

*Ci fu un tempo in cui per amplificare il DNA,
dovevi crescere tonnellate e tonnellate di piccole celle.
Poi è arrivato un ragazzo di nome Dr. Kary Mullis,
Ha detto che si può amplificare in vitro altrettanto bene.
Il giusto mix : il tuo “DNA modello” con un buffer e alcuni
primer ed poi nucleotidi e polimerasi 
(da PCR Song)*

PROGETTO BIOFORM

Tipizzazione del locus PV92

A cura di Flavio Comandini - Liceo Scientifico “M. Malpighi” - Roma

IL PROGETTO BIOFORM

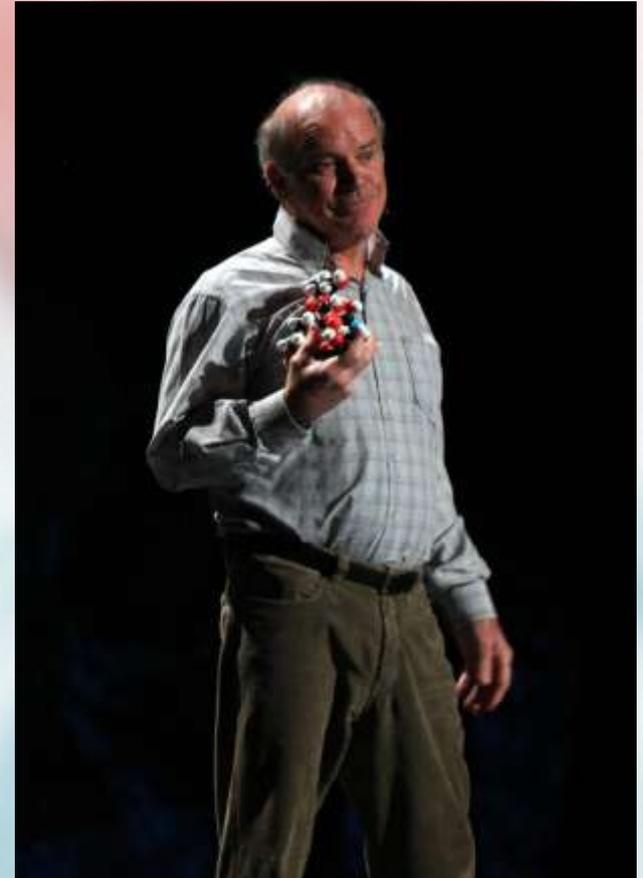
Il Bioform è un progetto per l'integrazione del Piano dell'offerta formativa delle scuole secondarie parzialmente finanziato dalla Provincia di Roma. L'iniziativa, patrocinata dalla Fondazione Ebri "Rita Levi Montalcini", è realizzata dalla Fondazione per l'Avanzamento delle ricerche in Medicina Molecolare (Farmm) in collaborazione con l'Istituto di Neurobiologia e Medicina Molecolare (Inmm) del CNR e l'European Brain Research Institute.

IL PROGETTO BIOFORM: IMPARIAMO

- **A conoscere come si agisce in un vero laboratorio biologico e ad utilizzare alcuni strumentazioni.**
- **A conoscere una tecnica di biologia molecolare molto in uso: la PCR.**
- **Ad affrontare praticamente il significato della tipizzazione di un gene.**
- **A far convergere in qualcosa di pratico molti concetti e cose studiate solo teoricamente: DNA, DNA-polimerasi, trasposoni, PCR, alleli, locus, ecc.**

LA PCR — 1: LA SCOPERTA

- La reazione a catena della polimerasi (in inglese: Polymerase Chain Reaction), comunemente nota con l'acronimo PCR, è una tecnica di biologia molecolare che consente la moltiplicazione (amplificazione) di frammenti di acidi nucleici dei quali si conoscano le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali. L'amplificazione mediante PCR consente di ottenere in vitro molto rapidamente la quantità di materiale genetico necessaria per le successive applicazioni.
- Tale metodica fu ideata nel 1983 da Kary B. Mullis il quale ottenne, per questo, il premio Nobel per la chimica nel 1993.



LA PCR — 2: GLI INGREDIENTI

- Nella macchina per la PCR si mette:
 - Campione di DNA (template)
 - Nucleoside Trifosfato (ATP, GTP, TTP, CTP)
 - Primers (innesco)
 - Taq DNA Polimerasi
 - Il magnesio
- La PCR serve a:
 - in medicina per la diagnostica microbiologica o per l'evidenziazione di cellule tumorali, in tumori liquidi, quando esse sono troppo poche per essere evidenziate da altre metodiche
 - in medicina legale.
 - per le analisi di paleontologia e di antropologia molecolare ed in numerosi campi dell'ingegneria genetica.
 - per lo studio del genoma di organismi non coltivabili, quali numerosi batteri e protisti e per lo studio di popolazioni in ecologia.

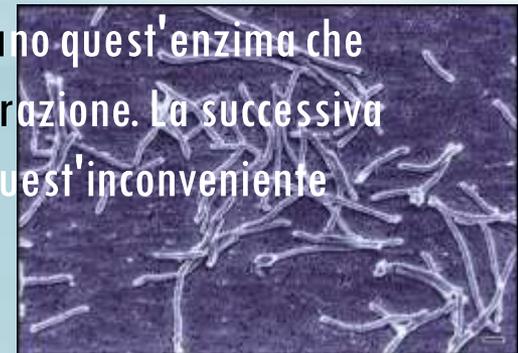


LA PCR — 2: GLI INGREDIENTI (PRIMERS)

- Un primer (in italiano: innesco) è un filamento di acido nucleico che serve come punto di innesco per la replicazione del DNA. I primer sono necessari perché molte DNA-polimerasi (non possono iniziare la sintesi di un nuovo filamento "ex novo", ma possono solo aggiungere nucleotidi ad un filamento pre-esistente.
- In natura, generalmente, è l'RNA che viene usato come primer, perché le RNA polimerasi sono in grado di iniziare la sintesi di una nuova catena senza ricorrere ad un innesco. Gli inneschi vengono sintetizzati da RNA-polimerasi specializzate, chiamate primasi. Su entrambi i lati della forca di replicazione, i primer sono assemblati in direzione $5' \rightarrow 3'$, in maniera discontinua sul filamento ritardo (tramite frammenti di Okazaki).
- La PCR si serve di primer sintetici a DNA. Durante la fase di amplificazione vengono infatti utilizzati primer che aderiscono al DNA stampo (fase di annealing), fungendo da innesco per la DNA polimerasi. I due primer utilizzati per la PCR sono definiti forward e reverse, a seconda che siano complementari al filamento $5' \rightarrow 3'$ o a quello inverso $3' \rightarrow 5'$.
- I primers che funzionano maggiormente sono di solito quelli più ricchi di C o G alle estremità, perché sono quelli che si legano più fortemente al DNA stampo (instaurando tre legami idrogeno invece di due. Primer troppo corti sono spesso poco specifici. La lunghezza ottimale di un primer è generalmente compresa tra 20 e 30 nucleotidi.
- Le sequenze dei primer devono essere scelte in modo tale che l'annealing avvenga solo con le sequenze d'interesse del DNA stampo, evitando l'adesione a sequenze simili, con la conseguente perdita di specificità. Viene inoltre evitata la presenza di nucleotidi ripetuti o sequenze complementari all'interno dello stesso primer, per evitare la formazione di loop, o forcine. Anche l'ibridizzazione tra primer diversi, per la presenza di sequenze ripetute e invertite, con formazione di dimeri, determina una diminuzione dell'efficienza dell'annealing.

LA PCR — 2: GLI INGREDIENTI (TAQ POLIMERASI)

- *Thermus aquaticus* è un batterio termofilo isolato per la prima volta nelle pozze di acqua calda del parco nazionale di Yellowstone, negli Stati Uniti.
- È divenuto famoso nel campo della biologia molecolare dopo la sensazionale invenzione di Kary Mullis, la reazione a catena della polimerasi (PCR), che ha rivoluzionato il modo di fare ricerca in questo ed in molti altri settori; la sua notorietà è dovuta alle caratteristiche di estrema termostabilità di un suo enzima, la DNA polimerasi (commercialmente detta Taq polimerasi), componente fondamentale della miscela di reazione nell'amplificazione del DNA per mezzo della PCR.
- Nei primi studi riguardanti la PCR veniva usata un frammento di DNA polimerasi di *Escherichia coli* (detto frammento di Klenow) ottenuto tramite digestione enzimatica. Le temperature necessarie per la denaturazione del DNA, sfortunatamente, disattivavano quest'enzima che doveva, così, essere reinserito nella provetta dopo ogni fase di denaturazione. La successiva introduzione della Taq polimerasi, termostabile, permise di risolvere quest'inconveniente piuttosto noioso.



LA PCR — 2: GLI INGREDIENTI (TEMPLATE)

- Per effettuare una PCR si può benissimo utilizzare una piccola quantità di bersaglio in quanto la sensibilità della reazione è molto alta. Si è visto che una quantità di DNA genomico di 100 ng è sufficiente per identificare un gene bersaglio che è presente in una singola copia.
- La presenza d'un basso quantitativo di bersaglio, comunque, aumenta la probabilità che vengano amplificate sequenze non specifiche.
- Una quantità troppo elevata di DNA, al contrario, può diminuire l'efficienza dell'amplificazione a causa della presenza di troppi elementi contaminanti e può rendere complessa la valutazione della resa della reazione durante i processi di ottimizzazione dei singoli parametri per cercare di allestire tutta la PCR.

LA PCR — 3: LE FASI

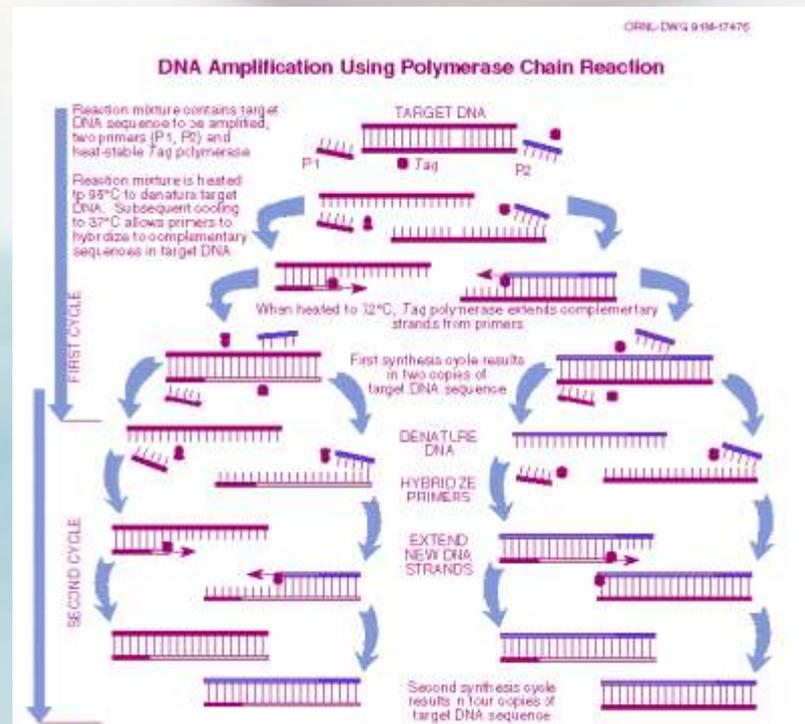
- La soluzione di DNA da replicare, desossiribonucleotidi trifosfati, ioni magnesio, primer e TAQ polimerasi viene portata a una temperatura compresa tra 94 e 99 °C. Ci si trova, di conseguenza, in una situazione in cui la doppia elica del DNA viene completamente scissa ed i due filamenti di cui essa è composta sono liberi (fase di denaturazione).
- Successivamente la temperatura viene abbassata fino a 40-55 °C circa al fine di permettere il legame dei primer alle regioni loro complementari dei filamenti di DNA denaturati (fase di annealing).
- Infine la temperatura viene alzata fino a 65-72 °C al fine di massimizzare l'azione della TAQ polimerasi che determina un allungamento dei primer legati, utilizzando come stampo il filamento singolo di DNA (fase di prolungamento).

LA PCR — 3: I CICLI

Il ciclo descritto viene ripetuto generalmente per circa 30-40 volte. In genere non si superano i 50 cicli in quanto ad un certo punto la quota di DNA ottenuto raggiunge un plateau. Ciò avviene, ad esempio, per carenza degli oligonucleotidi usati come inneschi o per diminuzione dei dNTP. Bisogna inoltre considerare che si potrebbe amplificare in maniera eccessiva anche eventuale materiale genomico contaminante.

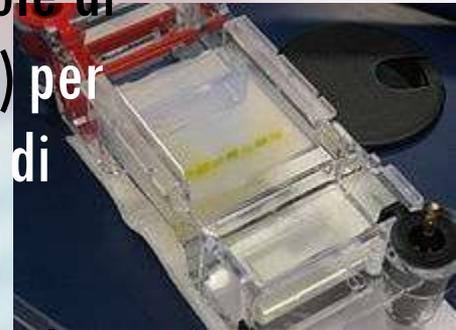
I tubi vengono messi in un thermocycler e si eseguono 30 cicli alle seguenti condizioni:

- * Denaturazione del DNA: 94 C per 30 secondi
- * Appaiamento: 68 C per 30 secondi
- * Estensione: 72 C per 30 secondi



L'ELETTROFORESI 1

- L'elettroforesi su gel di agarosio è una tecnica classicamente utilizzata per analizzare e separare frammenti di acidi nucleici.
- Questa tecnica sfrutta le cariche presenti nelle molecole di DNA o RNA (caricate negativamente per il gruppo PO_4^-) per farle migrare, in un campo elettrico, attraverso un gel di agarosio.
- Il gel funge da setaccio, essendo costituito da una rete di pori, i quali consentono di separare le molecole in base alla loro grandezza: quelle più piccole attraversano più velocemente i pori rispetto a quelle più grandi quindi si avrà una separazione in funzione della velocità.



L'ELETTROFORESI 2

- L'agarosio è un polisaccaride lineare e neutro formato da unità di D-galattosio e di 3,6-anidro-L-galattosio legate alternativamente con legami glicosidici. E' uno zucchero solubile in acqua alla temperatura di ebollizione, mentre diventa solido man mano che si raffredda.
- I campioni da analizzare vanno depositati, con una micropipetta, in apposite fenditure verticali, dette "pozzetti", praticate nel gel a poca distanza dal margine dalla parte del polo negativo. Essendo il DNA un polianione i frammenti migreranno in avanti verso il polo positivo.
- Per consentire la visualizzazione degli acidi nucleici migrati si possono utilizzare diversi tipi di coloranti; quello più usato in assoluto è l'etidio bromuro. Questa molecola planare si inserisce (intercala) tra le basi dell'acido nucleico a doppio filamento, ed emette luce fluorescente quando irradiata con luce ultravioletta (300 nm). L'etidio bromuro può essere aggiunto direttamente al gel (la velocità di migrazione si riduce del 10%), al campione o alternativamente, dopo l'elettroforesi.



I TRASPOSONI

- Si definiscono trasposoni alcuni elementi genetici presenti nei cromosomi capaci di spostarsi da una posizione all'altra del genoma.
- I trasposoni, che vennero individuati inizialmente studiando le cariossidi (i chicchi) del mais, sono presenti in tutti gli esseri viventi, sia in quelli più recenti (evolativamente parlando), come l'uomo, sia nei batteri.
- I trasposoni si spostano all'interno di uno stesso cromosoma nel caso dei batteri oppure da un cromosoma ad un altro: per fare ciò hanno bisogno dell'enzima trasposasi, che viene codificato da geni presenti sui trasposoni stessi.

LA SCOPERTA DEI TRASPOSONI

- All'epoca si sapeva che i geni del mais potevano presentare due forme diverse alleliche una, chiamato C, responsabile della colorazione viola, e il suo mutante chiamato c, che rende la cariosside incolore.
- La genetista McClintock scoprì che la colorazione a macchie delle cariossidi era dovuta al fatto che in alcuni casi, durante lo sviluppo della cariosside, l'allele mutato c (incolore) poteva trasformarsi (revertire) nel suo allele originario C (colore) dando origine alla macchia. Scoprì inoltre che tale mutazione veniva causata da un "elemento mobile" (che oggi sappiamo essere un trasposone) che se presente nel gene C lo muta in c (in pratica, rendendolo incapace di produrre il pigmento colorato) e che, durante lo sviluppo della cariosside, da questi poteva essere trasposto (exciso) revertendo c in C e rendendolo così nuovamente capace di produrre il pigmento.
- La McClintock chiamò questo elemento mobile Ds (dissociatore); oggi sappiamo che si trattava di un trasposone non autonomo. Dimostrò inoltre che, perché l'elemento Ds potesse trasportare, ed excidersi dal gene, era necessaria la presenza di un altro elemento mobile, che chiamò Ac (attivatore), e che oggi sappiamo essere un trasposone autonomo. Questi furono i primi due esempi di trasposoni mai descritti, e il merito di Barbara McClintock fu di averne dimostrato l'esistenza in un'epoca in cui il genoma veniva considerato un'entità assolutamente non mobile.

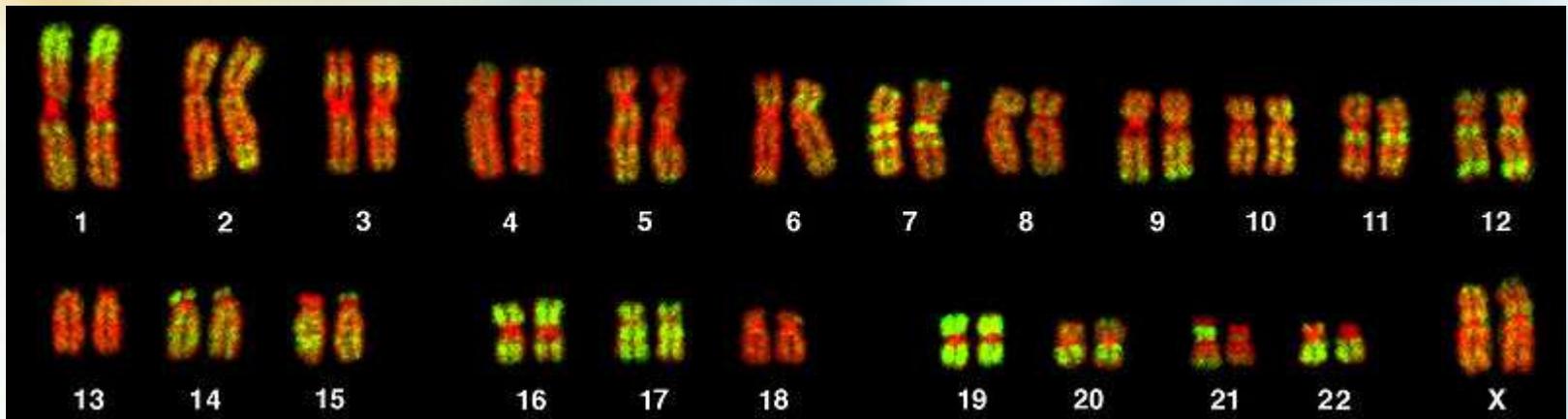
RETRO TRASPOSONI

- I trasposoni umani per i quali si dispone di maggiori studi sono retrotrasposoni, ovvero trasposoni che traspongono per mezzo di un intermedio a RNA; in pratica il retrotrasposone, costituito comunque da un filamento di DNA inserito in un cromosoma, si replica in un filamento di RNA (un processo chiamato trascrizione) e questo filamento viene poi copiato a sua volta in un filamento a DNA, che si integra in una nuova posizione nel genoma.
- Studi hanno dimostrato che almeno alcune particolari famiglie di brevi e lunghe sequenze ripetute del genoma umano mostrino proprietà di trasposizione, in particolare la famiglia denominata Alu, una particolare sequenza di 30 pb altamente ripetuta che si ritrova con frequenza nel genoma. Questi trasposoni sono stati oggetto di studi come sospette cause di mutazioni responsabili di malattie genetiche, come la neurofibromatosi, ma un loro reale coinvolgimento in questa e in altre patologie non ha ancora avuto un riscontro definitivo.

SEQUENZE ALU

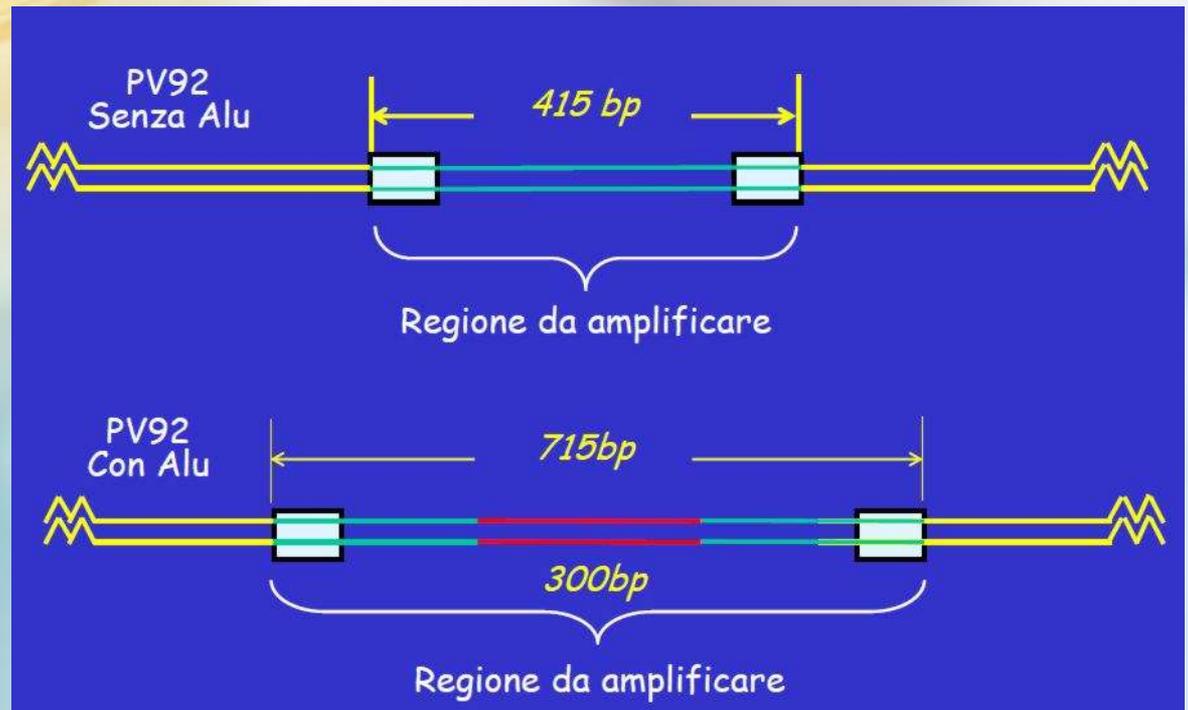
Elementi Alu sono un tipo di elementi trasponibili.

- Gli elementi Alu sono lunghi 300bp.
- Gli elementi Alu sono una specifica classe di tratti ripetitivi di DNA apparsi nel corso dell'evoluzione dei primati tra 60 e 70 milioni di anni fa e non si osservano nel genoma degli altri mammiferi.
- Approssimativamente 500.000 copie Alu per genoma aploide, rappresentando circa il 5% del genoma aploide.
- Rappresentano la più comune forma di DNA mobile e sono in grado di essere trasposti o “saltare” in diverse posizioni della sequenza genomica. Quando giungono in regioni contenenti già geni codificanti, questi elementi possono diventare a loro volta nuovi esoni.
- La maggior parte delle sequenze Alu nel genoma umano possono essere riscontrate anche nelle corrispondenti posizioni dei genomi di altri primati, tuttavia circa 7.000 inserzioni Alu sono tipiche degli uomini.



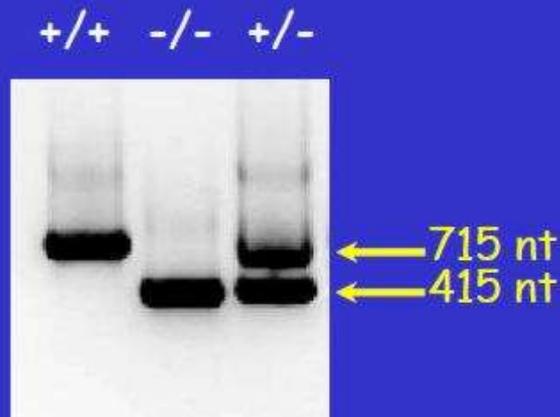
PV92

- Il locus PV92 è localizzato sul cromosoma 16
 - L'inserimento di un Alu avvenne come evento mutazionale in un soggetto (fondatore) migliaia di anni fa
 - Possibili genotipi di PV92 : +/+ +/- -/-
 - Usati in genetica delle popolazioni, analisi di paternità, e medicina forense.
 - Nessuna associazione con fenotipi



PV92 E ALLELI

1. Una sola banda visibile di 715 bp: l'inserto pv92 *Alu* è presente su entrambi gli alleli, omozigote per l'inserzione PV92 *Alu* (+/+).
2. Una sola banda visibile di 415 bp: pv92 *Alu* è assente su entrambi gli alleli, omozigote per l'assenza dell'inserzione PV92 *Alu* (-/-).
3. Due bande visibili di cui una di 715 bp e l'altra di 550 bp: pv92 *Alu* è presente solo su un allele, eterozigote per l'inserzione PV92 *Alu* (+/-).



DATI GEOGRAFICI PV92

Provenienza	numero individui	alleli Alu +	alleli Alu-	omozigoti - /-	Omozigoti +/+	eterozigoti +/- e -/+
Papua Nuova Guinea entroterra	47	36,2	63,8	40,5	12,9	46,7
Papua Nuova Guinea Isole	69	23,9	76,1	57,8	5,6	36,7
Aborigeni australiani	99	15,2	84,8	71,9	2,3	25,8
Nusa Tengarras (Indonesia)	91	50	50	24,9	24,9	50,3
Moluccas (Indonesia)	49	69,4	30,6	9,2	48,0	42,9
Cinesi e vietnamiti	16	81,3	18,7	3,0	65,6	31,5
Quechua (nativi americani)	20	87,5	12,5	1,3	76,3	22,4
Arhuaco (nativi americani)	20	97,5	2,5	0,0	95,0	5
nativi Alaska (nativi americani)	62	64,5	35,5	12,4	41,4	46,2
Greci	50	25	75	56,1	6,1	37,9
Turchi	33	33,3	66,7	44,2	10,8	45,1
Caucasici nord americani	32	14,1	85,9	73,6	1,8	24,6
Zaire (pigmei)	17	35,3	64,7	41,2	11,8	47,1
Rep CentrAfricana (pigmei)	17	26,5	73,5	53,5	6,5	40,1
Nigeriani	11	9,1	90,9	82,3	0,4	17,3
Afro-Americani	31	17,7	82,3	67,5	2,9	29,7
Conoscere il DNA 2007	519	18,0	82,0	67,4	3,5	29,1
Bioform 2008	917	21,2	78,8	61,5	3,9	34,6



A cura di Flavio Comandini - Liceo Scientifico "M. Malpighi" - Roma