoma: immunohistochemical staining for p53 protein using NCL-p53-DO7. Note intense nuclear staining of tumour cells. Paraffin section.

ONCOPROTEINE: Bcl-2

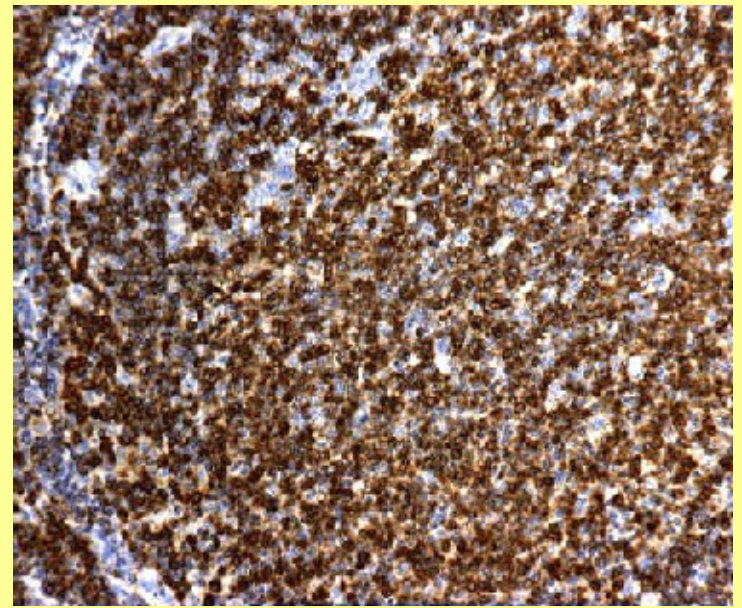
Antigene Citoplasmatico (membrane mitocondriali, citosol) MW 26kD

Funzione: prevenzione dell'apoptosi

Linfomi, Sarcomi, Tumori della mammella ecc.



Follicolo normale in un linfonodo reattivo:
Il mantello follicolare è invece composto da linfociti intensamente bcl-2 positivi



LINFOMA FOLLICOLARE: Intensa espressione di bcl-2 in un follicolo neoplastico.
Si confronti questa immagine con l'aspetto "a bersaglio" di un follicolo iperplastico (figura precedente).

AGENTI INFETTIVI:

CYTOMEGALOVIRUS

CRYPTOCOCCUS

EBV (LMP1, EBER)

HEPATITIS B VIRUS

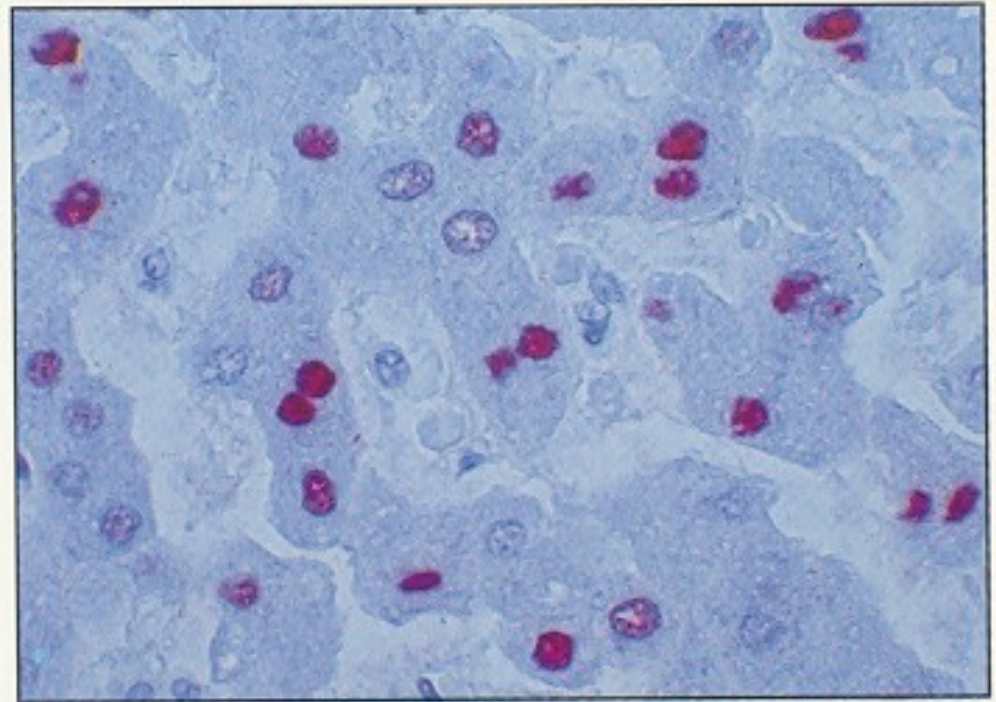
HERPES SIMPLEX VIRUS 1-2

HUMAN HERPES VIRUS

HUMAN PAPILLOMA VIRUS

HELICOBACTER

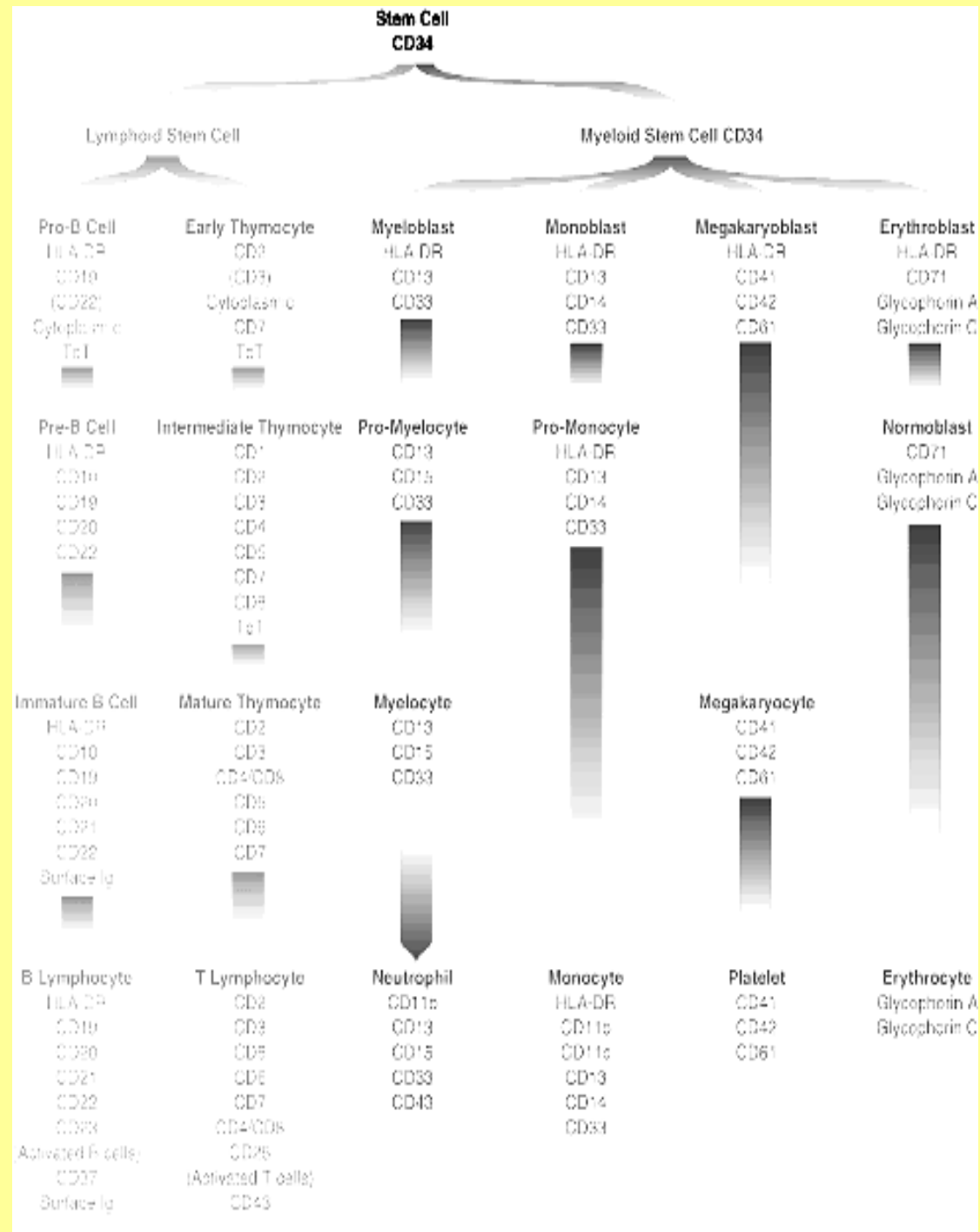
PNEUMOCISTIS CARINII



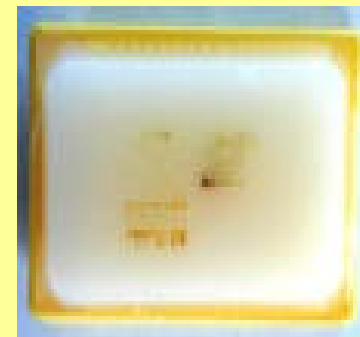
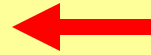
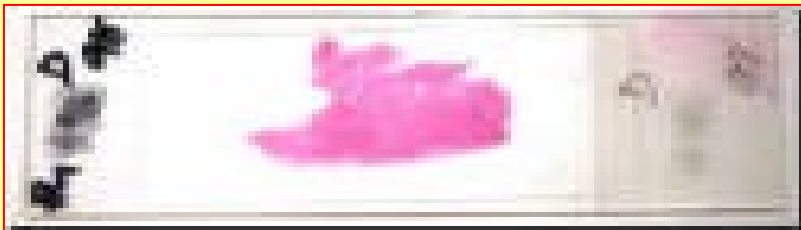
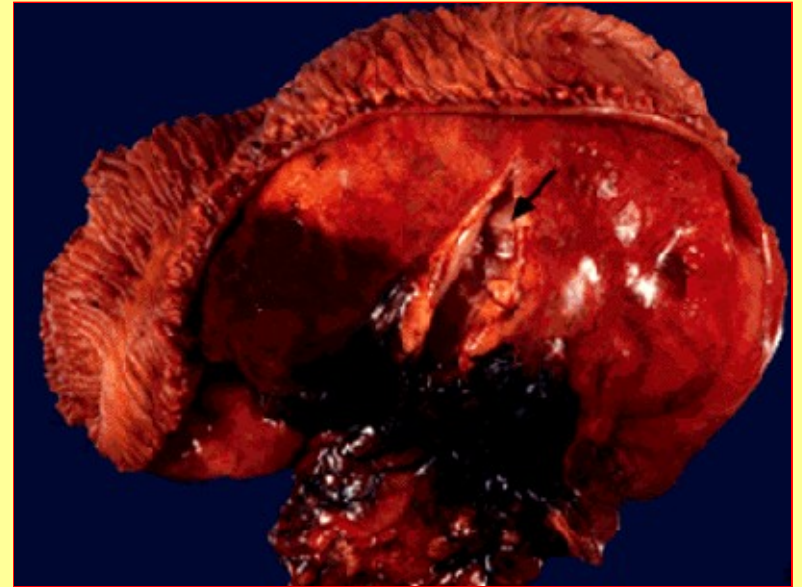
HBV-infected liver stained with anti-HBcAg polyclonal antibody using Fast Red chromogen.

Cluster Differentiation markers (CD)

Antigeni superficiali espressi durante l'ematopoiesi. Utilizzando questi gruppi di markers di differenziazione è possibile caratterizzare il tipo di cellula della linea ematopoietica.



*Giovan Battista
Morgagni*



~~*DOGMA: Un tessuto fissato ed
incluso era considerato come
un tessuto morto utile solo per
uno studio morfologico*~~

BIOLOGIA MOLECOLARE

(1953 al 1969) **BIOLOGIA MOLECOLARE**



(a) Rosalind Franklin

(b) James Watson e Francis Crick



Francis Crick in una lezione all'università con un modello della struttura tridimensionale del DNA

Gli scopritori della doppia elica. (a) Rosalind Franklin, che effettuò gli esperimenti di cristallografia ai raggi X che rivelarono la natura a elica della molecola del DNA. (b) James Watson (a sinistra) e Francis Crick, che utilizzarono i dati della Franklin per dedurre che l'elica del DNA era costituita da due catene polinucleotidiche interavvolte con le coppie di basi azotate unite da legami idrogeno presenti all'interno della molecola. La foto mostra Watson e Crick nel 1953 insieme al loro modello del DNA.

LA "LADY" DEL DNA UCCISA DAL SUO LAVORO



A Londra Rosalind Franklin produsse le più nitide immagini ai raggi x di DNA cristallizzato mai ottenute: fu lei la prima a "vedere" realmente la doppia elica.

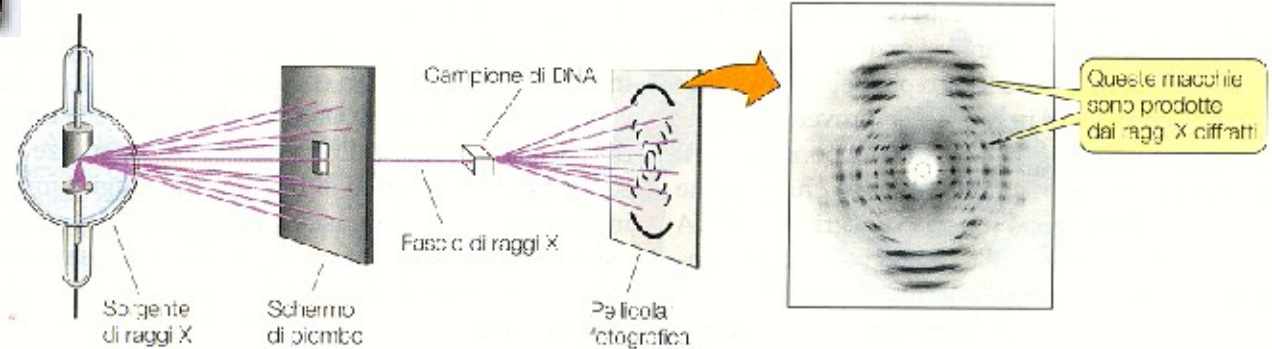


Figura 11.4

La cristallografia ai raggi X ha rivelato la fondamentale natura elicoidale della struttura del DNA. La posizione degli

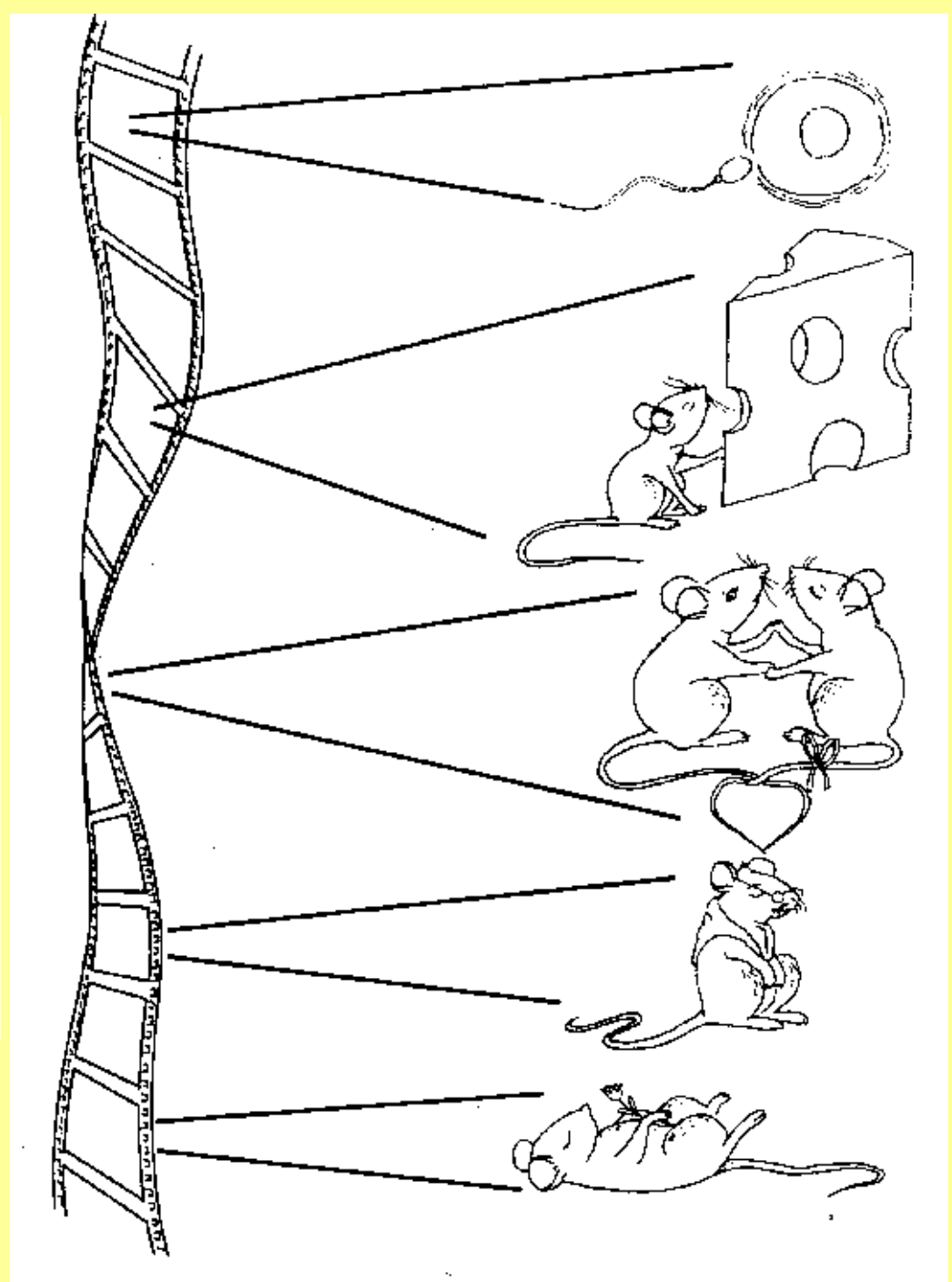
atomi nel DNA può essere dedotta dal quadro di diffrazione dei raggi X che lo hanno attraversato, sebbene tale determinazione richieda un enorme lavoro.

Watson nel suo libro "La doppia elica": «**Rosalind era sicuramente più intelligente di me e avrebbe potuto raggiungere la nostra stessa conclusione da sola. Lei però era una chimica, focalizzata su un certo aspetto del problema. Noi come biologi puntavamo a svilupparne un altro**».

Morì il 16 aprile del 1958 a 37 anni, di carcinoma ovarico in fase avanzata prima dell'assegnazione del premio Nobel a Watson e Crick (1962).

L'idea dell'esistenza di un programma genetico è stata dedotta dalla riproducibilità di determinati eventi che si possono osservare durante la fertilizzazione dell' ovulo, durante l'infanzia, la maturità sessuale, la senescenza e la morte.

Tutto può essere rappresentato come una pellicola cinematografica che l'organismo interpreta rispettando la sequenza e la velocità dei fotogrammi. (E.L.Menninger)



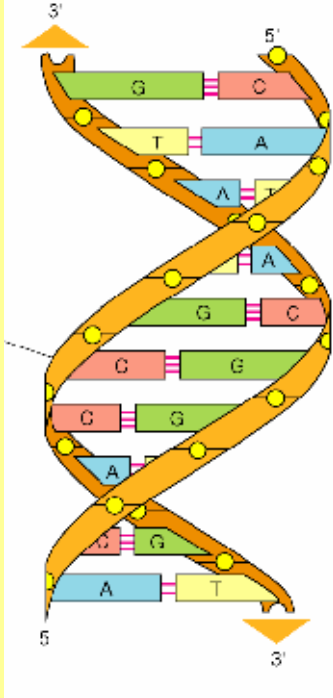
1990

Il **Progetto Genoma Umano** intendeva completare entro il 2005 l'inventario del genoma, cioè la lettura della sequenza completa di basi azotate (A, C, T e G) che compongono il nostro codice genetico. Grazie allo straordinario progresso delle tecnologie informatiche, il Progetto Genoma Umano è stato completato nel 2000.

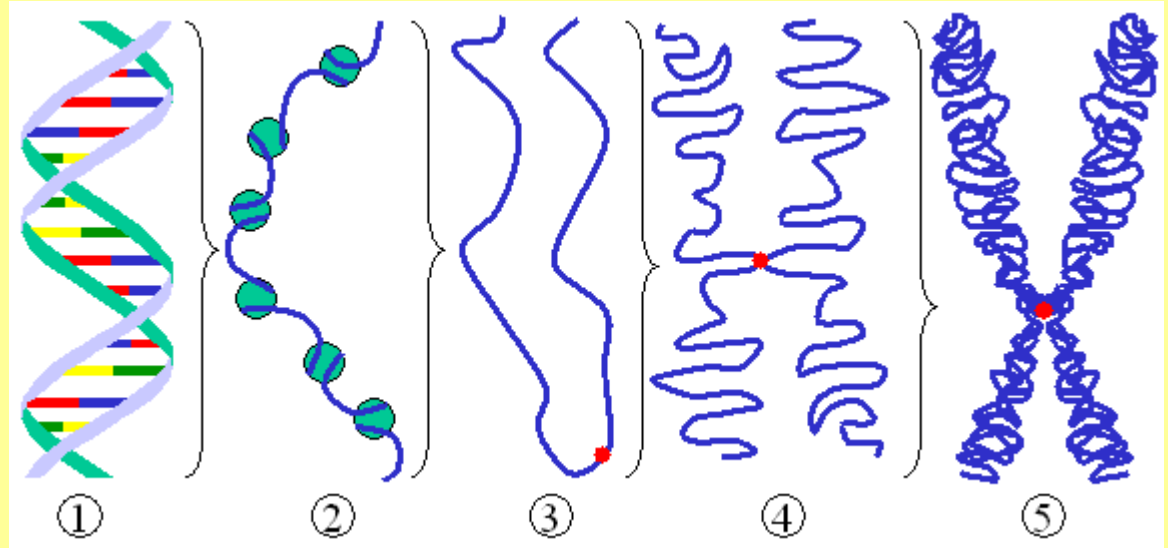


Sistemi di lettura del DNA

A, B, C, D

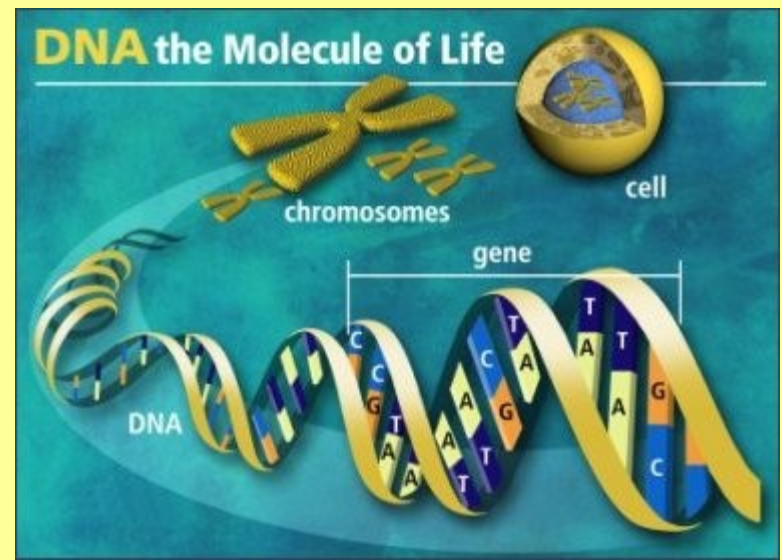
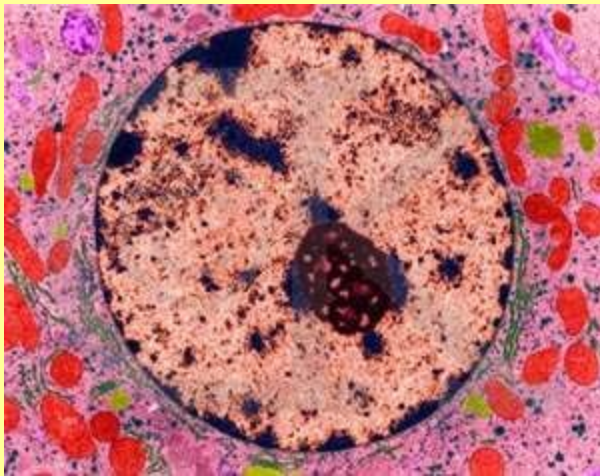


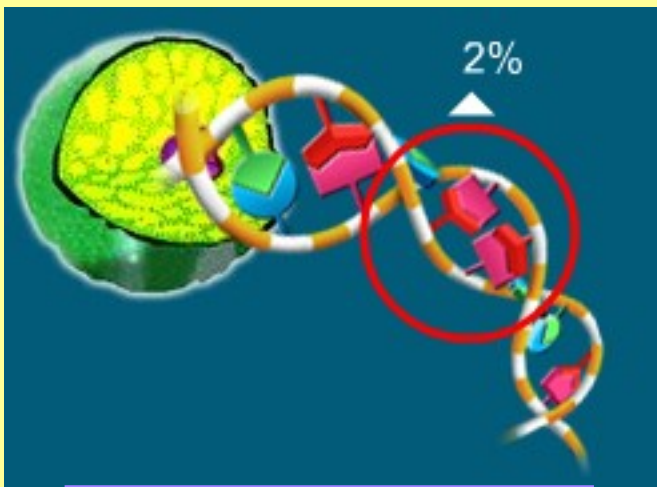
A, B, C, D



A, B, C, D

abcd





I geni rappresentano solo il 2% di tutto il DNA



Il DNA ha un diametro di 20 milionesimi di millimetro



3 miliardi di basi

Il gene: un ago nel pagliaio

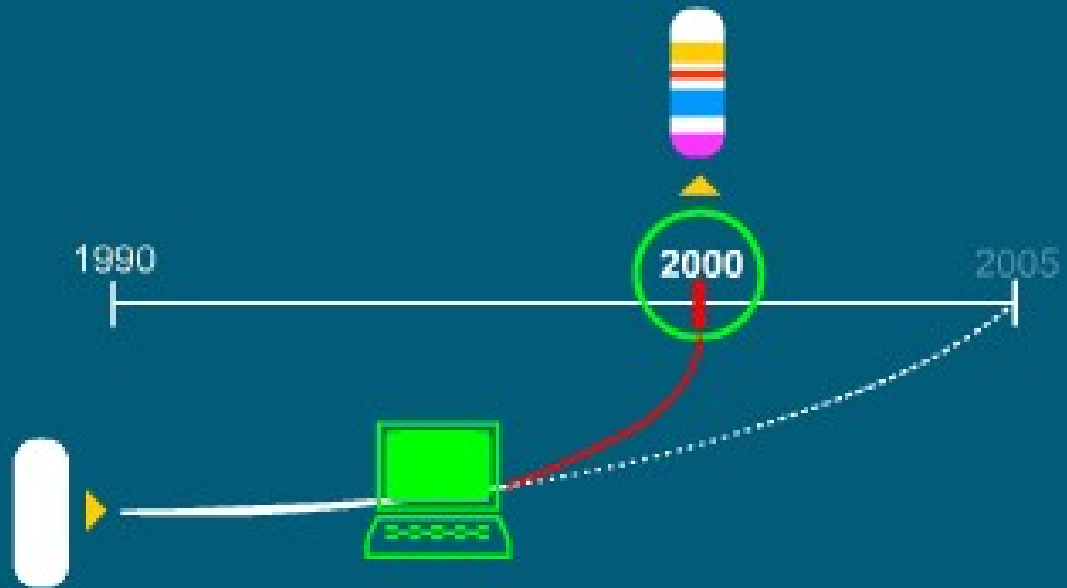
Sequenziare il genoma

Capire in quale ordine sono messi i 3 miliardi di basi azotate del nostro DNA.
Se per ogni base ci volesse 1 secondo, sarebbero necessari 95anni





- Oggi esistono macchine capaci di leggere il DNA in modo del tutto automatico.
- Basta inserire una provetta contenente del materiale genetico in un'apertura dell'apparecchio; dopo alcuni minuti la macchina ci restituirà l'esatta sequenza di basi del nostro campione.
- Solo pochi anni fa per ottenere lo stesso risultato ci volevano giorni e giorni di lavoro. L'unico limite è che le macchine riescono a leggere solo frammenti lunghi 500-700 basi: per questo bisogna tagliare i cromosomi in migliaia di pezzetti.



- La mappa del genoma umano esiste già. È il frutto della collaborazione di centinaia di scienziati, arruolati nel Progetto Genoma Umano (PGU).
- Fondato nel 1990, il PGU era nato per sequenziare le 23 coppie di cromosomi dell'uomo in 15 anni di lavoro.
- Il rapido progresso delle tecnologie impiegate ha fatto raggiungere l'obiettivo nel 2000, ben prima del previsto.

Con la sequenza completa del nostro genoma possiamo orientarci all'interno del nostro DNA, ma capire dove sono i geni che corrispondono alle nostre proteine è un'altra cosa.

Possediamo una cartina geografica ma non sappiamo dove sono collocate molte città



Ci sono numerosi ricercatori in tutto il mondo che cercano di scoprire i geni all'interno del nostro genoma



Per conoscere un gene non basta sapere dov'è e come è fatto: bisogna anche scoprire a cosa serve, con quali altri geni interagisce e cosa succede se non funziona.

Sapere tutte queste cose significa avere a disposizione più bersagli da colpire se si vuole fermare una malattia.

Questo settore della ricerca si chiama genomica funzionale





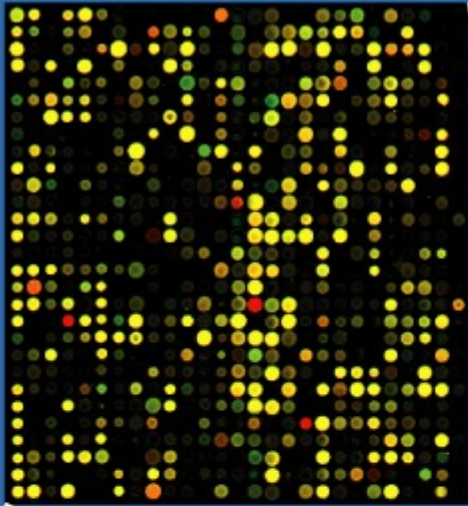
GENE-CHIP: supporto di silicio, dimensioni: 1.28 cm² suddiviso in piccole aree. Può contenere decine di migliaia di sonde; basta depositare sul biochip le cellule che vogliamo studiare per conoscere i geni attivi in quel momento



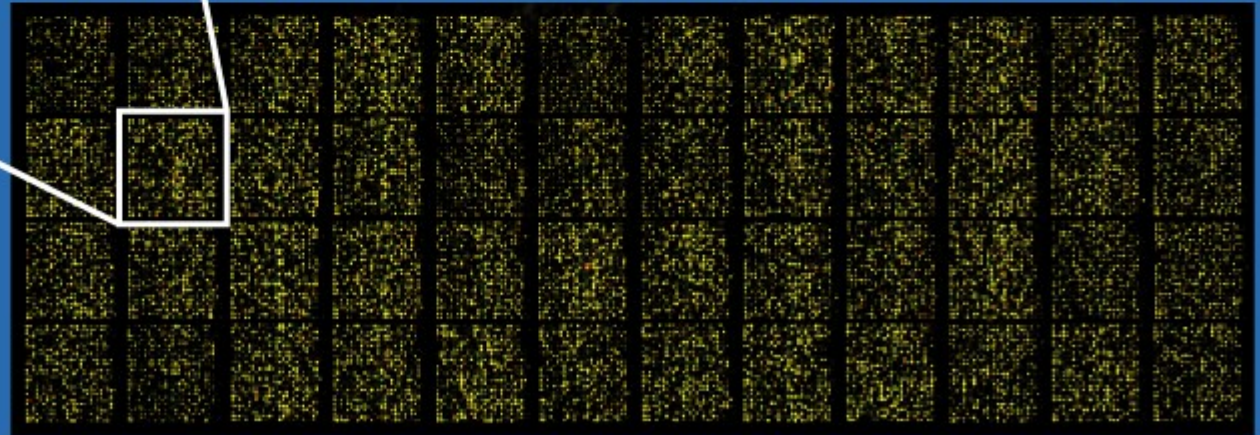
MA COME SI FA A NON PERDERSI IN MEZZO A TUTTI QUESTI DATI?

- È una delle armi più formidabili della genomica funzionale. Si tratta di una minuscola piastrina dalle grandi capacità: basta depositare sul biochip le cellule che vogliamo studiare, per ottenere l'elenco dei geni attivi in quel momento.
- Il biochip ha fatto fare alla ricerca un salto di qualità: fino a pochi anni fa si poteva studiare un solo gene alla volta. Oggi, grazie al biochip, possiamo analizzare decine di migliaia di geni contemporaneamente e cercare di capire il loro comportamento globale.

Terapia personalizzata



Example of an approximately 40,000 probe spotted oligo microarray with enlarged inset to show detail.

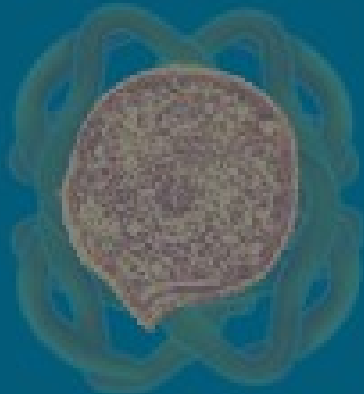


BIOINFORMATICA

L'informatica è diventata uno strumento determinante per la ricerca scientifica. Per analizzare il risultato di migliaia di dati raccolti con i biochip e per catalogare e confrontare tutti i dati del Progetto Genoma la bioinformatica è stata fondamentale.

Diversi siti internet permettono ai ricercatori di comunicare e condividere le loro scoperte. Esistono diverse banche dati con tutte le sequenze dei geni già ottenute di diverse specie (DNA e proteine).



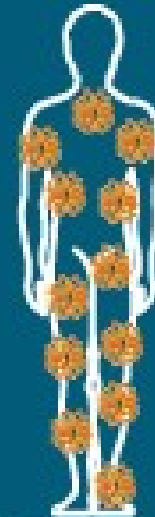


PROTEOMICA

- Conoscere i geni vuol dire conoscere le proteine?
- In realtà le cose sono molto più complicate. In ogni istante la cellula decide quali proteine produrre e in che quantità, a seconda delle condizioni in cui si trova.
- Le proteine, poi, interagiscono tra loro e con il DNA, complicando ulteriormente il quadro.
- Ma lo studio delle proteine (cioè la proteomica), è una delle discipline sulle quali si punta di più nella lotta e nella prevenzione del cancro.
- Una cellula sana e una malata, infatti, producono proteine diverse. E studiando l'insieme delle proteine delle cellule malate si possono identificare i bersagli di nuovi farmaci.

FARMACOGENOMICA

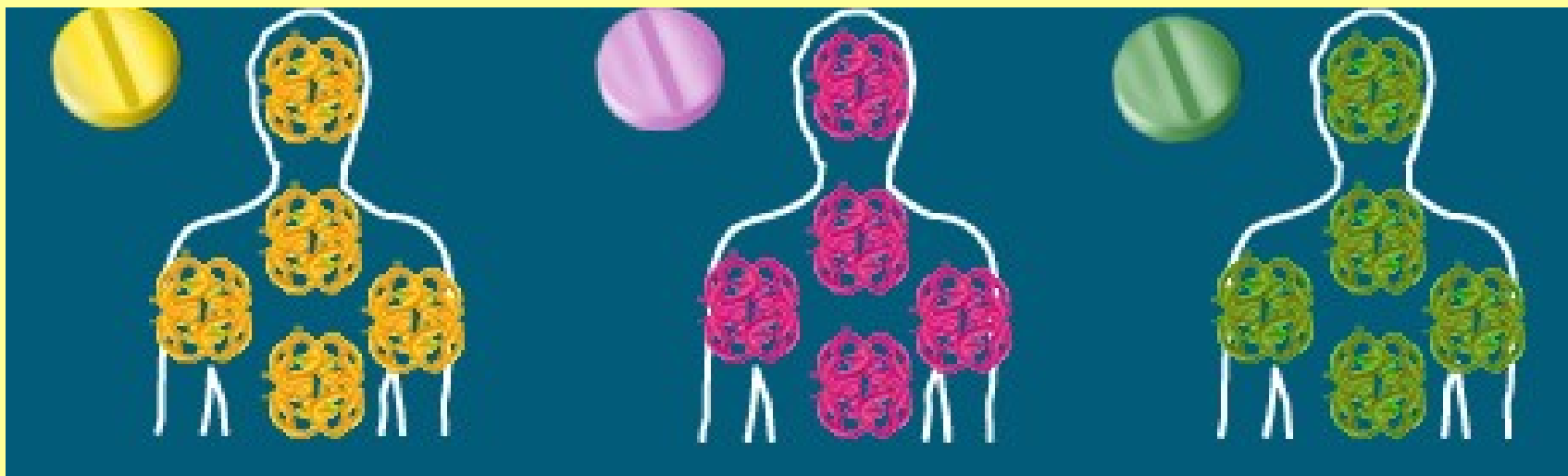
F + G + P

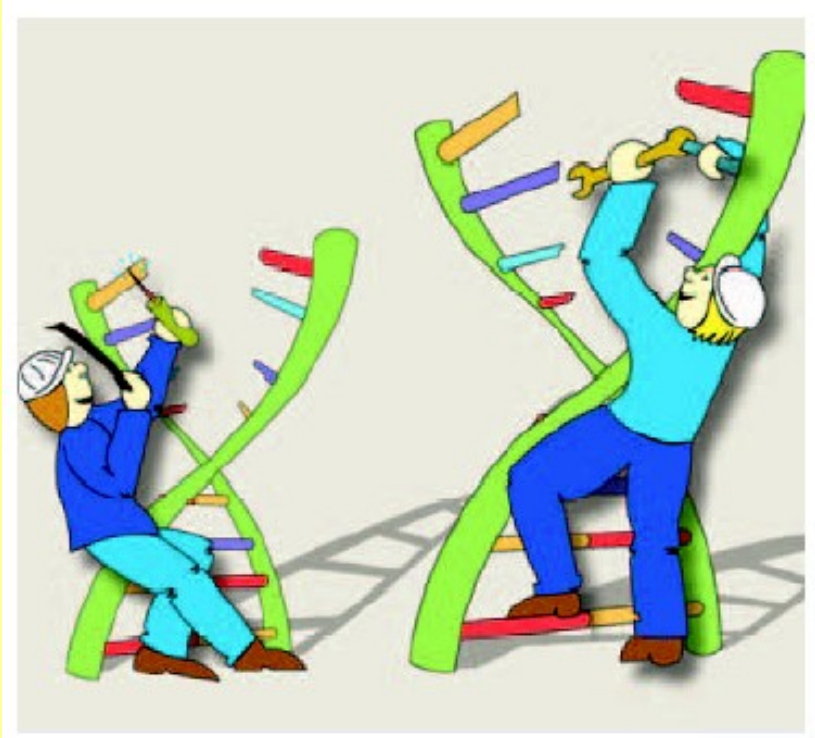


- Dalla fusione di farmacologia, genomica e proteomica nasce la scienza che inventerà le medicine del futuro: stiamo parlando della farmacogenomica.
- Moltissime malattie insorgono quando uno o più geni sono alterati e producono proteine che non funzionano come dovrebbero.
- I farmaci del futuro agiranno a questo livello: andranno a colpire direttamente il gene o la proteina incriminata, eliminando la causa della malattia e non solo i suoi sintomi. Saranno farmaci più efficaci, avranno meno effetti indesiderati e saranno sempre più personalizzati.

Lo stesso farmaco può essere molto efficace su un malato e non funzionare su un altro

La farmacogenomica ci permetterà di progettare una cura personalizzata per ogni paziente





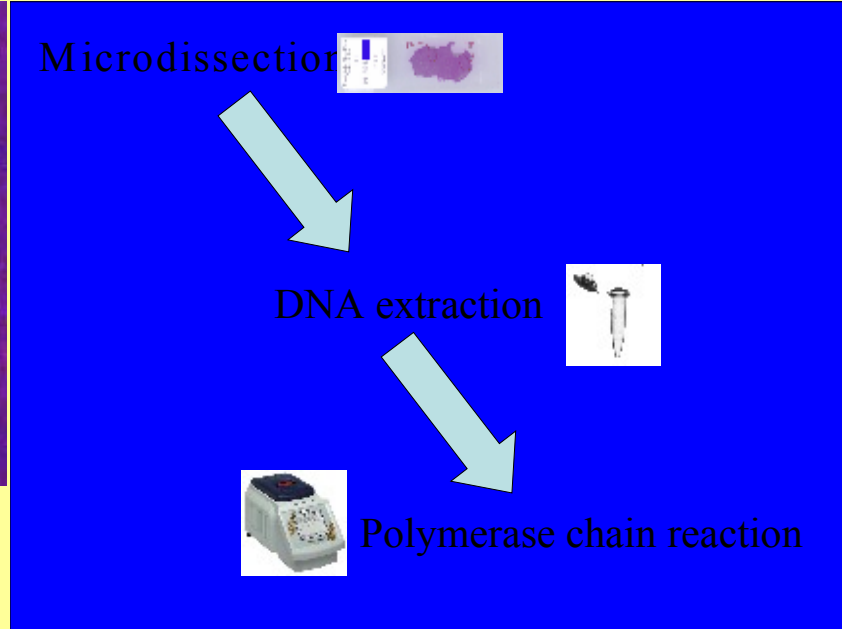
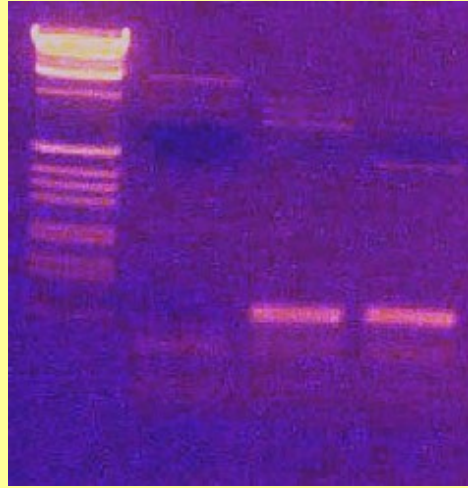
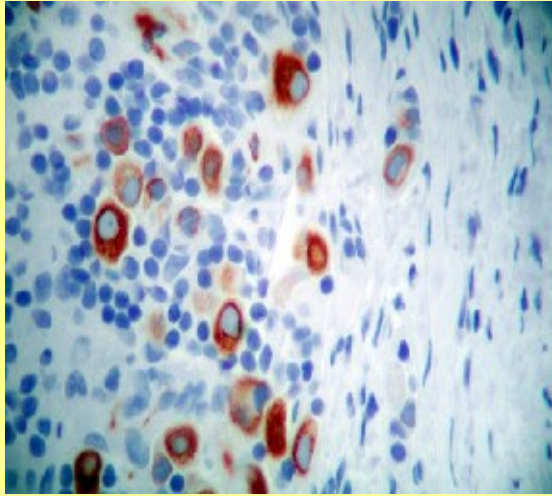
cellula normale

cellula tumorale



mutazioni

~~DOGMA:~~ → ***IMMUNOISTOCHEMICA***
→ ***BIOLOGIA MOLECOLARE***

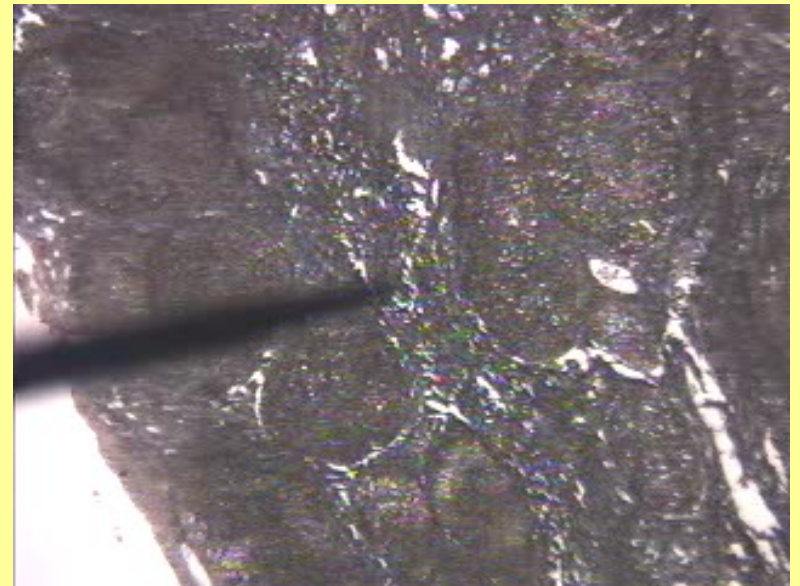
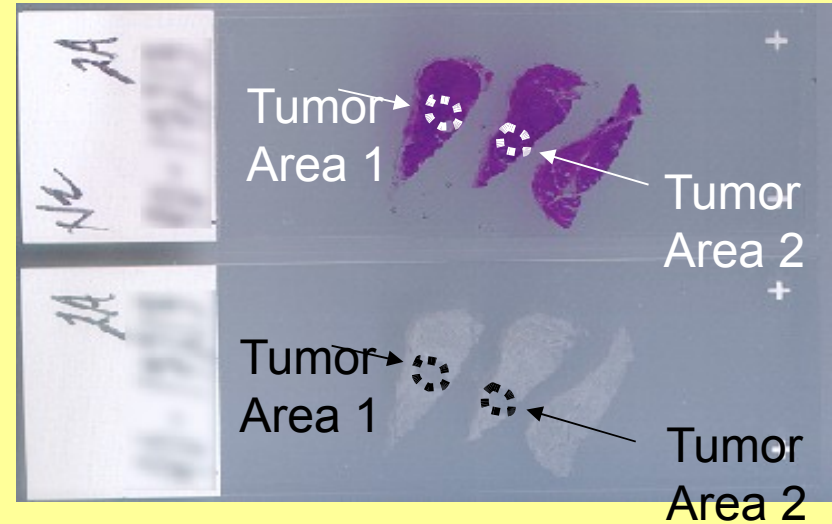
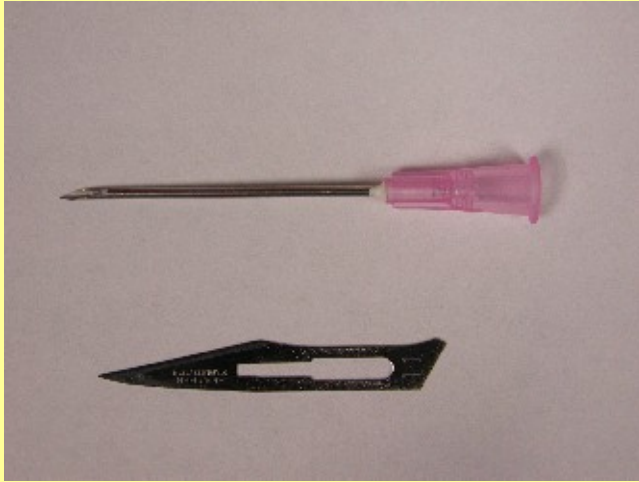


PROTEINE-DNA-RNA

MORFOLOGIA → ***BIOLOGIA***

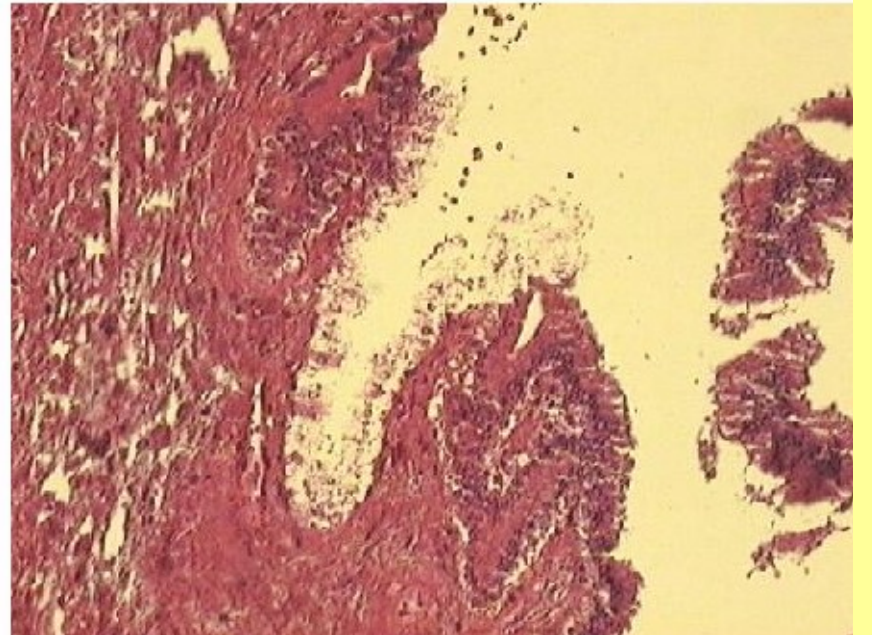
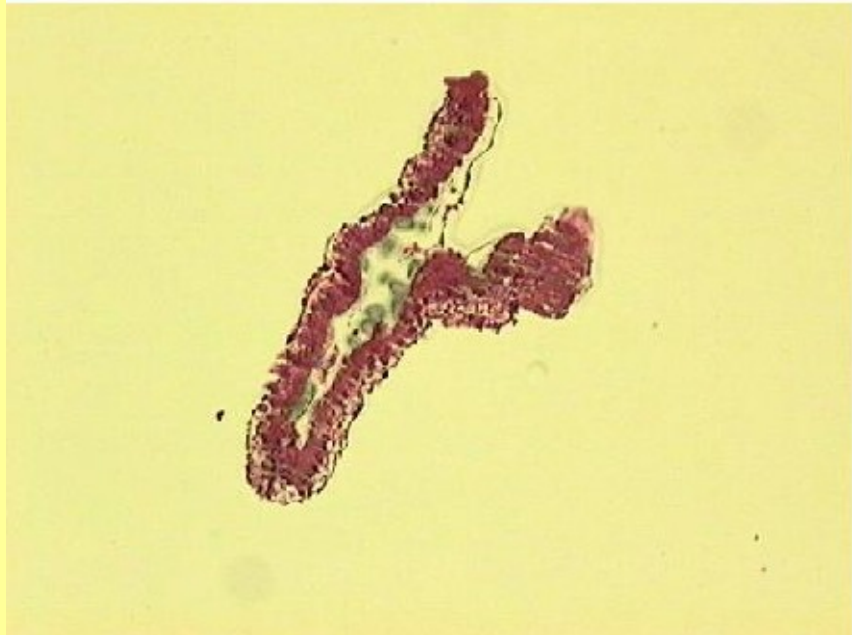
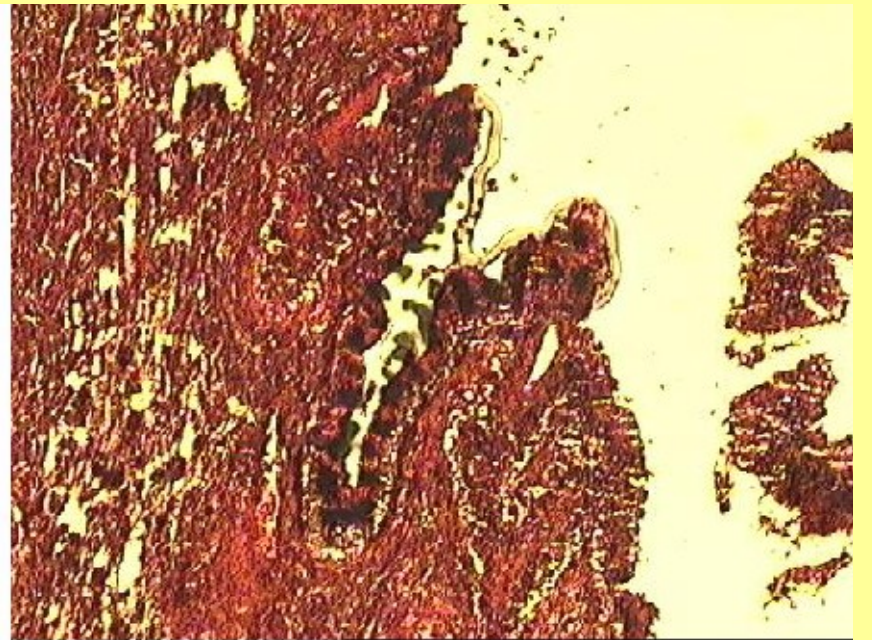
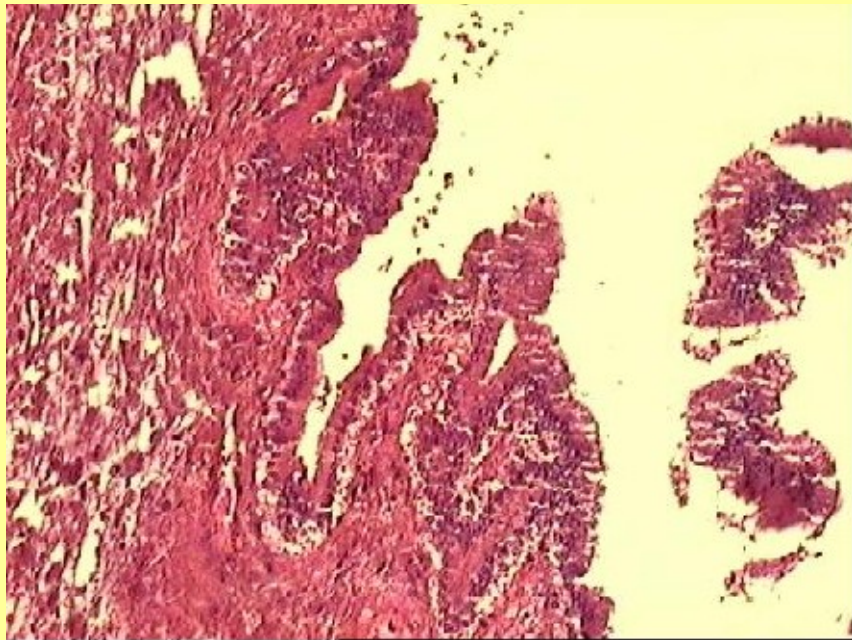
Microdissezione

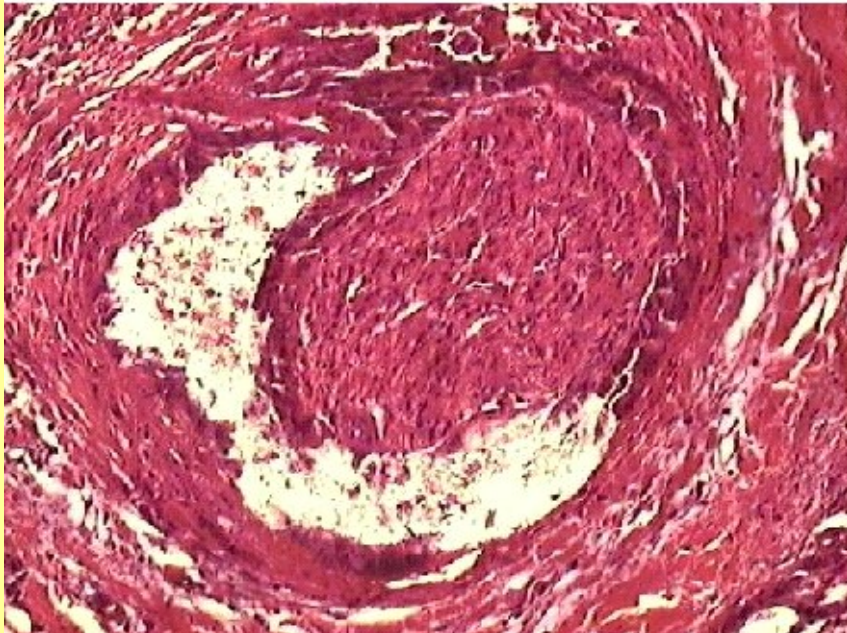
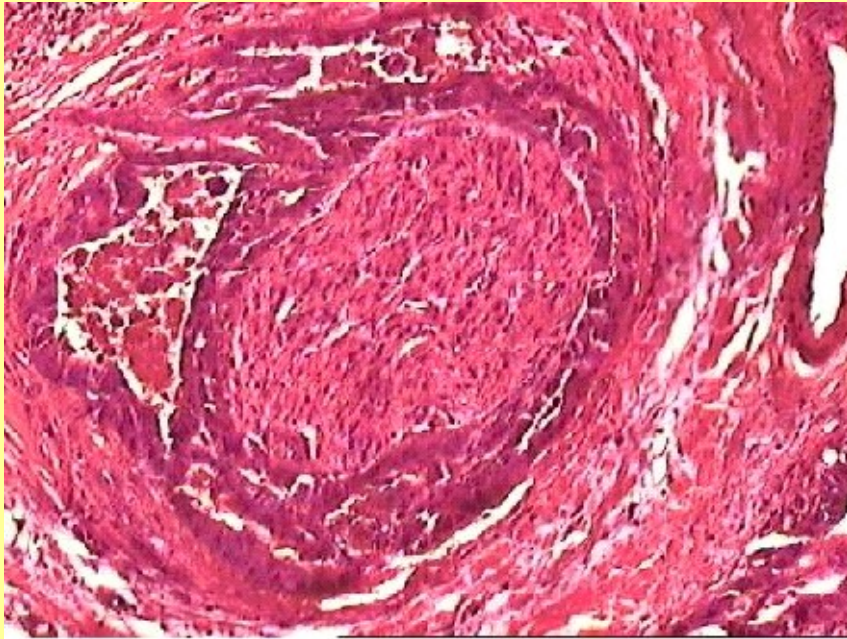
- Manuale



Microdissezione Laser







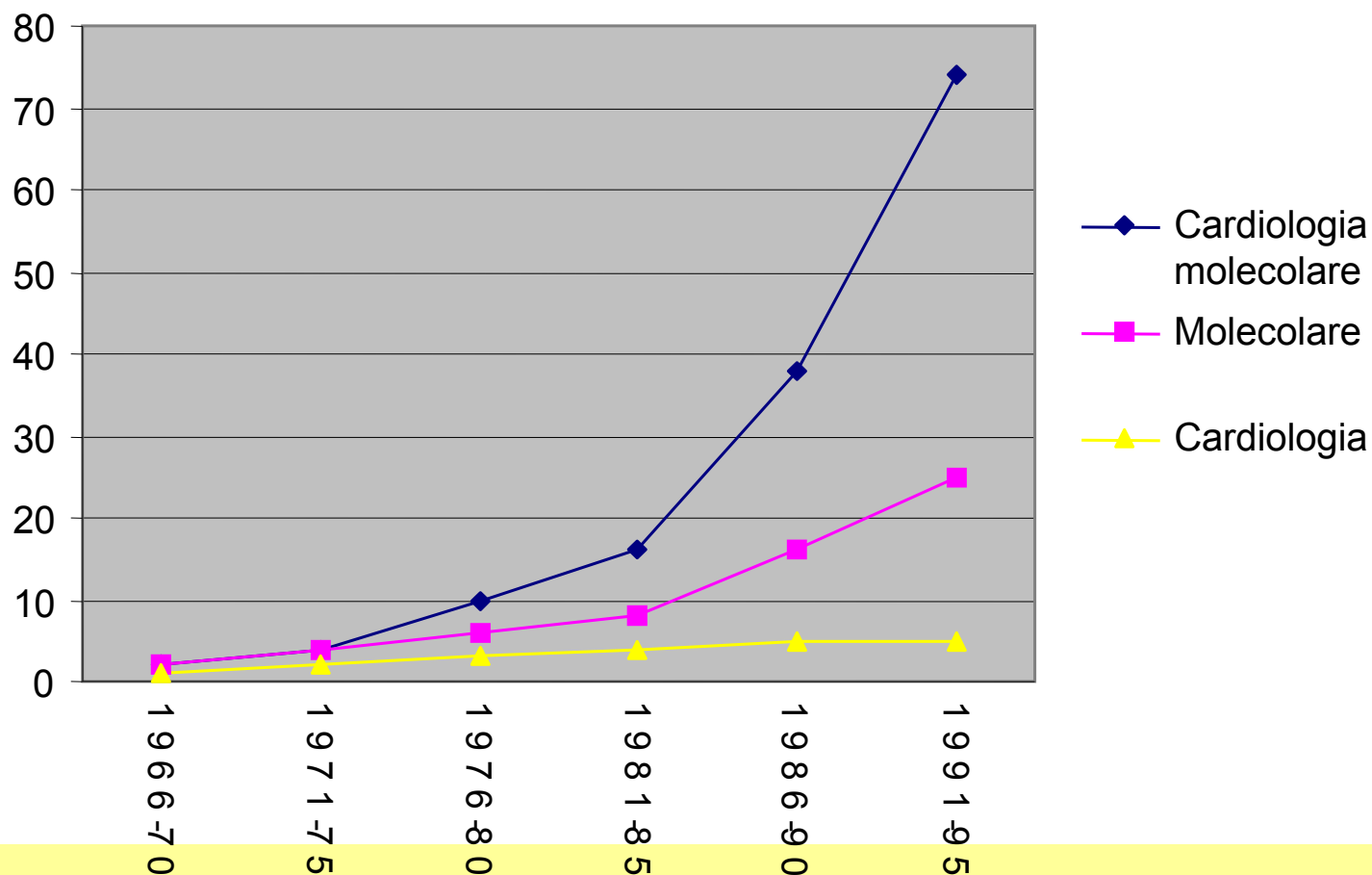
Patologia Molecolare

Più del 5% degli individui nati vivi e di età < di 25 anni è affetto da una patologia con significativa componente genetica.

Più del 30% delle malattie presenti nei bambini ospedalizzati ha radici genetiche. Almeno un adulto su 10 ha una condizione clinica influenzata dal suo patrimonio genetico.

MALATTIE MONOGENETICHE: Più di 3000 malattie monogeniche sono state già identificate, sebbene la maggior parte di queste malattie individualmente sia rara, l'incidenza collettiva è all'incirca pari ad 1 su 100 nati vivi.

MALATTIE MULTIGENICHE E MULTIFATTORIALI (Psoriasi)



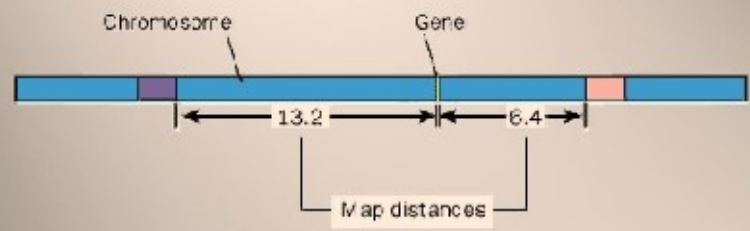
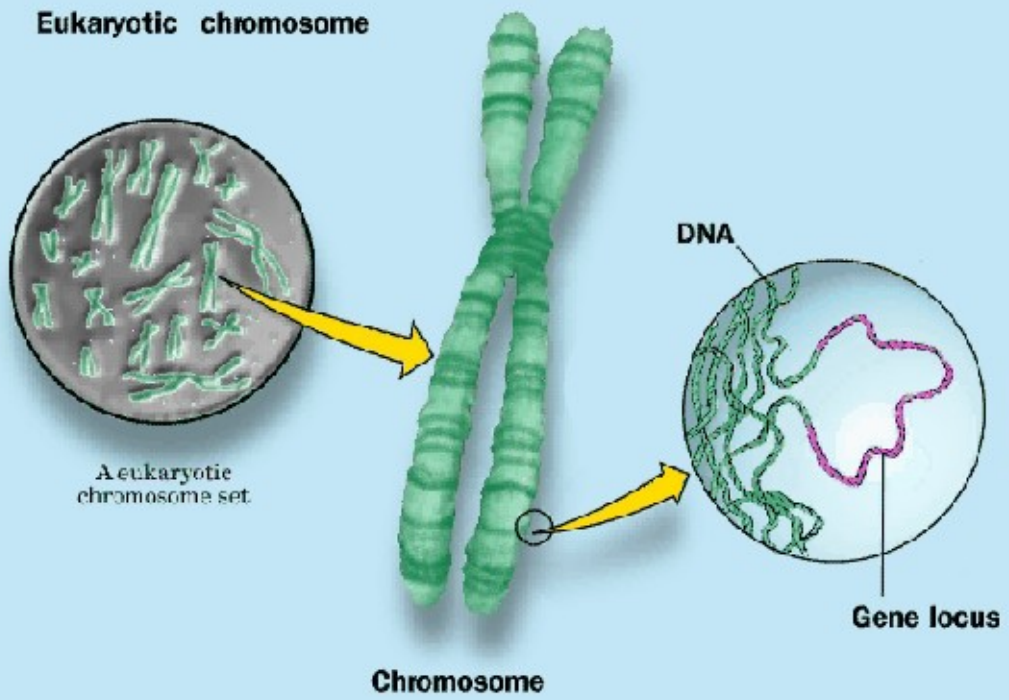
Numero relativo di lavori pubblicati tra il 1966 ed il 1995. Il numero dei lavori è stato normalizzato con quelli del primo periodo esaminato (1966), a cui è stato dato il valore 1.

IMPORTANZA DELLA PATOLOGIA MOLECOLARE.

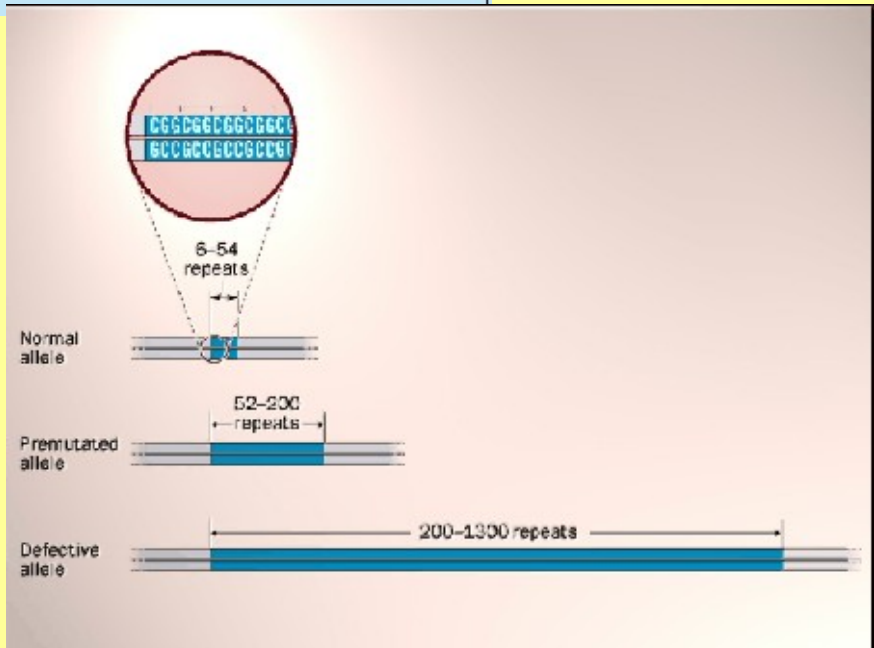
- Migliore comprensione e classificazione delle malattie.
- Maggiore sicurezza nella diagnosi di malattie genetiche.
- Possibilità di diagnosi precoce.
- Identificazione di agenti infettivi. Test diagnostici più sensibili per le malattie virali.
- Biologia dei virus patogeni, nuove terapie antivirali.
- Produzione di prodotti biologici (Fattore VIII, Interferone, Insulina, nuovi farmaci)
- Diagnosi molecolare del cancro
- Strategie per la terapia del gene.
- Nuove patologie (malattie ad espansione, mitocondriali, conformazionali, ecc.)

DALLA GENETICA ALLE BIOTECNOLOGIE

Eukaryotic chromosome



Mapping top story



1970

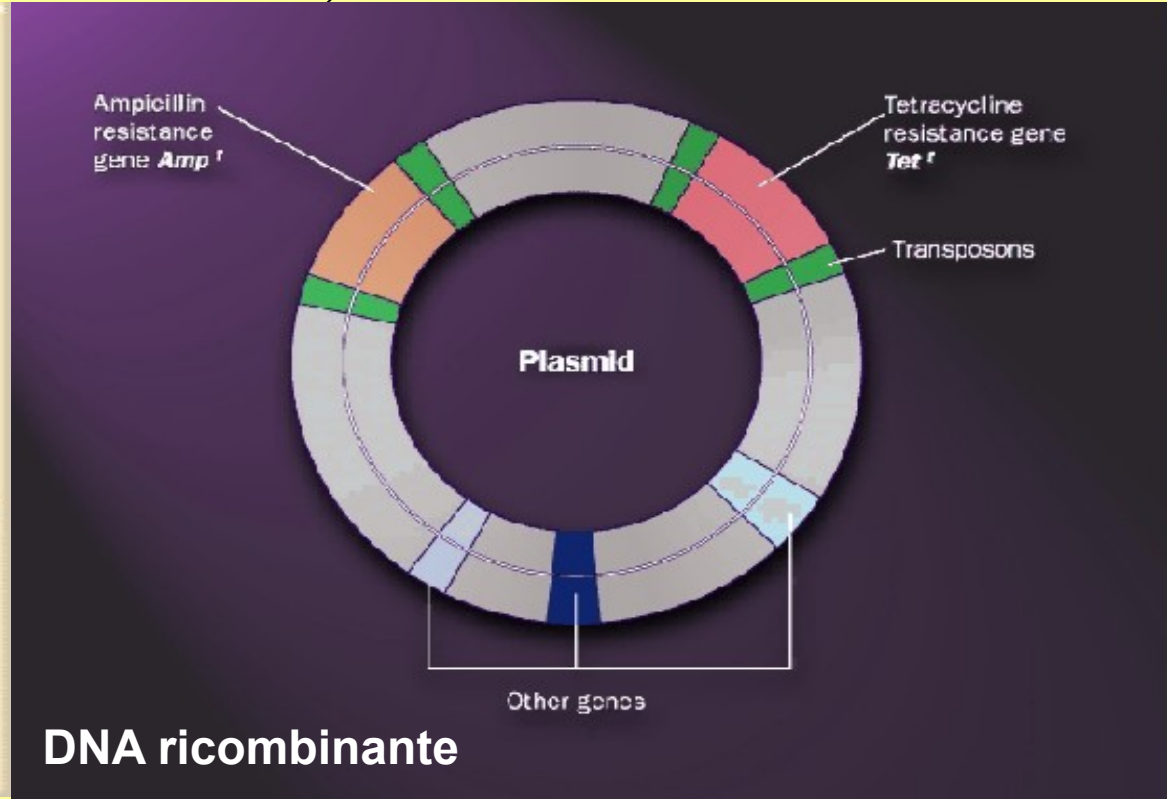
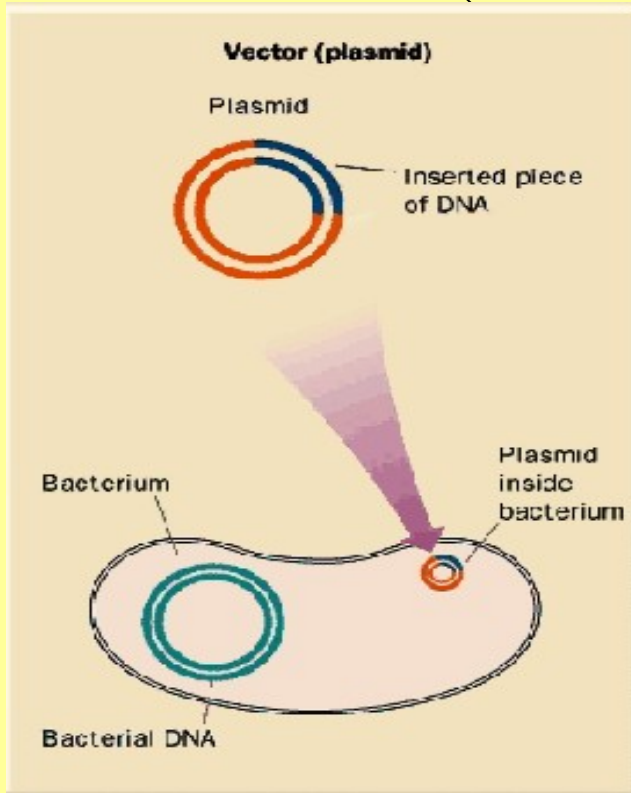
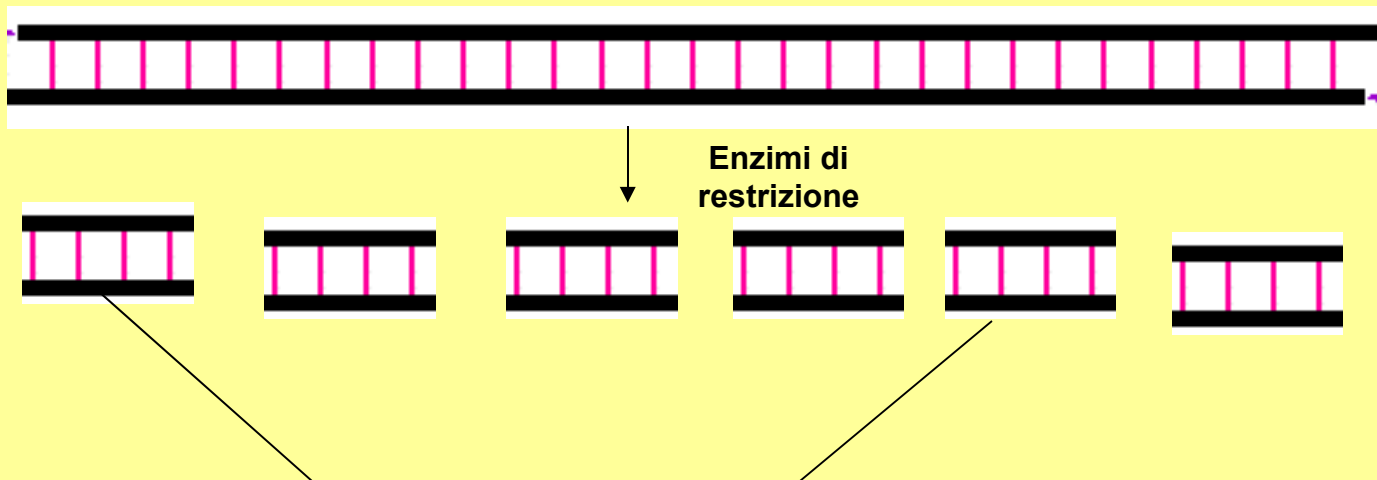
Werner Arber (CH) e Hamilton O. Smith (USA) scoprono gli enzimi di restrizione (forbici del DNA). Questi enzimi riconoscono una determinata sequenza di lettere sul DNA e lo sezionano in quel punto.



1972

Paul Berg (USA) riesce a riunire i pezzi di DNA di vari organismi e a produrre così in laboratorio il primo cosiddetto DNA ricombinante.





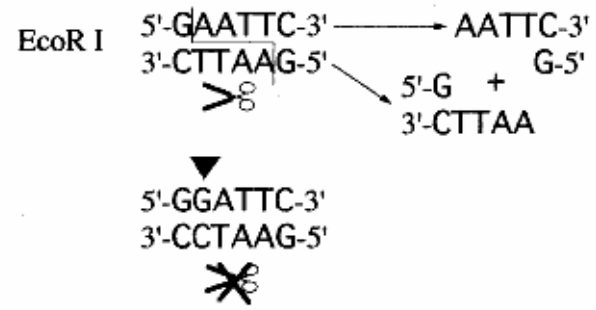
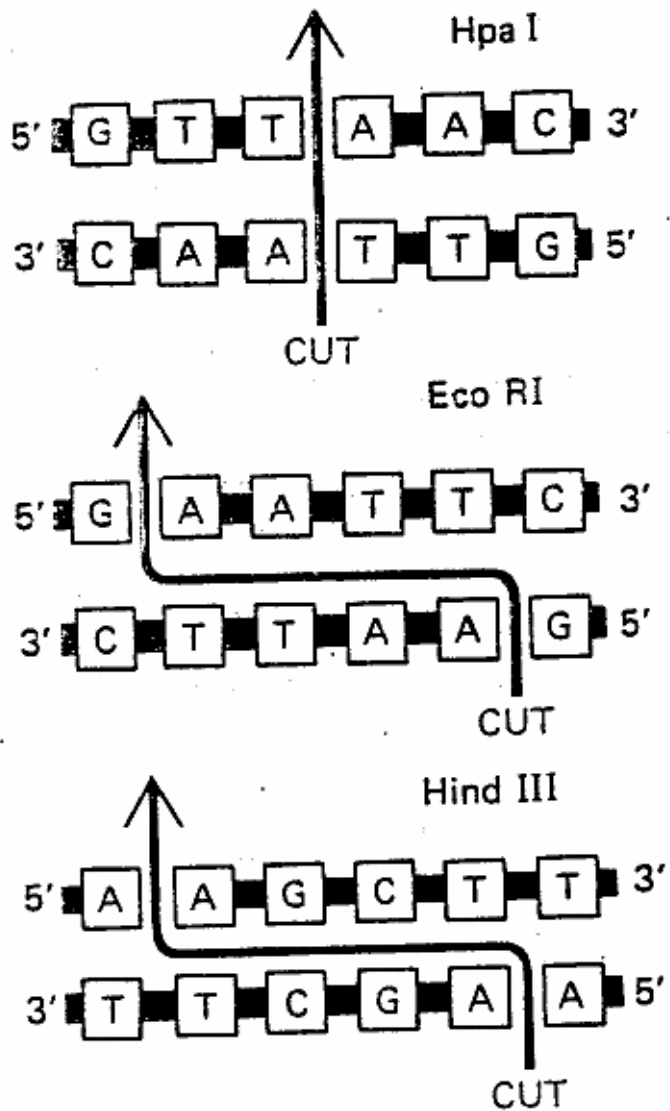
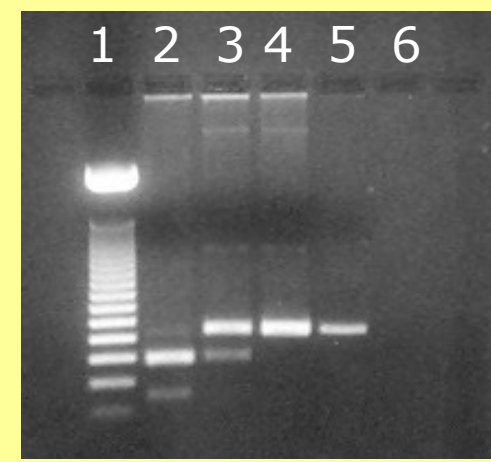
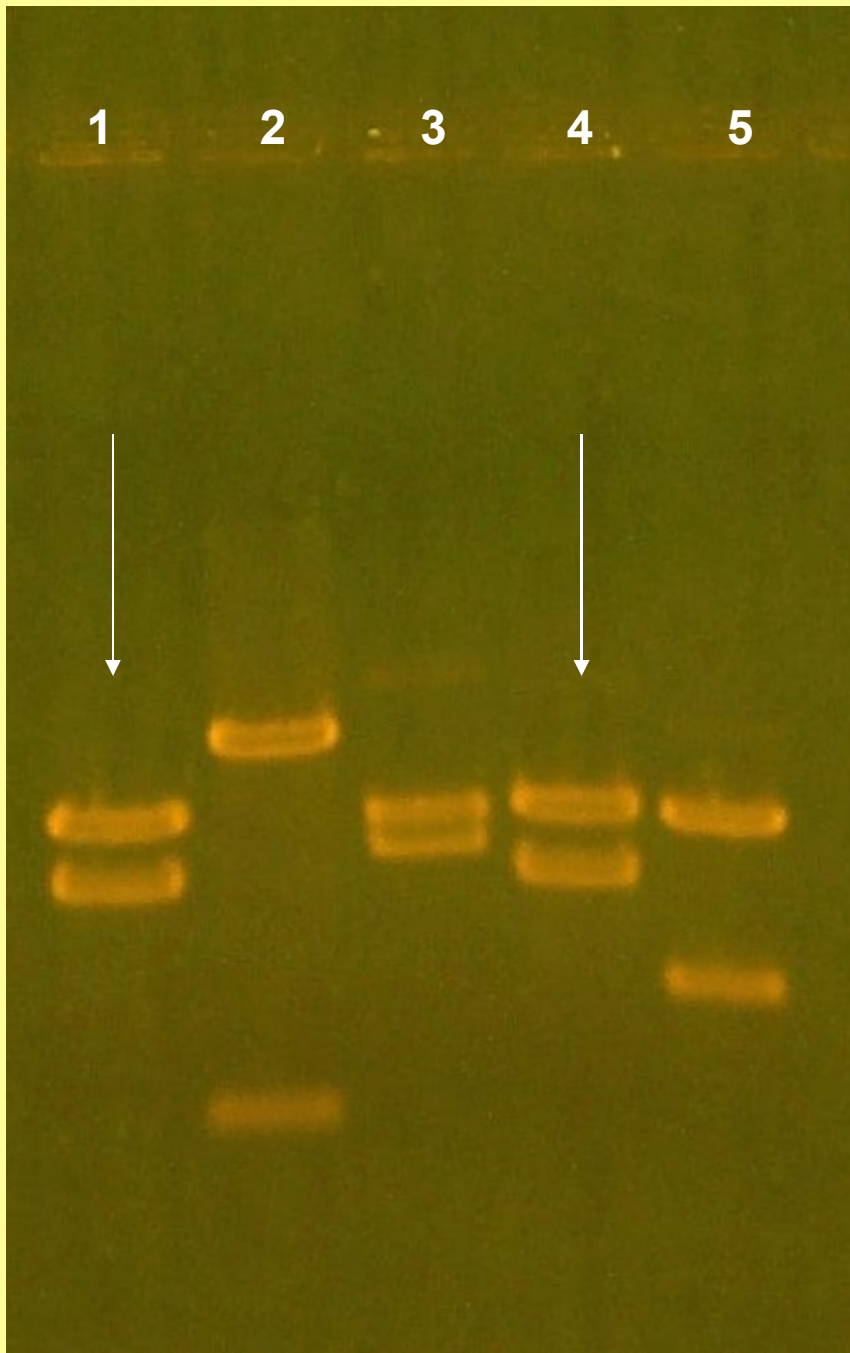


Figure 33 Schematic representation of the *EcoRI* restriction site. Loss of the restriction site occurs by an A → G point mutation (*arrowhead*).

RFLP



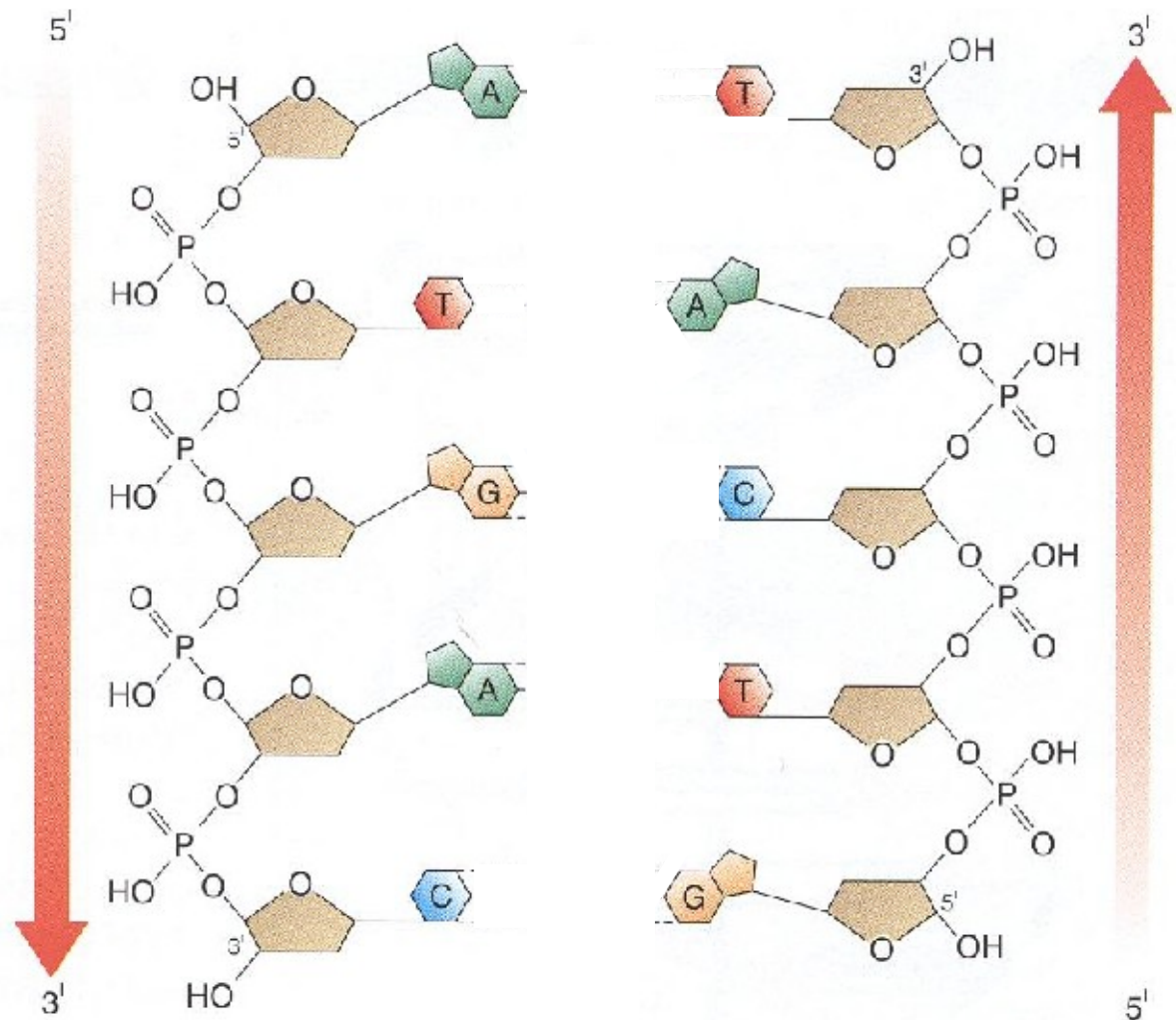


DNA Fingerprinting

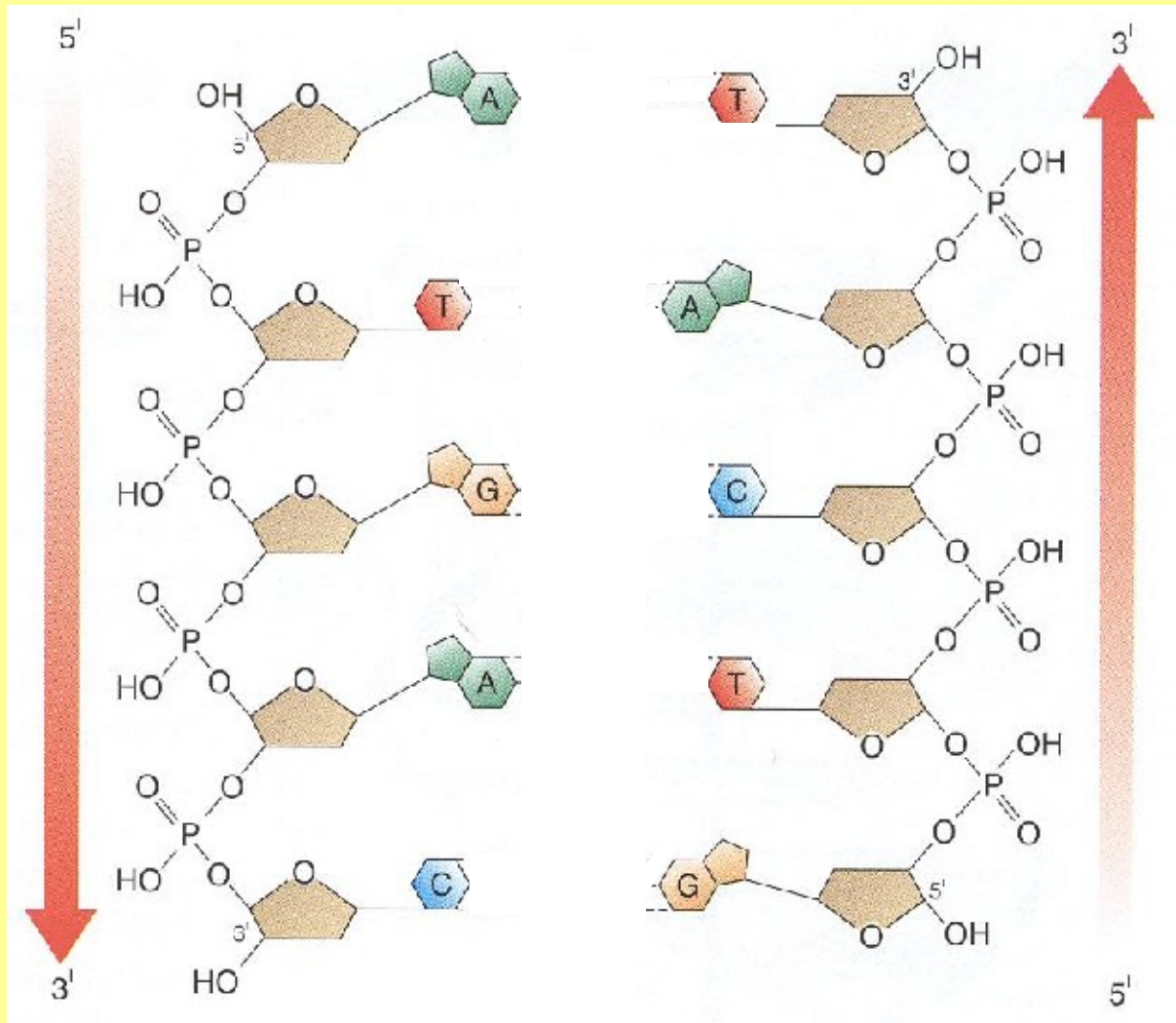
Corsa elettroforetica del DNA tagliato dagli enzimi di restrizione. Si può notare che il DNA del colpevole (quarta colonna) è uguale al DNA prelevato sulla scena del crimine (prima colonna).

CARATTERISTICHE FISICO-CHIMICHE DEL DNA.

Denaturazione del DNA: I legami idrogeno che tengono insieme i filamenti di una molecola di DNA possono essere rotti in condizioni particolari di temperatura, pH o forza ionica.



Rinaturazione del DNA: a 37° il DNA si rinatura.



- 1** DNA cellulare ad alto peso molecolare



digestione con enzima di restrizione ↓

- 2** la lunghezza dei frammenti di restrizione è determinata dalla posizione delle sequenze di riconoscimento per l'enzima di restrizione



- 3** elettroforesi su gel dei frammenti

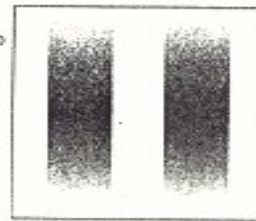


dopo colorazione, i frammenti di DNA sono visibili ai raggi UV

- 4** trasferimento su filtro di nitrocellulosa mediante la tecnica di Southern

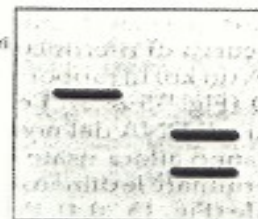


- 5** i frammenti di DNA si trasferiscono esattamente come sono ordinati nel gel di agarosio



ibridazione con sonda radioattiva ↓

- 6** i frammenti di DNA complementari alla sonda sono visibili dopo autoradiografia



CARATTERISTICHE FISICO-CHIMICHE DEL DNA.

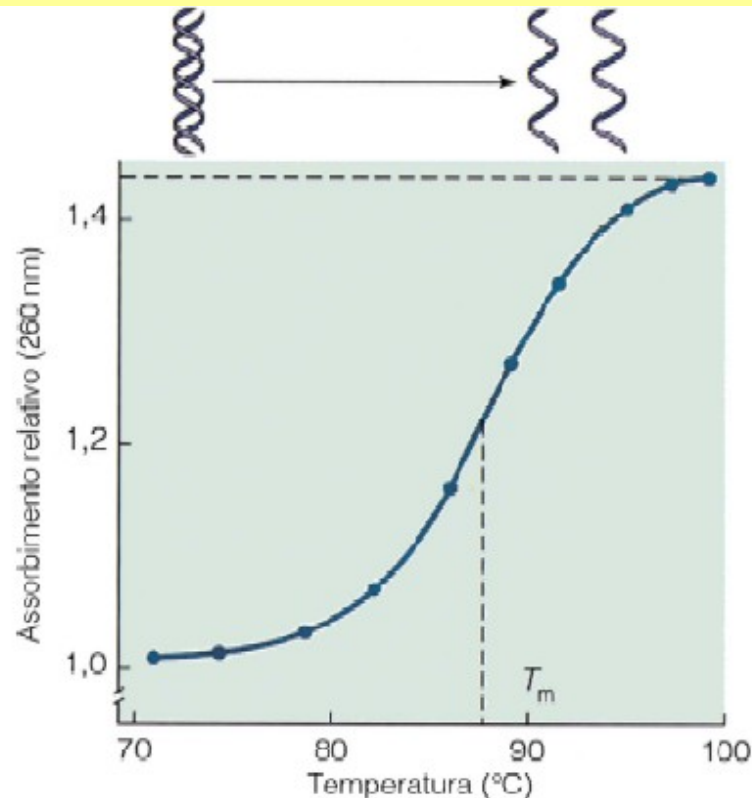
Assorbimento UV: il DNA (le basi azotate) assorbe a 260 nm.

Per determinare la presenza del DNA si usa lo spettrofotometro. Il DNA denaturato assorbe il 40% in più rispetto ad una doppia elica (Effetto Ipercromico)

Perché le basi assorbono di più?

Perché con la denaturazione le basi sono messe in maggiore evidenza e quindi assorbono UV

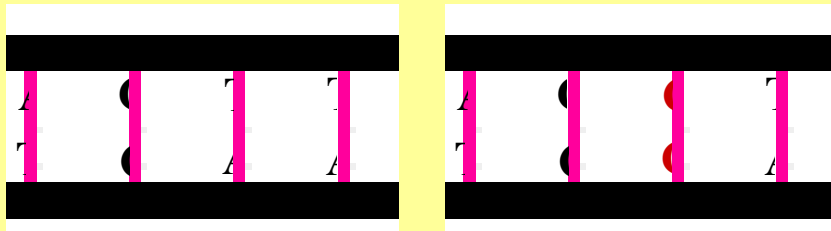
E' possibile monitorare la denaturazione dovuta all'aumento di temperatura monitorando l'incremento di assorbanza, che parte da un valore minimo e aumenta fino ad un valore massimo al quale tutto il DNA é denaturato



Denaturazione del DNA

CARATTERISTICHE FISICO-CHIMICHE DEL DNA.

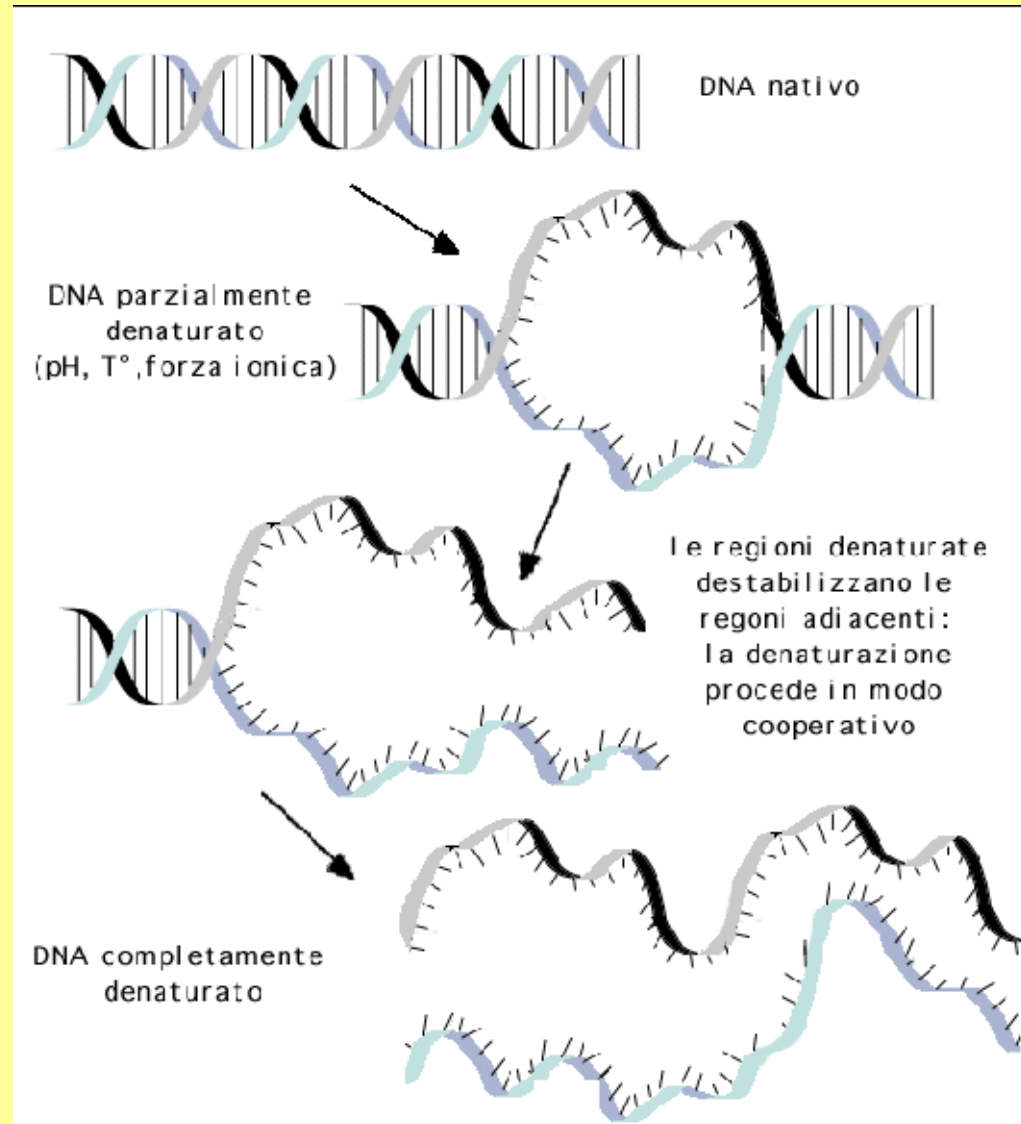
Le regioni ricche in AT (e quindi povere in legami idrogeno rispetto alle regioni ricche in GC) si denaturano per prime. La parziale denaturazione ha effetto destabilizzante sulla rimanente parte di doppia elica, che tende a denaturarsi completamente.



Più veloce

Meno veloce

La temperatura alla quale il 50% del DNA è denaturato viene detta T_m (melting temperature). Il DNA ricco in GC ha una T_m più alta del DNA ricco in AT



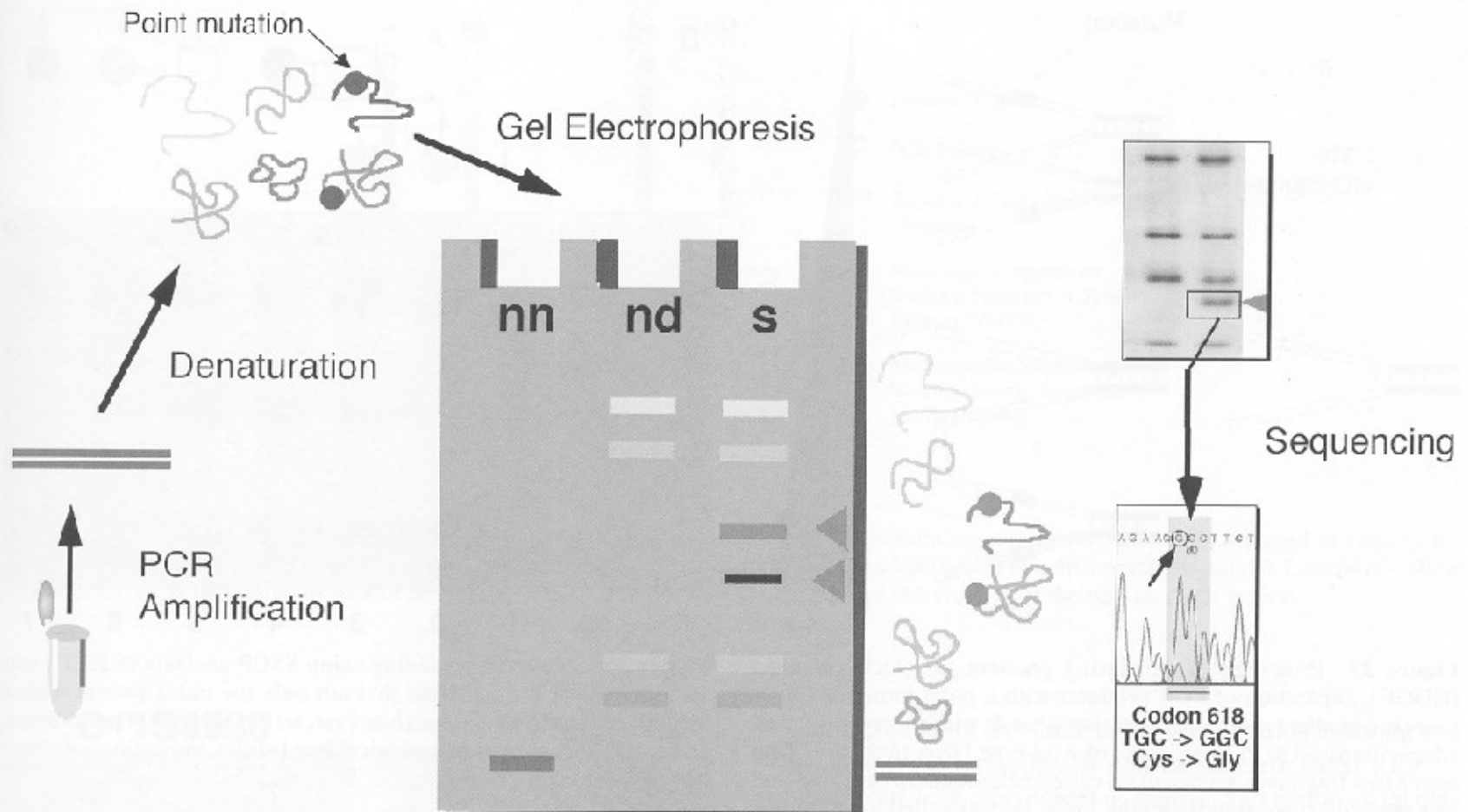
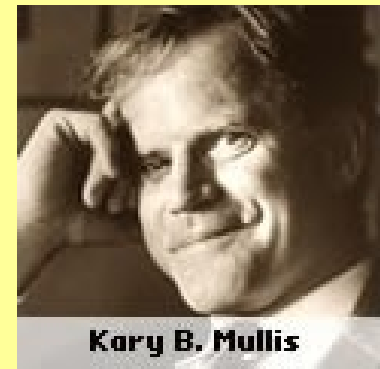


Figure 36 Principles of single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis. A point mutation leads to band shifts in the gel electrophoresis (*arrowheads*). nn, Normal DNA nondenatured; nd, normal denatured; s, sample DNA.

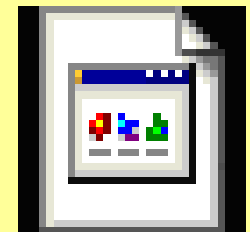
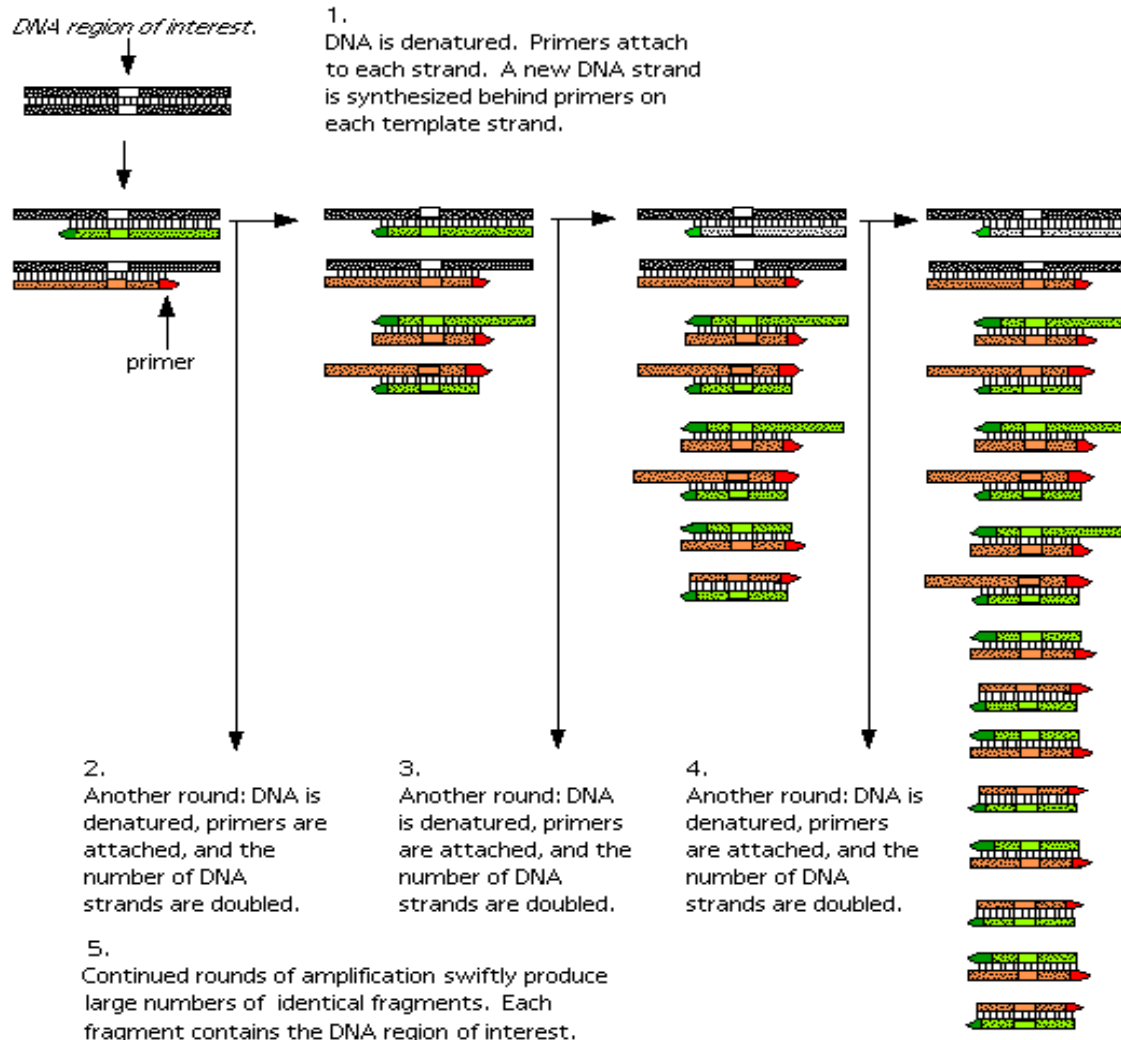
1985

Kary B. Mullis inventa la reazione a catena della polimerasi (**PCR**) una tecnologia capace di generare - con poca spesa e in tempi brevissimi - tantissime copie di frammenti di DNA.



Kary B. Mullis

POLYMERASE CHAIN REACTION



Pcr.exe

La reazione a catena della polimerasi (PCR).

Amplifica solo la regione di DNA delimitata da due sequenze di innesco complementari



Enzimi di restrizione



PCR

