

MICROBIOLOGIA

La struttura dei **virus** è molto semplice al tal punto di essere catalogati come **microorganismi acellulari**, ovvero organismi che non sono in grado di trovare sede nei **regni** o **domini** in cui sono suddivisi i microorganismi cellulari.

Le particelle virali si trovano all'esterno delle cellule prendendo il nome di **vironi**, formati da un **core** composto a sua volta da **RNA** o **DNA** o addirittura da proteine composte da un involucro che prende il nome di **capside**.

Ogni capsida è formato a sua volta da delle unità proteiche che prendono il nome di **capsomeri**, l'unione tra **genoma** e **capsida** prende il nome di **nucleocapsida**.

Alcuni virus possiedono un'altra membrana che viene chiamata **pericapsida** o **envelope** formati da residui della **membrana infetta** da cui fuoriesce il virone, l'envelope può essere composto anche da **spicole** che sono dei **complessi molecolari** di natura glicoproteica e **caratteristiche antigeniche** con **attività enzimatiche**.

GLI ENZIMI PER LA RIPRODUZIONE DEI VIRUS

I virioni per potersi riprodurre hanno bisogno di un **corredo enzimatico** e degli organici delle **cellule parassitarie**.

Essendo poveri di enzimi essi non possono effettuare la sintesi proteica e produrre **ATP**, alcuni virioni possiedono **enzimi** per consentire la loro **replicazione**, la **neurominidasi** è una glicoproteina che si trova nella superficie del pericapsida e che scinde la **glicosidici**.

I retrovirus come **HIV** sono in grado di invertire il trasferimento del materiale genetico in quanto possiedono un'enzima, la **trascrittasi inversa** che sintetizza un filamento di DNA come copia del **RNA virale**, inoltre, esistono dei farmaci antivirali che consentono di bloccare questa attività in modo tale da non farlo arrivare alla cellula ospite.

LA CARATTERISTICHE DEL GENOMA

L'acido nucleico può avere una **struttura liscia** o **circolare**, i genomi possiedono un **filamento doppio** o **singolo** di **MRNA** o **DNA**, nessun virus possiede entrambi gli **acidi nucleici** e quando questo capita, essi vengono usati in **vari stadi del ciclo vitale**.

I genomi sono piccole dimensioni e sono insufficienti per sintetizzare le proteine necessarie ai virus infatti questo fenomeno prende il nome di **genoma sovrapposto**.

A **David Baltimore** nel **1975** venne dato il premio nobel per la scoperta dei **retrovirus** e della **trascrizione inversa** ma soprattutto per aver elaborato uno **schema di classificazione dei virus in base alla struttura e al rapporto con il genoma**.

La **replicazione dei virus** segue uno schema come quello della cellula animale quando viene infettata:

- **Assorbimento**: i siti dei recettori animali si trovano nella **componente proteica/ glicoproteica**, gli **antirecettori** si trovano nelle capsida o nella spicole dell'envelope.

- **Penetrazione e decapsidazione:** i virus nudi possono inserire il loro acidi nucleici nel citoplasma nella **membrana citoplasmatica** o per **endocitosi**, il processo di penetrazione avviene tramite la fusione della **membrana plasmatica** e la **membrana del pericapside**.
- **Rilascio:** avviene attraverso il reticolo endoplasmatico, i virioni maturi vengono rilasciati all'esterno delle cellule, tramite vari processi come ad esempio liso **cellulare**, **endocitosi** e **gemmazione**.

IL CICLO VITALE DEI VIRUS

La replicazione dei virus batteriofagi avviene tramite due modi:

- **Ciclo litico:** porta alla morte della cellula infetta
- **Ciclo lisogeni:** il virus integra il proprio DNA nel cromosoma dove rimane inattivo il DNA integrato viene nominato **profago**.

In seguito a fattori naturali, raggi UV il DNA virale può attivarli dando origine al ciclo litico.

RASSEGNA DEI VIRUS

- **Adenoviradea:** si tratta di virus come raffreddore o bronchite che producono solitamente infezioni al ciclo litico
- **Pappillomavirus:** infettano cute e mucose sono trasmissibili sessualmente e presentano delle verruche sulle mani o piedi
- **Polynomaviroide:** sono i virus sospetti della formazione dei tumori
- **Herpes Virus:** sono siglati HHV e si tratta di Herpes Labiale, genitale o mononucleosi.

Successivamente troviamo quelli con intermedio a RNA

- **Coronavirus:** sono virus contenenti capsidi elicoidale e pericapsidi che presentano turbolenze nella loro natura glicoproteica o con genoma **SSRA**, si trasmettono tramite contatto fisico.
- **Retroviradea:** possiedono un filamento singolo a RNA positivo e hanno trascrittasi inversa, essi comprendono inoltre virus che causano un'alterazione dei microorganismi di difesa, vengono classificati come **HIV 1** o **HIV 2**.

I gironi contendono due copie positive di SSRNA, una trascrittasi inversa e un TRNA

La trascrittasi inversa compie tre funzioni fondamentali come:

- **Retroscrizione**
- **Degradazione del filamento RNA**
- **Produzione di dDNA a doppio filamento da uno singolo**

VIRUS DELL'IMMUNODIPENDENZA

I virus HIV possono essere distinti in HIV 1 o HIV2, essi sono formati da un **RNA a filamento doppio** o di RNA monocatenasi, possiedono enzimi come trascrittasi inversa, envelope e capsidi.

Nelle infrazioni e HIV possono esserci **fasi evolutive** come:

- **Fase acuta:** si ha l'incubazione del virus tra le 3-6 settimane ed esso si presenta come influenza normale quando la **siero positività nel sangue** vede presenti anti HIV che non sono in grado di combattere l'intenzione ma che bilanciano l'azione dei virus.

- **Fase asintomatica:** il sistema immunitario viene stimolato alla **pro eliminazione** del **CDG** infetti, questo processo può durare anni finì a quando la **sostituzione** non riesce a compensare la **distruzione**.
- **Ultima fase:** nell'ultima fase dell'**AIDS** vi sono malattie che sono date dalla compromissione del sistema immunitario il virus può essere trasmesso per **via sessuale**, allattamento o tramite aghi infetti ed è importante la prevenzione con: **guanti, porre gli aghi all'interno del contenitore, farmaci e disinfestazione ambientale**.

LA DIFFUSIONE DELLE CELLULE

L'**endonucleasi** sono enzimi capaci di sintetizzare gli acidi nucleici e frammentarli nelle loro sequenze di base.

La **metilazione** degli acidi nucleici porta ad una aggiunta dei gruppi metilici ai nucleotidi, le difese batteriche con mutazione inducono **metilazione, glicosidazione** oppure **inibiscono** gli **enzimi di restrizione**.

Le cellule dei mammiferi che sono soggette ad **un'attività virale**, producono **interferoni**, i geni che codificano gli interferoni sono inibiti da un **repressore di natura proteica** che blocca il **gene promotore** e vengono attivati dall'**infezione virale**.

L'acido nucleico agisce come inibitore e gli interferoni si legano ad altre proteine cellulari funzionando da **messaggeri**.

Gli interferoni agiscono anche sul potenziamento delle difese immunitarie ed essendo specie specifiche la terapia non può essere basata su interferoni di altre specie animali.

VIRUS E TRASFORMAZIONE NEOPLASTICA

L'intenzione virale può determinare nelle cellule ospiti una trasformazione neoplastica ed essi sono in grado di causare l'insorgenza dei tumori a livello del DNA.

Gli oncogeni sono coinvolti nell'insorgenza di tumori come **leucemia, tumore epiteliale o carcinoma dell'utero**, essi sono anche in grado di **trasformare le cellule** in senso neoplastico, infatti, inseriscono il loro genoma all'interno della cellula ospite, prevale infatti una copia genica che viene chiamata **protooncogeno** che si attiva in **senso neoplastico**.

Fra i **virus oncogeni** possiamo trovare il **papillomavirus** ed **epatite B** che vanno a conferire nelle cellule epiteliali una trasformazione neoplastica, gli **oncospessori** inibiscono la proliferazione delle cellule che codificano le proteine in maniera che le **cellule non si dividano**. Il fenomeno dei **virus latenti** riguarda soprattutto Herpes virus che per anni rimane nelle cellule nervose manifestandosi alla mancanza di **difese immunitarie**, lo stesso succede **nell'herpes zoster** che si manifesta dopo anni.

La malattia della mucca pazza è causata dall'encefalopatia spongiforme trasmissibile che causa dei buchi nell'encefalo consentendo così una forma spugnosa al tessuto cerebrale.

LE BIOTECNOLOGIE

Il termine **biotecnologie** fa riferimento alla **scienza** che utilizza organismi viventi e le molecole per poter migliorare le condizioni vitali. Le biotecnologie risalgono dall'antichità infatti prendono il nome di **biotecnologie tradizionali**.

Il gene può essere isolato tramite delle fasi:

- Si può **isolare direttamente il gene d'interesse** tramite gli enzimi di restrizione, oggi sono disponibili interi genomi in frammenti di DNA clonati in cellule batteriche che danno la **libreria genica**.
- Si può **sintetizzare a partire dall'MRNA** prelevato da delle cellule che contengono la sintesi proteica come ad esempio le **cellule Beta** che producono **insulina nel pancreas**, tramite la trascrittasi inversa è possibile ottenere un DNA a singolo filamento da uno **stampo di MRNA**, il successivo impiego del DNA polimerasi produce una **catena complementare**.
- Viene usata anche la **reazione a catena della meiosi (PCR)** per ottenere un gene conoscendo la **sequenza nucleotidica** che si può ottenere da una sintesi chimica a partire dai nucleotidi.

GLI ENZIMI DI RESTRIZIONE

Se si vuole isolare un gene di interesse o un frammento di DNA contenente il gene d'interesse, il DNA può essere tagliato in sequenze più brevi grazie all'enzima di restrizione scoperti dagli scienziati.

Gli **enzimi di restrizione** proteggono il batterio dagli **attacchi del virus batteriofago** frammentano il DNA virale affinché non possa replicarsi e lo vanno ad inibire ma non lo tagliano in quanto il DNA è protetto dalla **metilazione**.

Ogni enzima di restrizione riconosce e taglia il DNA quando incontra i siti di restrizione, la maggior parte di questi enzimi riconosce le sequenze di **4-6 nucleotidi** dette **palindrome** poiché prenderanno la stessa sequenza sia nel **filamento** sia nel **filamento complementare**.

L'enzima che viene usato in laboratorio è **l'escherchia coli**.

Per identificare gli enzimi di restrizione si deve:

- **Riconoscere il batterio di origine**
- **Ceppo batterico**
- **Successione temporale**
- **Taglio simmetrico**
- **Taglio sfalsato**

Per effettuare la ricombinazione è necessario l'intervento di enzimi o di catalizzare la formazione di legami **3° o 5° tra nucleotidi adiacenti**, questi enzimi prendono il nome di **ligasi**.

Utilizzando la ligasi gli enzimi di restrizione e unendo segmenti di DNA si ha la formazione di **1° organismi geneticamente modificato**, l'azione di enzimi di restrizione porta ad:

- **Ottenere DNA modificato**
- **Mappe di restrizione**
- **Impronta genetica**

ELETTROFORESI SU GEL

Quando una molecola di DNA si meschia con un'enzima di restrizione si forma una **miscela di frammenti** di diversa lunghezza e peso molecolare. Per effettuare la **separazione di questi frammenti** avviene tramite l'elettroforesi su gel, la molecola **carica negativamente** attraverso questo cambio **magnetico diventando carico positivo**.

L'**elettroforesi tramite il gel d'agarosio** separa i frammenti di DNA per peso molecolare e lunghezza, il frammento di DNA più è leggero più le molecole migrano più lontano a differenza delle molecole pesanti.

Affinché l'elettroforesi avvenga è necessario che la matrice venga sciolta nel **tampone di corsa**, una **sostanza salina** che stacca il pH **mantiene la ionizzazione**.

Lo scopo dell'elettroforesi su gel è quello di:

- **Valutare e studiare le caratteristiche dei vari frammenti**
- **Individuare il gene d'interesse**
- **Estrarre i frammenti per formare il DNA ricombinante**

LOCALIZZAZIONE DI UN GENE

L'individuazione del gene di interesse si realizza tramite delle **sonde a DNA o RNA** progesterone, le sonde si legano solo a frammenti di DNA che hanno una **sequenza complementare**.

Affinché possa avvenire l'**ibridazione** è necessario che la sonda e l'acido nucleico siano a singolo filamento per poter essere denaturati e infine **miscelati**, le sonde possono essere lunghe da 50 basi, la sequenza dev'essere scelta con cura perché dev'essere specifica.

Esse sono sintetizzate mediante:

- **Clonazione del DNA molecolare**
- **Trascrittasi inversa**
- **Uso della PCR**
- **Sintesi chimica**

Le sonde molecolari devono possedere un sistema di rivelatore che fornisce la loro localizzazione.

INSERIRE I GENI NELLE CELLULE

L'introduzione di molecole di DNA nelle **cellule competenti** può avvenire tramite **trasferimento** nella **cellula ospite** o per **trasfezione** nella **cellula eucariotica**. I metodi per diffondere il DNA i **vettori** che possono essere **plasmidi** e **virus**, possono contenere o esportare l'**inserto** del DNA

A prescindere della loro natura essi devono avere:

- **Penetrare nella cellula ospite**
- **Essere stabili e compatibili con la cellula ospite**
- **Contenere siti di restrizione**
- **Riprodursi autonomamente**

I vettori devono essere in grado di mantenere l'inserto e sono:

- **Cromosomi**
- **Plasmidi**

- Fagi
- Cosmidi

I VETTORI BATTERICI

I plasmidi sono dotati di replicazione autonoma a differenza della **cellula cromosomiale**, essi non sono indispensabili ma hanno delle specifiche funzioni.

I plasmidi che sono presenti nella cellula batterica sono in grado di **amplificare DNA inserito**, essi presentano anche una regione dove sono raggruppate le sequenze di **riconoscimento per enzimi di restrizione**.

Nelle **tecniche di trasferimento dei geni** è necessario sapere che non sempre le cose vanno a ripetersi infatti:

- **Non è detto che il gene entri nel plasmide, si parla di plasmide non ricombinante**
- **Non è sicuro che il gene acquisisca il plasmide ricombinato**

I possibili risultati infatti sono:

- **Cellula senza plasmide**
- **Cellula con plasmide ricombinato**
- **Cellula con plasmide non ricombinato.**

Sono necessari quindi i **geni marcatori**.

Le caratteristiche della cellula ospite sono:

- **Fornire un'ambiente stabile per i vettori**
- **Deve riprodursi**
- **Non deve avere enzimi di restrizione**
- **Deve possedere le mutazioni compatibili con geni marcatori.**

Altre caratteristiche ad esempio:

- **Crescita in vivo**
- **Economicità in vitro**
- **Stabilità in coltura**
- **Assenza di patogeni cida per l'uomo**

Gli ospiti eucarioti più usati nel DNA sono i **lieviti** che hanno un sacco di vantaggi

- **Dimensioni ridotte del genoma**
- **Rapidità della divisione cellulare**
- **Facile coltivazione in laboratorio.**

Uno dei lieviti più prodotti è l'**insulina ricombinante** che ha un duplice vantaggio in quanto l'apparato per la costruzione delle proteine è uguale a quello dell'uomo quindi è sufficiente purificare il liquido della proteina senza rompere le pareti della cellula.

TRASFERIRE IL DNA

Esistono specifiche modifiche per consentire l'entrata del vettore poiché le cellule hanno diverse difficoltà, introdurre un gene non è sufficiente bisogna capire se le cellule hanno acquistato il vettore o in quali il gene si è inserito in una posizione per permettere l'espansione poiché esistano regioni silenti e con ridotta possibilità di trascrizione.

Si può scegliere di inserire il gene in un **procariote** o in un **eucariote**, tenendo conto che è più facile lavorare con una cellula batterica per la struttura semplificata, quando si operano geni **eucarioti** è meglio usare delle cellule **procarioti** o con **geni privi di introni**

Per introdurre il vettore si usa:

- **Trasformazione**
- **Elettroporazione**
- **Fusione di protoplasti**

COLLEZIONE DI CLONI

Se si desidera ottenere un certo gene lo si può cercare nella **libreria genica** che colleziona cellule batteriche o di virus si può ottenere tramite:

- **Estrazione del DNA ospite**
- **Produzione dei cloni**
- **Singoli volumi**
- **Intere biblioteche**
- **Digestione DNA e restrizione**
- **Taglio del vettore**
- **Inserimento del vettore**
- **Ogni volume o ceppo batterico costituisce un volume**
- **Trasformazione del frammento con lettore ricombinato**

LA PCR

La è una tecnica che permette l'**amplificazione del frammento** del dna tramite la DNA polimerasi, è possibile inserire un gene amplificato tramite la **PCR** in un plasmide.

L'invenzione della PCR si deve a **Kary Bank** ed è usata per dimostrare cosa avviene nella replicazione del DNA, il materiale della PCR è il **DNA bersaglio** ovvero un **gene** o un **segmento di DNA** che per essere replicare la catena di un DNA bersaglio dev'essere separata tramite una **temperatura molto elevata**.

A questo punto i primer si legano ad una sequenza complementare, la PCR è costituita da inneschi ovvero brevi frammenti di DNA che attivano la **DNA polimerasi**.

Una scoperta importante per la PCR è stato l'isolamento del **DNA taq polimerasi**, è necessario usare nella PCR una polimerasi stabile per risolvere problemi di denaturazione.

Ogni ciclo di amplificazione è suddiviso in tre fasi:

- **Denaturazione** : per consentire il distacco del filamento la temperatura deve stare tra 94° gradi
- **Appaiamento oligonucleotidi**: Il primer deve legarsi ad una estremità complementare

- **Estensione:** la temperatura si porta a 72° C per favorire l'azione della taq polimerasi

Per funzionare la Taq polimerasi c'è bisogno di:

- **DNA stampo**
- **Cloruro di magnesio**
- **Oligonucleotidi**

La miscela è posta all'interno di un termociclatore che alza e abbassa la temperatura, successivamente la PCR trova luogo in:

- **Studio OMG**
- **Studi antropologici**
- **Medicina forense**
- **Monitoraggio ambientale**

SEQUENZIAMENTO DEL DNA

Le tecniche di clonazione e PCR hanno aumentato la quantità di un gene per poterlo studiare e capirne il funzionamento e il prodotto finale.

Per completarne lo studio è necessario determinare la **sequenza nucleotidica** del **frammento di DNA**, il sequenziamento di un gene fa capire quali sono le **sequenze regolatrici** e quelle **codificanti** che sono espresse in proteine. Le tecniche del **DNA ricombinante** portano molte modifiche come:

- **Produrre su scala proteine per scopi rilassanti**
- **Nuovi vaccini e metodi di somministrazione**
- **Consentire le identificazioni dei microorganismi**
- **Diagnosticare malattie geniche e infettive**
- **Produrre anticorpi**
- **Ottenere piante e animali geneticamente modificabili**
- **Sfruttare le caratteristiche dei microorganismi per eliminare le sostanze di inquinamento**

Nel corso degli ultimi anni il perfezionamento del **genoma editing** ha portato ad un'enorme sviluppo il gene di interesse viene vincolato da:

- **Spermatozoi**
- **Inserimento del gene nella cellula uovo**
- **Retrovirus che si integra nel genoma ai primi stadi dello sviluppo embrionale**
- **Inserendo il nucleo di una cellula somatica in una cellula uovo priva di nucleo**

È possibile modificare il gene modificato tramite:

- **Inattivazione dell'espressione del gene**
- **Inserimento gene non modificato**
- **Correggere alleli mutati tramite genoma editing**

Per trasferire i geni nel corpo umano è necessario, convertirli in un vettore a patogeno in grado di individuare le cellule umane in cui possa essere possibile l'espansione del dna esogeno virgola che può essere introdotto nelle cellule o iniettato nel paziente. I metodi usati nella terapia genica sono :

- **Invito:** iniettati nel corpo umano
- **Ex vivo:** vengono prelevate le cellule emesse a contatto con il vettore.

CLONAZIONE DEI MAMMIFERI E BIOSENSORI

La **clonazione animale**, è un processo di replicazione di un animale, infatti il clone presenta la stessa struttura genica, la clonazione mira invece a modificare il genoma.

Un esempio di clonazione animale è la **pecora Dolly**, fu prelevato dalle cellule invitro il nucleo della pecora **dorset** e venne impiantato in una **cellula uovo anucleata**, il risultato fu una pecora identica alla dorset.

Un **biosensore** è uno strumento dotato di una **naturale componente biologica** e da un **trasduttore**, esso risulta **specifico, sensibile e selettivo**.

La sua componente biologica ha il compito di individuare la presenza e la **concentrazione del campione**, il **trasduttore** è dotato invece di una **sonda** che a contatto con l'ambiente la membrana si stacca e registra le modificazioni un esempio è l'**elettrodo** che può **accettare o cedere gli elettroni**.

I biosensori sono classificati come :

- **Natura della componente biologia** come, **catalitici, chemiorecettorie immunologici**
- In base al **trasduttore, elettrochimici, ottici, piezoelettrici**.