

Verso il primo farmaco ricombinante

Rossana De Lorenzi
Cristina Gritti

Insulina



Versione
italiana

ELLS – European Learning Laboratory for the Life Sciences



Rossana De Lorenzi e Cristina Gritti



Verso il primo farmaco ricombinante

Insulina

Da una collaborazione tra:



Prefazione



Nell'ultimo secolo, la medicina ha compiuto passi da gigante nella comprensione e nella cura di molte malattie. Il suo sviluppo si intreccia con i progressi nel campo della biologia molecolare, che portano alla nascita dell'ingegneria genetica.

L'**insulina** è stata protagonista di alcune tappe importanti di questo percorso, che spesso sono valse il premio Nobel ai suoi studiosi. La sua scoperta e il suo isolamento, nel 1921 ad opera di Banting e Best, hanno consentito lo sviluppo della terapia insulinica che ha salvato da morte certa molti malati di diabete. Nel 1951, l'insulina è stata la prima proteina ad essere sequenziata, segnando una svolta importante nella biologia molecolare. Nel 1976 essa diventa il primo farmaco ricombinante consentito per uso umano, ottenuto con le nuove tecniche dell'ingegneria genetica.

Questo percorso didattico vuole in parte seguire la storia dell'insulina come farmaco, avvalendosi però di nuovi strumenti informatici. Dopo una descrizione delle caratteristiche di questo ormone, vengono spiegate le varie forme di diabete. Per quelle che richiedono la terapia insulinica, storicamente si è operato in modo diverso:

- inizialmente l'insulina era estratta da maiali o bovini; a questo proposito, un **percorso di bioinformatica** conduce a confrontare le sequenze aminoacidiche dell'insulina di alcuni animali, per stabilire quale sia più affine a quella umana e quindi più adatta alla cura del diabete;
- più recentemente è cominciata la produzione di insulina umana ricombinante; dopo avere spiegato le principali acquisizioni d'ingegneria genetica che hanno consentito di raggiungere questo traguardo, un'**attività di laboratorio** ripropone alcuni significativi passaggi nella preparazione di questo farmaco.

Indice



1	Insulina	6
1.1	Breve storia della scoperta	6
1.2	Produzione dell'Insulina	7
1.3	Struttura dell'Insulina	8
1.4	Azione dell'Insulina	10
1.5	Regolazione della produzione di Insulina	11
1.6	L'Insulina in altri animali	13
2	Il diabete mellito	14
2.1	Classificazione	14
2.2	Epidemiologia	14
2.3	Fisiopatologia	14
2.3.1	Resistenza all'Insulina	14
2.3.2	Diabete di tipo 1	14
2.3.3	Diabete di tipo 2	15
2.4	Diagnosi	16
2.4.1	Sintomi	16
2.4.2	Analisi	16
2.5	Trattamento	16
2.6	Complicazioni	17
3	Terapia classica del diabete	18
3.1	Terapia con insulina animale	18
	Attività I – Bioinformatica	19
Al.1	Principali siti di riferimento	19
	www.expasy.org	19
	http://workbench.sdsc.edu	19
	www.ncbi.nlm.nih.gov	20
Al.2	Ricerca le sequenze aminoacidiche	20
Al.3	Confrontare le sequenze aminoacidiche	23
Al.4	Visualizzare la struttura tridimensionale	30



4	Terapia con Insulina ricombinante.....	35
4.1	Verso l'Insulina ricombinante.....	35
4.1.1	Enzimi di restrizione.....	35
4.1.2	Le ligasi.....	35
4.1.3	Il clonaggio.....	35
4.1.4	La tecnologia del DNA ricombinante.....	36
4.2	La sintesi di Insulina umana ricombinante.....	38
4.2.1	Strategia della Genentech.....	38
4.2.2	Strategia della Biogen.....	38
4.3	La produzione di Insulina ricombinante.....	39
4.3.1	Insulina dai batteri.....	39
4.3.2	Insulina dal lievito.....	41
	Attività II – Biologia molecolare.....	43
All.1	Introduzione.....	44
All.2	Protocollo.....	49
All.3	Reagenti e strumenti utilizzati.....	49
All.3.1	Descrizione dei prodotti utilizzati.....	49
All.3.2	Materiale e soluzioni necessarie.....	49
All.3.3	Strumenti necessari.....	50
All.4	Norme di sicurezza nei laboratori.....	50
All.4.1	Norme generali.....	50
All.4.2	Precauzioni da adottare durante l'utilizzo di apparati elettrici.....	51
All.4.3	Precauzioni da prendere nell'utilizzo di sostanze tossiche-nocive.....	51
All.4.4	Precauzioni da prendere quando si lavora con materiale biologico.....	52
All.4.5	Precauzioni nell'uso di Radiazioni Ultraviolette.....	52
All.4.6	Norme per l'uso delle centrifughe.....	52
All.4.7	Utilizzo del forno a microonde.....	53
All.4.8	Utilizzo dell'apparecchiatura per elettroforesi.....	53
	Appendice I.....	54
	Appendice II.....	58
	Appendice III.....	59
5	Bibliografia e sitografia.....	66

1 Insulina

L'insulina è un ormone proteico, il cui nome deriva dal latino "insula", in quanto secreto da gruppi di cellule endocrine presenti nel pancreas chiamate isole di Langerhans. Principalmente l'insulina permette il metabolismo del glucosio attivando la glicolisi; favorisce l'accumulo di glucosio nel fegato sotto forma di glicogeno e l'immagazzinamento dei grassi.

1.1 Breve storia della scoperta

Studiando al microscopio la struttura del pancreas, il giovane studente di medicina **Paul Langerhans** vi individuò delle masserelle di tessuto sparse (isole di Langerhans). Era il 1869 e da allora si cercò di capire quale fosse la funzione di queste cellule: si pensava producessero un secreto con funzione regolatrice nella digestione.

Nel 1889, **Oscar Minkowski**, in collaborazione con **Joseph von Mering**, notò l'insorgere del diabete in cani a cui era stato rimosso il pancreas. Questa ghiandola doveva quindi essere coinvolta nella regolazione del livello di zuccheri nel sangue, e in particolare le isole di Langerhans, come stabilì più tardi **Eugene Opie** (1901).

Negli anni successivi si susseguirono diversi tentativi d'isolare il secreto delle isole di Langerhans, ma solo nell'ottobre del 1920 **Frederick Banting**, leggendo un articolo di Minkowski, intuì un metodo che avrebbe avuto successo. Egli capì che la secrezione esocrina del pancreas poteva distruggere la secrezione interna delle isole di Langerhans, quindi bisognava fare in modo d'eliminarla. Durante l'estate successiva lavorò all'Università di Toronto sotto la supervisione di John **James Rickard Macleod** con l'aiuto dello studente in medicina **Charles Best**. La sua idea era di legare i dotti pancreatici nei cani; dopo alcune settimane le cellule con funzione digestiva del pancreas sarebbero morte e sarebbero state assorbite dal sistema immunitario, lasciando le isole di Langerhans. Da esse fu prelevato il secreto prodotto che venne chiamato "isletin" (da cui insulina). Somministrato in cani privati del pancreas, questo estratto era in grado di abbassare il livello di zuccheri nel sangue! Nei mesi successivi Banting e Best cercarono di perfezionare il metodo d'estrazione, cercando di abbreviarne i tempi (erano necessarie sei settimane per riuscire a estrarre insulina da un animale!): usarono per questo pancreas fetale bovino, che non ha ancora sviluppato le ghiandole digestive. In seguito fu necessario purificare l'estratto e a tal fine si avvalsero della collaborazione del biochimico **James Bertram Collip**. Nel 1922 iniziò la sperimentazione clinica: furono iniettate con successo dosi di insulina purificata in bambini diabetici. Dal novembre di quell'anno, la casa farmaceutica Eli Lilly cominciò a produrre insulina purificata.



Fig. 1.1 Left: A sinistra, Charles Best e Frederick Banting (da www.lillydiabete.it). A destra, in alto J. J. R. Macleod (da www.ui-healthcare.com); in basso James B. Collip (da www.medicalhistory.uwo.ca)

Nel 1923 F. Banting e J. Macleod ricevettero il premio Nobel per la Medicina, che vollero condividere con Best e Collip.

Nel 1958, un altro premio Nobel, questa volta per la Chimica, fu assegnato al biologo molecolare britannico **Frederick Sanger**, per aver determinato la sequenza di aminoacidi dell'insulina. Nel 1969, **Dorothy Crowfoot Hodgkin**, già premio Nobel per la Chimica, determinò la configurazione spaziale dell'insulina, mediante diffrazione a raggi X. Nel 1977, **Rosalyn Sussman Yalow** ricevette un Nobel per la Medicina per aver sviluppato la tecnica diagnostica radioimmunologica per l'insulina (RIA, Radio Immuno Assay).

1.2 Produzione dell'insulina

Nei mammiferi, l'insulina è sintetizzata dal pancreas: esso è principalmente una ghiandola esocrina, per la produzione di succhi digestivi, ma il 2% della sua massa complessiva ha funzione endocrina. Questa porzione è rappresentata dalle isole di Langerhans, composte da almeno quattro tipi di cellule:

- cellule α (15-20%) che secernono glucagone (ormone che promuove il rilascio di glucosio nel sangue rimuovendolo dal glicogeno epatico);
- cellule β (65-80%) che secernono insulina;
- cellule γ (3-10%) che secernono somatostatina (ormone che inibisce sia la secrezione di insulina e glucagone e sia la sintesi dell'ormone della crescita ipofisario);
- cellule PP (circa 1%) che secernono il peptide pancreatico (ormone che regola la secrezione esocrina del pancreas).

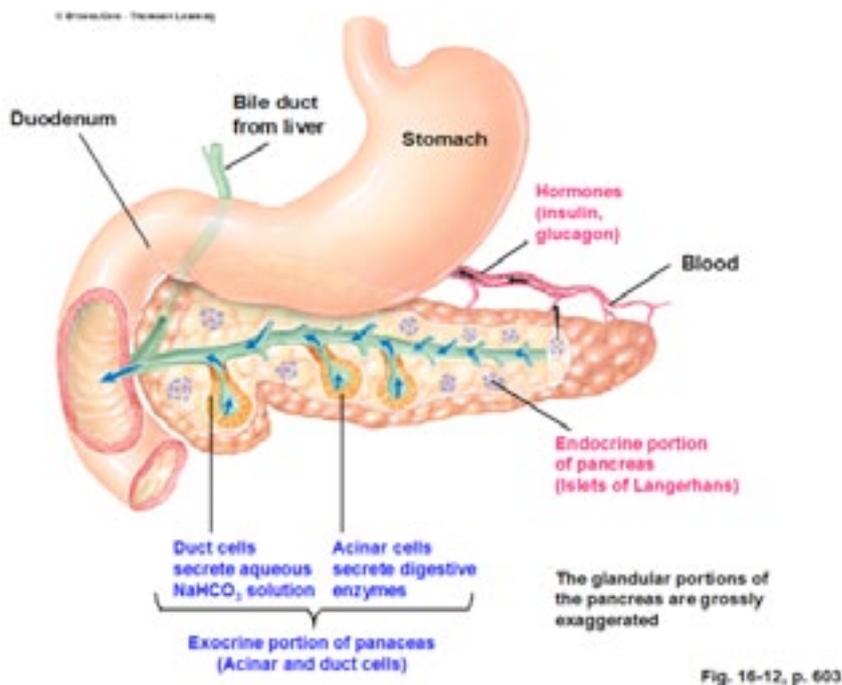


Fig. 1.2 Struttura del pancreas (da www.colorado.edu)

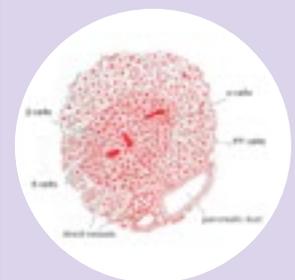


Fig. 1.3 Rappresentazione di un'isola di Langerhans con i vari tipi di cellule (da www.staminali.aduc.it)

Per quanto riguarda la **struttura secondaria** (Fig. 1.6), nella catena A si formano due sezioni ad alfa elica, che delimitano una parte centrale a “nastro piatto”; la catena B presenta una sezione maggiore ad alfa elica e si piega a gomito, “avvolgendo” la catena A.

La **struttura terziaria** (Fig. 1.7), come già detto, è stabilizzata da ponti disolfuro. La parte esterna della molecola è principalmente polare, quella interna è per lo più apolare.

Per quel che concerne la **struttura quaternaria** (Fig. 1.8), l'insulina in soluzione tende a formare dimeri, per l'instaurarsi di ponti idrogeno tra le estremità C-terminali della catena B.

In presenza di ioni zinco può formare esameri (Fig. 1.9), ossia gruppi di sei molecole; ne risulta una forma toroidale (“a ciambella”) con la quale l'insulina è immagazzinata nelle cellule β e secreta nel flusso sanguigno. In ogni caso la forma attiva è costituita da un singolo monomero.

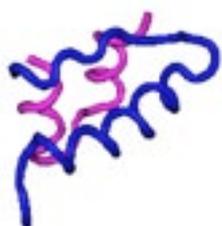


Fig. 1.6 Struttura dell'insulina: la catena A è rappresentata in fucsia, la catena B in blu (da www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez, modificata)

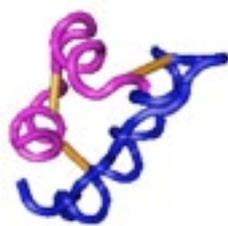


Fig. 1.7 Struttura dell'insulina: in arancione sono indicati i ponti disolfuro (da www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez, modificata)

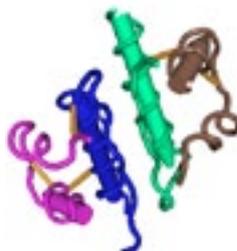


Fig. 1.8 Dimero di insulina: gli oggetti cilindrici indicano un'alfa elica (da www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez, modificata)

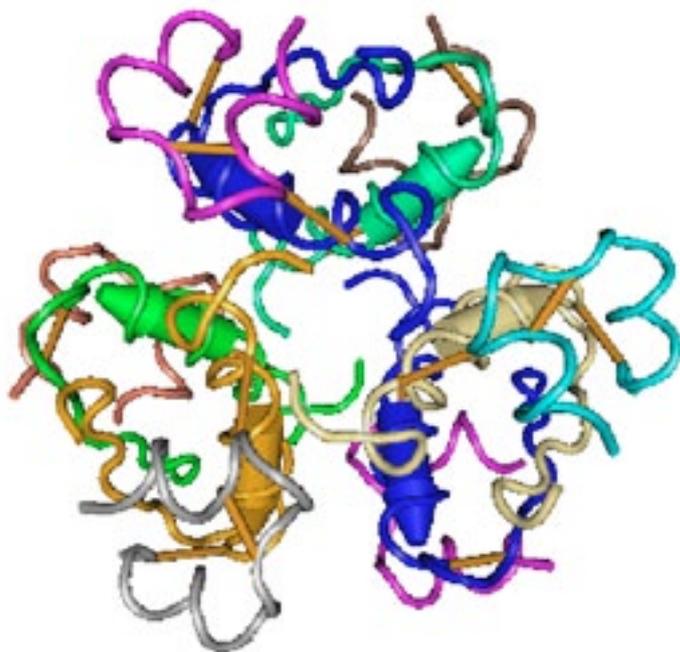


Fig. 1.9 Esamero di insulina: gli oggetti cilindrici indicano un'alfa elica (da <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>, modificata)

1.4 Azione dell'Insulina

L'insulina agisce, direttamente o indirettamente, su gran parte dei tessuti corporei, ad eccezione dell'encefalo. I suoi effetti possono essere così riassunti:

- aumenta la captazione del glucosio nelle cellule stimolandone la diffusione facilitata: aumentano così le reazioni a cui il glucosio prende parte, quali la glicolisi, la sintesi di grasso e di glicogeno;
- aumenta la sintesi di glicogeno, non solo aumentando la diffusione facilitata del glucosio nelle cellule, ma anche stimolando l'attività dell'enzima che ne catalizza la formazione;
- aumenta la sintesi di acidi grassi e la formazione di trigliceridi, in quanto stimola le cellule del tessuto adiposo ad assumere i lipidi presenti nel sangue e inibisce l'attività dell'enzima che catalizza la demolizione dei trigliceridi;
- promuove il trasporto attivo di aminoacidi nelle cellule, soprattutto muscolari: aumenta così la concentrazione dei metaboliti per la sintesi proteica e quindi la sintesi stessa; inoltre riduce la proteolisi;
- stimola gli enzimi coinvolti nell'utilizzo del glucosio ed inibisce quelli coinvolti nella sua sintesi (diminuzione della gluconeogenesi);
- stimola l'assunzione di potassio da parte delle cellule;
- favorisce il rilassamento delle pareti muscolari delle arterie, aumentando così il flusso sanguigno, specialmente in quelle di calibro minore.

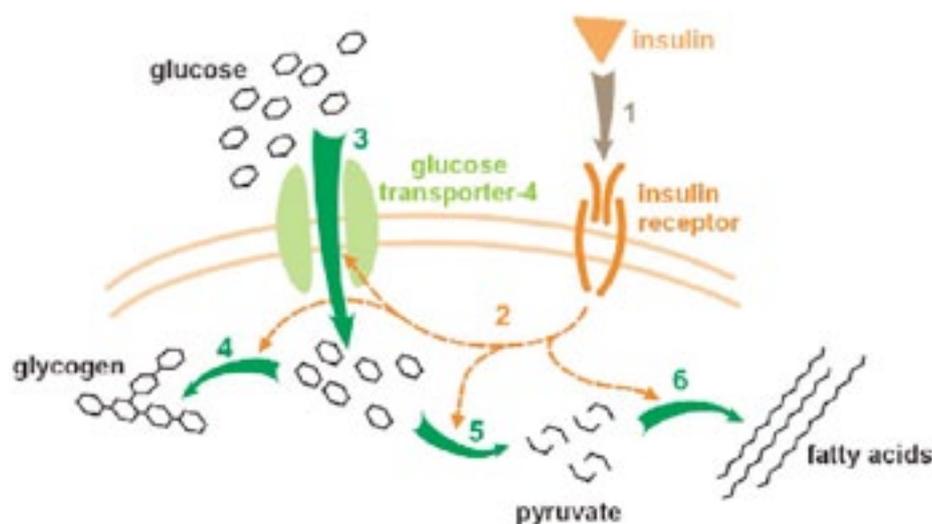


Fig. 1.10 Effetti dell'insulina sul metabolismo del glucosio: l'ormone si lega al suo recettore di membrana che attiva una serie di reazioni, tra cui l'ingresso facilitato del glucosio nel citoplasma (3), la sintesi di glicogeno (4), la glicolisi (5) e la sintesi di acidi grassi (6) (da www.en.wikipedia.org/wiki/Insulin)

Nota: in figura il trasportatore del glucosio è indicato come *Glucose Transporter 4* (o GLUT4): si tratta della proteina che si trova nelle membrane cellulari dei tessuti adiposo e muscolare striato (cardiaco e scheletrico). In assenza di insulina esso è immagazzinato all'interno della cellula; il legame insulina-recettore induce la distribuzione del GLUT4 sulla membrana, dove consente la diffusione facilitata del glucosio.

Il tessuto muscolare e quello adiposo sono quelli maggiormente influenzati dall'insulina per quanto riguarda la captazione del glucosio (essi in media rappresentano i due terzi di tutte le cellule del corpo umano). Da notare che l'insulina, pur giocando un ruolo primario nel metabolismo del glucosio, non modifica l'assorbimento di questo zucchero nelle cellule dell'encefalo nè il suo trasporto attivo nel tubulo renale e nell'epitelio gastrointestinale.

1.5 Regolazione della produzione di Insulina

La secrezione di insulina è principalmente regolata dalla concentrazione di glucosio nel sangue che irrorava il pancreas, le cellule β in particolare, secondo un meccanismo di feedback negativo (Fig. 1.11). Un aumento di glucosio stimola la secrezione dell'ormone, che provoca un maggiore ingresso di glucosio nelle cellule con conseguente diminuzione della concentrazione nel plasma; la diminuzione del glucosio inibisce ulteriore secrezione di insulina.

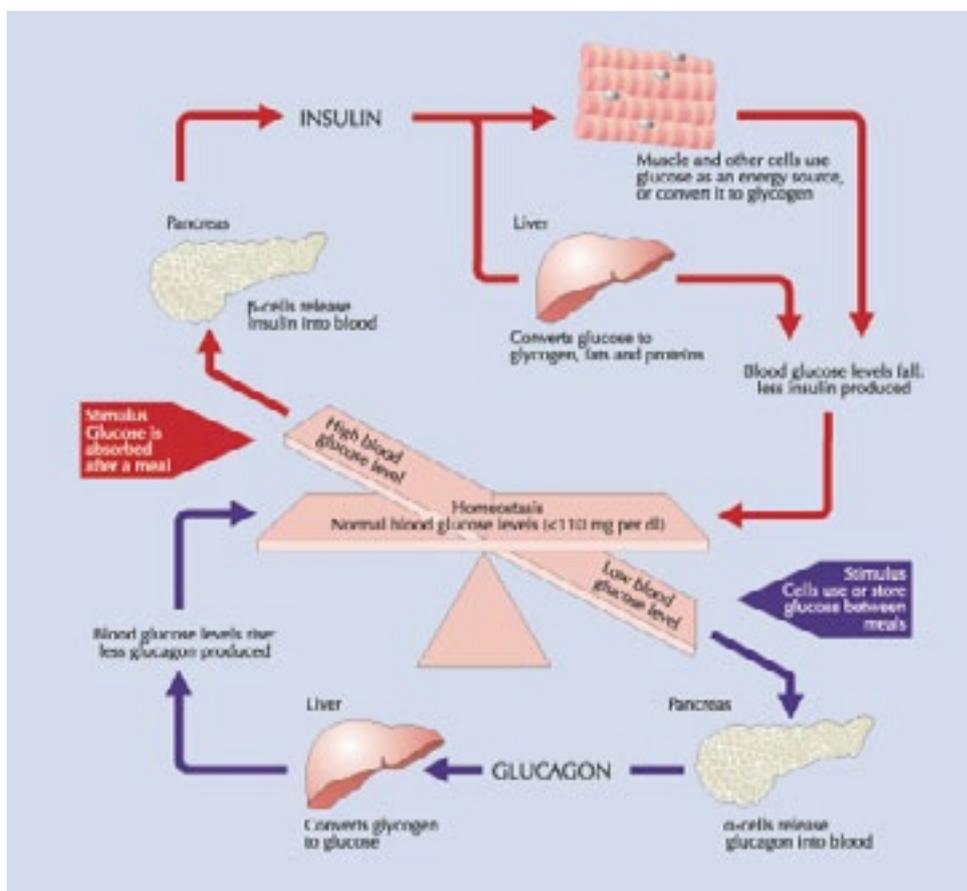


Fig. 1.11 Regolazione del glucosio (da www.scienceinschool.org/2006/issue1/diabetes/italian, per gentile concessione di Dean Madden)

Il meccanismo specifico attraverso il quale si ha secrezione di insulina non è completamente chiaro, ma se ne conoscono alcune caratteristiche, che portano al seguente modello: il glucosio entra nelle cellule β del pancreas mediato da uno specifico trasportatore, GLUT2 (presente solo nelle membrane di queste cellule, di quelle epatiche, dell'ipotalamo, dell'intestino tenue e del tubulo renale).

Lo zucchero viene utilizzato per la glicolisi e la respirazione cellulare, con produzione di ATP; l'aumento dell'ATP determina la chiusura dei canali del potassio e conseguente depolarizzazione della membrana. In risposta a questo fenomeno si ha ingresso di ioni calcio e di seguito un ulteriore rilascio di questi nel citoplasma dal reticolo endoplasmatico.

Tale aumento del livello del calcio si pensa sia il principale responsabile del rilascio dell'insulina accumulata nelle vescicole di secrezione dell'apparato del Golgi. L'aumento del glucosio nelle cellule β sembra che attivi anche altre vie metaboliche non legate al calcio, che partecipano alla secrezione di insulina. Inoltre stimola la trascrizione del gene per l'insulina e la successiva traduzione dell'mRNA.

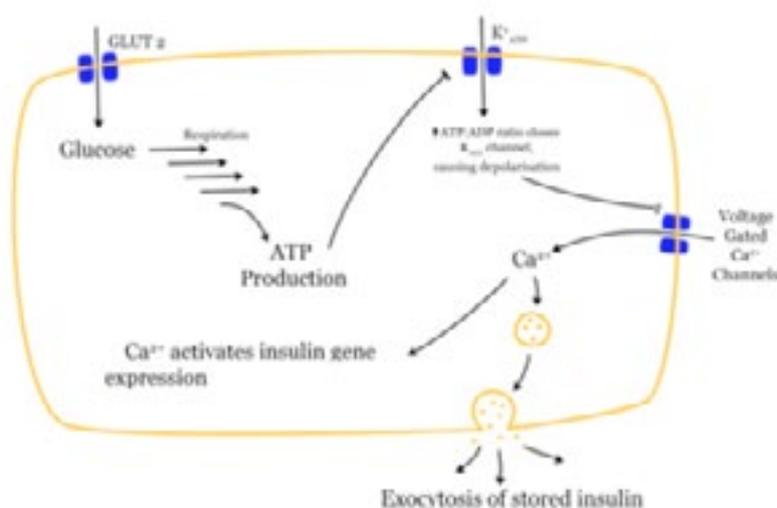


Fig. 1.12 Meccanismo glucosio-dipendente per il rilascio di insulina (da <http://en.wikipedia.org/wiki/Insulin>, modificato)

Tuttavia il glucosio non è l'unico fattore di controllo del rilascio di insulina (sebbene sia il più importante).

L'ingestione di cibo in generale, non solo di natura glucidica, determina una maggiore secrezione, così come sono coinvolti anche un certo controllo nervoso (stimoli visivi e gustativi del cibo) e ormonale (ad esempio di ormoni gastrointestinali).

1.6 L'Insulina in altri animali

La sequenza di aminoacidi dell'insulina varia da specie a specie (a volte possono esserci aminoacidi aggiuntivi), tuttavia vi sono alcune parti altamente conservate, ad esempio la posizione dei tre ponti disolfuro, entrambe le estremità della catena A e l'estremità C-terminale della catena B. Ne consegue una struttura tridimensionale molto simile. L'insulina prodotta nei mammiferi è molto simile: ad esempio quella bovina differisce da quella umana solo per tre aminoacidi, mentre quella di maiale solo in uno! Persino all'interno dei vertebrati in generale ci sono strette somiglianze: in alcune specie di pesci l'insulina è abbastanza simile da essere efficace anche nell'uomo. Per quanto riguarda invece il peptide C della proinsulina, esso è assai diverso da specie a specie.

2 Il diabete mellito

Tradotto dall'antico greco, il termine *diabete mellito* significa 'dolce flusso' ed ha origine nei tempi in cui assaggiare l'urina dei pazienti era ancora una pratica prevista dai metodi diagnostici dei medici. Dal sapore dolce dell'urina il diabete mellito veniva distinto dal *diabete insipido*, un altro disturbo che si manifesta con un incremento dell'escrezione urinaria.

Il termine diabete mellito include diversi tipi di patologie accomunate da un abnorme incremento dei livelli di zucchero (glucosio) nel sangue.

2.1 Classificazione

Le forme più frequenti sono il diabete di tipo 1 e di tipo 2. Il diabete di tipo 1 si manifesta in genere durante l'infanzia o l'adolescenza, ma ultimamente si è notato che anche gli adulti possono sviluppare questa forma di diabete, in alcuni casi anche verso i quaranta o cinquant'anni. Il diabete di tipo 2 è piuttosto un disturbo dell'età adulta, ma con l'aumentare dei casi di obesità, molti giovani, a volte anche adolescenti, hanno sviluppato questo tipo di disturbo. Altre forme di diabete includono il diabete gestazionale (che si sviluppa durante la gravidanza), il diabete che si sviluppa in seguito a resezione del pancreas, ed alcune rare forme di diabete di origine genetica.

2.2 Epidemiologia

Circa il 90% dei pazienti con diabete mellito soffre della forma di diabete di tipo 2. Si stima che 150 milioni di persone nel mondo siano affette da diabete di tipo 2, e questo numero è destinato a duplicarsi nei prossimi 20 anni. L'incremento interesserà soprattutto i Paesi in via di sviluppo come India e Cina. Negli Stati Uniti, dove l'incidenza di diabete è alta, si calcola che una persona su tre svilupperà il diabete di tipo 2.

2.3 Fisiopatologia

2.3.1 Resistenza all'Insulina

La maggior parte dei pazienti con diabete di tipo 2 o pre-diabetici sono caratterizzati dalla resistenza all'insulina. In questi pazienti l'insulina, seppur presente nel sangue a livelli normali o addirittura elevati, è meno efficace rispetto agli individui normali. La resistenza all'insulina periferica comporta una ridotta efficacia dell'insulina a mediare il riassorbimento di glucosio da parte delle cellule muscolari. Nel fegato, l'insulina non è in grado di sopprimere la produzione di nuovo glucosio e la scissione del glicogeno. Pertanto, la resistenza all'insulina provoca un severo aumento della glicemia (iperglicemia).

2.3.2 Diabete di tipo 1

Il diabete di tipo 1 è un esempio di malattia autoimmune. In individui geneticamente predisposti, in seguito probabilmente ad un'infezione virale, si sviluppa un'infiammazione delle cellule beta del pancreas. Poichè le cellule beta sono le uniche in grado di produrre e secernere insulina, ne deriva una carenza di insulina.

Di conseguenza, i pazienti che soffrono di diabete di tipo 1 necessitano di una terapia a base di insulina.

2.3.3 Diabete di tipo 2

Il diabete di tipo 2 è un esempio tipico di malattia causata dalla combinazione di fattori genetici ed ambientali. La componente genetica è maggiore rispetto al diabete di tipo 1: il gemello di un paziente affetto da diabete di tipo 2 svilupperà quasi certamente la malattia. D'altra parte, fattori quali la dieta e l'esercizio fisico sono pure determinanti; in caso di scarso nutrimento, ad esempio, l'incidenza del diabete di tipo 2 è molto bassa.

Per dare un esempio della complementarità di genetica e stile di vita basta pensare alla razza dei Pima Indians (Fig. 2.1). Quelli che vivono in Messico hanno un'incidenza del diabete pari circa all'8%, mentre quelli che sono emigrati negli Stati Uniti, dove lo stile di vita è più sedentario e l'accesso al cibo energetico (grasso) è più semplice, hanno un'incidenza di diabete che raggiunge il 50%.

Il più importante fattore di rischio per il diabete di tipo 2 è l'obesità. Studi epidemiologici hanno dimostrato che, rispetto agli individui magri, uomini e donne obesi (indice di massa corporea >35) hanno una probabilità rispettivamente 60- e 90-volte maggiore di sviluppare diabete di tipo 2. In termini genetici, il diabete di tipo 2 è una malattia multifattoriale per il cui sviluppo non esiste un unico gene responsabile.

In contrasto ai pazienti con diabete di tipo 2 conclamato, i pazienti prediabetici (caratterizzati da resistenza all'insulina) non mostrano iperglicemia a digiuno. Tuttavia, in seguito ad un test di tolleranza al glucosio (oGTT), che prevede la somministrazione di 75 grammi di glucosio, i pazienti mostrano livelli estremamente elevati di glicemia (vedi Tabella 1). Questi pazienti, dunque, sono caratterizzati da un'alterata tolleranza al glucosio.

Per un breve periodo di tempo, le cellule beta del pancreas producono un'elevata quantità di insulina tale da combattere la resistenza all'insulina, è per questo che molti pazienti pre-diabetici mostrano livelli alti di insulina nel plasma. Tuttavia, nella maggior parte dei casi, la percentuale di morte delle cellule beta supera la percentuale di formazione di nuove cellule, e ciò risulta in una diminuzione delle cellule beta che producono insulina. Quando la capacità di produrre insulina del pancreas viene resa insufficiente dall'aumentata necessità dovuta alla resistenza all'insulina, il paziente pre-diabetico sviluppa il diabete di tipo 2.

Sono tre i principali fattori che contribuiscono all'iperglicemia:

1. La resistenza all'insulina nel tessuto muscolare, che comporta una diminuzione della quantità di glucosio riassorbita dal sangue.
2. La difettosa secrezione di insulina da parte del pancreas.
3. L'aumento della produzione di glucosio da parte del fegato come conseguenza della resistenza all'insulina epatica .



Fig. 2.1 Razza dei Pima Indians (da www.scienceinschool.org)

2.4 Diagnosi

2.4.1 Sintomi

Alcuni sintomi precoci ed aspecifici del diabete includono affaticamento, generale stato di malessere, aumentata tendenza alle infezioni, ad esempio infezioni della vescica. Quando l'iperglicemia diventa più pronunciata, i pazienti cominciano ad espellere il glucosio con le urine, e producono una maggiore quantità di urina. Questa situazione conduce ai sintomi del diabete conclamato, che sono i tipici sintomi iniziali del diabete di tipo 1: aumento della diuresi, che comporta un aumento della sete e, di conseguenza, disidratazione e perdita di peso.

2.4.2 Analisi

Durante le fasi iniziali del diabete di tipo 2 i pazienti avvertono pochi sintomi, o addirittura non ne avvertono affatto, e spesso la malattia rimane silente per molti anni. Purtroppo le complicanze del diabete (riportate di seguito) spesso si sviluppano proprio in questo periodo. Per questo motivo è importante l'analisi dei pazienti a rischio di sviluppare diabete di tipo 2, come le persone obese, quelle con una storia familiare di diabete, e le donne con precedenti episodi di diabete gestazionale. L'analisi può essere effettuata sia attraverso la determinazione dei livelli di glicemia a digiuno, oppure attraverso l' oGTT (sopra descritto). I criteri più importanti per diagnosticare il diabete sono indicati nella Tabella 1.

	Normale	Tolleranza al glucosio alterata (o livelli di glucosio a digiuno alterati)	Diabete
Glucosio a digiuno	<110 mg/dl <6.1 mmol/l	110-125 mg/dl 6.1-6.9 mmol/l	≥126 mg/dl ≥7.0 mmol/l
2h dopo oGTT	<140 mg/dl <7.8 mmol/l	140-199 mg/dl 7.8-11.1 mmol/l	140-199 mg/dl 7.8-11.1 mmol/l

Tabella 1: Criteri diagnostici per il diabete di tipo 2

Il valore più importante per monitorare il decorso del diabete è l'emoglobina glicosilata (HbA1c). Quanto più è alta la glicemia, tanto più elevati saranno i livelli di emoglobina glicosilata. Poiché l'emoglobina è trasportata nelle cellule rosse del sangue, che hanno una vita media di circa 120 giorni, il valore dell' HbA1c riflette il controllo dei livelli di glucosio nei tre mesi precedenti all'analisi. In genere un valore dell'HbA1c inferiore al 6.1% viene considerato normale. Il valore caratteristico dell'HbA1c nei pazienti diabetici è intorno al 7% o anche al 6.5%.

2.5 Trattamento

La base della cura del diabete consiste nell'educare i pazienti alla patogenesi della malattia, alle sue complicazioni, alla dieta ed al trattamento farmacologico, e ad altri aspetti del disturbo.

I pazienti diabetici devono essere istruiti sulla dieta appropriata, sull'esercizio fisico da svolgere e sulla necessità, in molti casi, di perdere peso. Quei pazienti affetti da diabete di tipo 2 capaci di cambiare radicalmente il loro stile di vita e di perdere peso significativamente, hanno buone possibilità di riuscire a dominare la malattia. Purtroppo solo una minima percentuale di pazienti ci riesce.

Se i livelli di HbA1c superano il 7% la dieta e l'esercizio fisico non sono più sufficienti, ed è necessario il trattamento farmacologico. Molti farmaci anti-diabetici sono presenti sul mercato, in grado di combattere in maniera specifica diverse cause di iperglicemia. La Metformina riduce la produzione epatica di glucosio, i farmaci a base di sulfonilurea aumentano la secrezione pancreatica di insulina, e i glitazoni riducono la resistenza periferica all'insulina. Se i livelli di HbA1c superano il 7% nonostante il trattamento farmacologico con anti-diabetici per via orale, si richiede la terapia a base di insulina. In genere la cura si comincia somministrando durante la notte insulina a lunga durata. Alla fine molti pazienti affetti da diabete di tipo 2, allo stesso modo dei pazienti portatori di diabete di tipo 1, hanno bisogno della terapia di insulina completa. Questa può consistere nella somministrazione combinata di insulina a lunga e a breve durata due volte al giorno, o in una terapia più intensa a base di iniezioni di insulina a lunga durata, durante la notte o al mattino, ed iniezioni di insulina a breve durata insieme ai pasti. Le dosi di insulina devono essere sempre associate all'assunzione di cibo, per evitare fenomeni di iper- o ipoglicemia.

A causa dell'elevato rischio di complicazioni cardiovascolari (vedi oltre), è fondamentale curare non solo i disturbi legati al glucosio, ma anche altri fattori di rischio per i disturbi cardiovascolari come la pressione alta ed i livelli elevati di colesterolo.

2.6 Complicazioni

A causa dell'alta frequenza di complicazioni, il diabete riduce fortemente le aspettative di vita. In seguito a disturbi legati ai piccoli vasi sanguigni (disturbi microvascolari), il diabete di tipo 2 rappresenta oggi la causa principale di perdita della vista negli adulti (retinopatia diabetica), di insufficienza renale (nefropatia diabetica), e di amputazione (piede diabetico) nel mondo industrializzato. La complicazione microvascolare più comune è la neuropatia diabetica, un disturbo che interessa in genere i nervi sensoriali distali, alterando la percezione della vibrazione, della temperatura e del dolore nei piedi e nelle mani. Negli stadi più avanzati, la neuropatia diabetica può essere caratterizzata da dolore intenso.

Il diabete di tipo 2 è inoltre spesso associato a complicazioni che interessano i vasi sanguigni più grandi (disturbo macrovascolare), e ad un aumento da due a cinque volte del rischio di disturbi cardiovascolari, che si manifestano principalmente sotto forma di infarto e ischemia.

3 Terapia classica del diabete

Il diabete è una malattia cronica e allo stato attuale non esistono terapie efficaci che possano condurre ad una guarigione definitiva.

La terapia ha quindi soprattutto un significato di prevenzione delle gravi complicanze che, se non si tiene il diabete sotto controllo, possono portare a gravi disfunzioni ed alla morte del paziente.

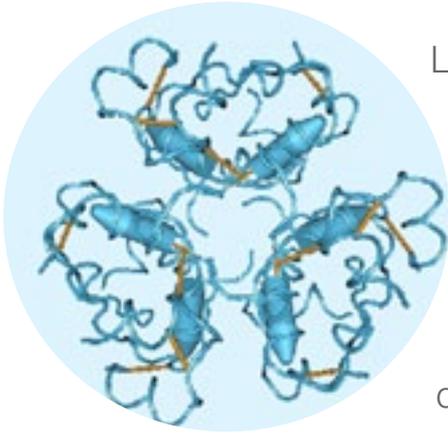
La terapia del diabete mellito giovanile insulino-dipendente è “sostitutiva”: ciò significa che viene somministrata insulina dall'esterno. Dalla scoperta dell'insulina nel 1922 sono stati fatti numerosi progressi dapprima nell'estrazione dal pancreas animale e successivamente nella produzione sintetica in laboratorio. Nel tempo si sono dunque utilizzate diverse terapie sostitutive a base di insulina: la terapia classica con insulina animale e, partire dagli anni '70, la terapia con insulina umana ricombinante.

3.1 Terapia con Insulina animale

Dopo la sua scoperta, l'insulina è stata a lungo isolata da tessuti animali attraverso procedure di estrazione e di purificazione per consentire il suo utilizzo come farmaco per la cura del diabete. In seguito i ricercatori, spinti dalla necessità di trovare fonti alternative di insulina capaci di rispondere alla crescente richiesta da parte dei pazienti diabetici, hanno pensato di produrre insulina umana attraverso due semplici strategie: la prima consisteva nel sintetizzare chimicamente insulina umana a partire dai singoli aminoacidi (processo fattibile ma molto dispendioso) e la seconda consisteva nel convertire l'insulina di maiale in insulina umana attraverso la sostituzione di un aminoacido. Seguendo quest'ultima strategia, l'azienda farmaceutica Novo Nordisk A/S negli anni '70 cominciò a produrre insulina “semisintetica” sostituendo un residuo di alanina sulla catena B con una treonina.

Attività I – Bioinformatica

Evoluzione molecolare e Insulina



L'obiettivo di questo percorso di bioinformatica è di condurre lo studente nel mondo dei database proteomici, per ricercare le sequenze dell'insulina umana e di altri vertebrati, confrontarle, al fine di stabilire i legami filogenetici tra le specie considerate e arrivare così a stabilire da quale animale sia più utile estrarre questo ormone per curare il diabete umano. Una parte del percorso è stata costruita rielaborando e sviluppando materiale di bioinformatica dal sito <http://www.gtac.edu.au>.

Al.1 Principali siti di riferimento

www.expasy.org

ExPASy, ossia “**Expert Protein Analysis System**”, è un server per la Proteomica del SIB (Swiss Institute of Bioinformatics), dedicato alla biologia molecolare, con un'enfasi particolare all'analisi di sequenze e strutture proteiche. Creato nell'agosto 1993, è uno dei primi server per la biologia sul web. Da allora è stato costantemente modificato e migliorato. Esso consente di muoversi in una serie di database prodotti a Ginevra, come Swiss-Prot, PROSITE, SWISS-2DPAGE, SWISS-3DPAGE, ENZYME, così come in altri database, come EMBL/GenBank/DDBJ, OMIM, Medline, FlyBase, ProDom, SGD, SubtiList, etc. Inoltre consente l'accesso a molti strumenti analitici per l'identificazione delle proteine, l'analisi della loro sequenza e la predizione della loro struttura terziaria. **ExPASy** offre anche molti documenti relativi a questo campo di ricerca, con links alle principali fonti d'informazione nel web.

In particolare il database Swiss-Prot (www.expasy.org/sprot) è una raccolta molto curata di sequenze proteiche che cerca di fornire informazioni di alto livello (come la descrizione della funzione di una proteina, la sua struttura, le sue modifiche post-traduzionali, varianti, etc.), mantenendo al minimo le informazioni ridondanti e un alto livello di integrazione con altri database.

<http://workbench.sdsc.edu>

Il **Biology WorkBench** è un'interfaccia che consente a chiunque di usare prontamente vari strumenti bioinformatici, per ricerca, insegnamento, apprendimento. È disponibile dal giugno 1996. Esso permette di collegarsi ai database accessibili dal web per raccogliere dati e di utilizzarli attraverso i diversi programmi d'applicazione disponibili. Ha il vantaggio d'avere un'interfaccia molto semplice, riducendo molti passaggi di trattamento dei dati a un rapido "point and click". La presente versione contiene una vasta gamma di database e strumenti di calcolo, che sono i più utili in biologia molecolare per capire le relazioni tra sequenze di proteine e acidi nucleici.

www.ncbi.nlm.nih.gov

L'**NCBI** (National Center for Biotechnology Information), sorto nel 1988, crea database pubblici, conduce ricerche in bioinformatica, sviluppa software per analizzare dati genomici e divulga informazioni biomediche. L'obiettivo è una migliore comprensione dei processi molecolari riguardanti la salute umana e le malattie. Sul sito si trovano anche dati relative al genoma umano e di altri organismi, a sequenze nucleotidiche e aminoacidiche, a strutture molecolari, a pubblicazioni scientifiche (come "PubMed", la principale banca dati bibliografica, pubblica e gratuita, del settore biomedico). In particolare **NCBI – Entrez** comprende un database di strutture biomolecolari 3-D determinate sperimentalmente: **MMDB**, ossia Molecular Modeling DataBase.

Tali strutture sono ottenute principalmente con cristallografia a raggi X e spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR); forniscono informazioni sulla funzione biologica, la storia evolutiva e le relazioni tra le macromolecole. Il database è ovviamente più piccolo rispetto ai database proteici o nucleotidici (solo di una frazione delle proteine note si è determinata la struttura 3-D), ma molte proteine possono considerarsi omologhe a quelle presenti.

AI.2 Ricercare le sequenze aminoacidiche

- Andare sul sito: www.expasy.org/sprot

Nella schermata, individuare la sezione **Access to the UniProt Knowledgebase**: UniProt (Universal Protein Resource) è il catalogo mondiale più completo per quanto riguarda le informazioni sulle proteine. È un archivio centrale di sequenze e funzioni proteiche, creato unendo le informazioni contenute in Swiss-Prot, TrEMBL (ossia Translated EMBL, il database ottenuto dalla traduzione delle informazioni genetiche contenute nel database dell'EMBL) e PIR (Protein Information Resource, una risorsa bioinformatica pubblica e integrata, per la ricerca genomica e proteomica, presso il Georgetown University Medical Center-GUMC).

- Cliccare su **SRS** (Sequence Retrieval System).



- Quindi cliccare su **Start** (Start a new SRS session).



- A questo punto bisogna creare una “query” per cercare le sequenze aminoacidiche dell’insulina in diversi animali. È necessario scegliere in quale database cercare: selezionare SWISS-PROT e TREMBL e poi cliccare **Continue**.
- Nella prima casella in alto a sinistra scegliere **GeneName** e accanto scrivere “ins”, per insulina.
- Nella seconda riga scegliere **Organism** e scrivere accanto “chordata”.
- Controllare che alla voce “Entry List in chunks of” sia selezionato “200”. Quindi cliccare su **Do Query**.



- Comparirà una lista con numerose proteine appartenenti a diversi animali: bisogna selezionare solo quelli che interessano (attenzione, compaiono anche proteine diverse dall'insulina, contenenti il testo "ins" nel loro "Gene Name"!). Le proteine che ci interessano hanno la sigla INS seguita dalla sigla della specie animale. Ad esempio possiamo selezionare: INS1_MOUSE, INS_CHICK, INS_HORSE, INS_HUMAN, INS_HYDCO, INS_MYXGL, INS_ONCKE, INS_PANTR, INS_PIG, INS_RABIT, INS_SHEEP, INS_BOVIN (per le singole specie vedere Appendice I). Quindi alla voce "Perform operation on" scegliere **selected**, poi selezionare **FastaSeqs** alla voce "with" e cliccare **Save**.



- Compare una schermata di conferma. Cliccare di nuovo su **Save** dopo aver verificato che alla voce "Use view" ci sia **FastaSeqs** (nel caso riselezionarlo).



- A questo punto compare l'elenco delle sequenze aminoacidiche per ogni proteina scelta. Copiare il testo su un file .txt e salvare (ad es. col nome "Ins_sequences"). Per i simboli degli aminoacidi, vedere [Appendice II](#).

```

->INS1_MOUSE
MALLVWFLFLALLALWESKPTQAPVWQLQGNLVEALYLVQGEROFFYTFEASREVEE
PQVQLQELGGSPQISGLTALAIEVAIGKGTIVQCCSTIICLVQLERICH
->INS_BOVIN
MALNTEFLFLALLALWSPFRAAPVWQLQGNLVEALYLVQGEROFFYTFEASREVEE
PQVQLQELGGSPGAGLEKIFPQKQKIVQCCAPFCLQLERICH
->INS_CHICK
MALNTEFLFLALLALWSPQTFYAAAPVWQLQGNLVEALYLVQGEROFFYTFEASREVEE
PLPSTELGKGAIVLFPQKQKIVQCCSTIICLVQLERICH
->INS_HORSE
FVSKLQGNLVEALYLVQGEROFFYTFEASREVEEQQKQKIVQCCAPFCLQLERICH
->INS_HUMAN
PQVQLQELGGSPQISGLTALAIEVAIGKGTIVQCCSTIICLVQLERICH
->INS_MUNGUS
MALNTEFLFLALLALWSPFRAAPVWQLQGNLVEALYLVQGEROFFYTFEASREVEE
LQVQLQELGGSPGAGLEKIFPQKQKIVQCCSTIICLVQLERICH
->INS_MYDCO
VFTQKQKIVQCCSTIICLVQLERICH
->INS_MYXGL
MALNTEFLFLALLALWSPFRAAPVWQLQGNLVEALYLVQGEROFFYTFEASREVEE
LQVQLQELGGSPGAGLEKIFPQKQKIVQCCSTIICLVQLERICH
->INS_ONCKE
TQALAAFLFLAIAIHESQKQKIVQCCSTIICLVQLERICH
->INS_PANTR
MNFVCAALFLVALLALWSPQTFYAAAPVWQLQGNLVEALYLVQGEROFFYTFEASREVEE
LQVQLQELGGSPGAGLEKIFPQKQKIVQCCSTIICLVQLERICH
->INS_PIG
MALNTEFLFLALLALWSPFRAAPVWQLQGNLVEALYLVQGEROFFYTFEASREVEE
LQVQLQELGGSPGAGLEKIFPQKQKIVQCCSTIICLVQLERICH
->INS_RABIT
MALNTEFLFLALLALWSPFRAAPVWQLQGNLVEALYLVQGEROFFYTFEASREVEE
LQVQLQELGGSPGAGLEKIFPQKQKIVQCCSTIICLVQLERICH
->INS_SHEEP
MALNTEFLFLALLALWSPFRAAPVWQLQGNLVEALYLVQGEROFFYTFEASREVEE
PQVQLQELGGSPGAGLEKIFPQKQKIVQCCAPFCLQLERICH

```

AI.3 Confrontare le sequenze aminoacidiche

- Aprire il sito: <http://workbench.sdsc.edu>. Prima è necessario registrarsi (la registrazione è gratuita), quindi cliccare su **Register**.



- Dopo aver compilato le voci richieste, cliccare di nuovo **Register**.

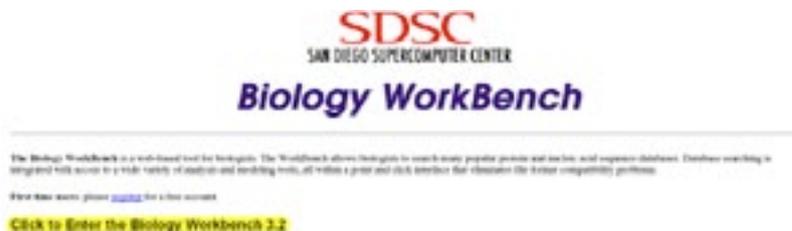
Biology WorkBench

User Registration

Please supply the requested confidential information

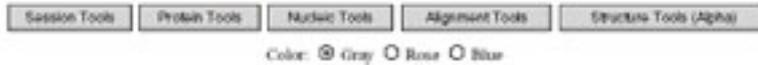
Full Name:	<input type="text"/>
eMail Address:	<input type="text"/>
User ID: <small>Single word (alphanumeric characters only)</small>	<input type="text"/>
Password:	<input type="password"/>
Password: (again)	<input type="password"/>

- Tornando alla pagina iniziale, selezionare **Click to Enter the Biology Workbench**, inserire la propria User ID e password ed entrare.

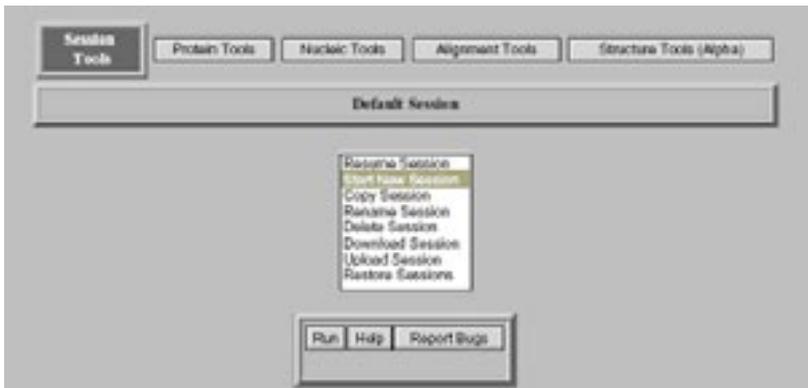


- Nella nuova pagina, scorrere verso il basso e cliccare su **Session Tools** (nota: è anche possibile scegliere il colore dello sfondo, grigio, rosa o blu).

Setting up [Helper Applications](#) used by the Biology WorkBench 3.2.



- Nell'elenco che compare nel riquadro bianco scegliere **Start New Session** quindi cliccare **Run**.



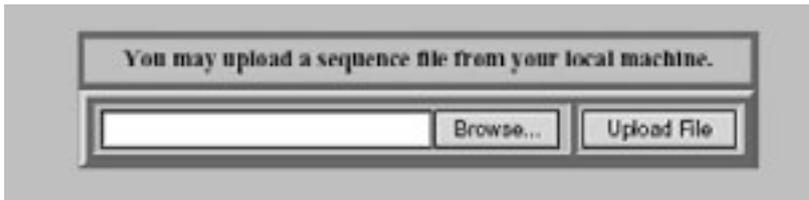
- Dare il nome alla nuova sessione (ad es. "Insulina") e cliccare di nuovo **Start New Session**.



- Di nuovo si ripresenterà la pagina precedente con il nome della nuova sessione e la data. A questo punto cliccare su **Protein Tools**. Dalla lista che compare nel riquadro bianco scegliere **Add New Protein Sequence** e poi **Run**.



- Alla voce Sfoglia (=Browse) cercare il file salvato precedentemente (Insulin_sequences.txt), selezionarlo in modo che compaia nella casella e quindi cliccare **Upload File**.



- Le sequenze dovrebbero in questo modo essere state importate, una ad una, in Workbench (verificare scorrendo verso il basso). Quindi cliccare **Save**.



- A questo punto la pagina iniziale di “Protein Tools” è aggiornata col nome della sessione e le sequenze aminoacidiche importate. Prima di tutto proveremo a confrontare due sequenze, ad esempio quella dell’uomo e del pollo. Bisogna pertanto selezionarle spuntando la casella al lato del nome. Nel riquadro centrale bianco, scorrere fino a trovare la voce: **CLUSTALW – Multiple Sequence Alignment** e selezionarla. Quindi cliccare **Run**.



- La pagina successiva mostrerà le sequenze selezionate: confermare che siano quelle scelte cliccando **Submit**. Diversamente tornare alla schermata precedente e ripetere la selezione.

- Nella nuova schermata scorrere verso il basso fino alla voce “Sequence alignment”. Gli aminoacidi indicati in blu sono quelli conservati nelle sequenze delle due specie: il simbolo utilizzato è un asterisco (*). In verde (simbolo “:”) sono indicate differenze che non influenzano la struttura dell’insulina. In blu scuro (simbolo “.”) sono indicate differenze di aminoacidi che hanno effetto sulla struttura della molecola. Infine in nero (nessun simbolo) sono indicati aminoacidi differenti in ciascuna specie.

```

Sequence alignment

Consensus key (see documentation for details)
* - single, fully conserved residue
: - conservation of strong groups
. - conservation of weak groups
- no consensus

CLUSTAL W (1.81) multiple sequence alignment

INS_HUMAN  MALMWRLLPLLLALLALWGFDPAAAFVQNHLGGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAED
INS_CHICK  MALWIRSLPLLLALLLVFSGPQTSYAAANQHLGGSHLVEALYLVCGERGFFYSKARRDVEQ
          *****. : * .*****

INS_HUMAN  LQVGVQVELGGGPGAGSLQFLALEGSLQKRGIVEQCCTSIICSLYQLENYCN
INS_CHICK  PLVSS-PLRGEAGVLPFQCEEYEK--VVRGIVEQCCHNTCSLYQLENYCN
          *.. * * . * . : * * *****

```

Domande

- 1) Considera l’insulina umana: la catena A è formata da 21 aminoacidi, la B da 30 aminoacidi. Nella sequenza data, ci sono effettivamente 51 aminoacidi in tutto?
- 2) Inizialmente infatti l’insulina viene sintetizzata in una forma detta “preproinsulina”, un polipeptide di 110 aminoacidi, in cui vi sono sequenze in più, che in seguito saranno eliminate: una sequenza “pre” aminotermine (peptide segnale, 24 aa) che consente la secrezione della proteina, e una sequenza “pro” (peptide C) che determina il corretto ripiegamento del filamento polipeptidico. Nel polipeptide considerato esse si trovano in quest’ordine: peptide segnale – catena B – peptide C – catena A. Individua, nella sequenza aminoacidica dell’uomo e del pollo, i diversi segmenti.

```

INS_HUMAN  MALMWRLLPLLLALLALWGFDPAAAFVQNHLGGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRREAED
INS_CHICK  MALWIRSLPLLLALLLVFSGPQTSYAAANQHLGGSHLVEALYLVCGERGFFYSKARRDVEQ
          *****. : * .*****

INS_HUMAN  LQVGVQVELGGGPGAGSLQFLALEGSLQKRGIVEQCCTSIICSLYQLENYCN
INS_CHICK  PLVSS-PLRGEAGVLPFQCEEYEK--VVRGIVEQCCHNTCSLYQLENYCN
          *.. * * . * . : * * *****

```

- 3) Qual è la percentuale di conservazione nei diversi segmenti? Completa la tabella:

	peptide segnale		catena B		peptide C		catena A	
	n° *	%	n° *	%	n° *	%	n° *	%
INS_HUMAN VS INS_CHICK								

- 4) Quali sequenze sono maggiormente conservate? Quali meno? Che considerazioni puoi fare?
- 5) Perché pensi siano stati inseriti dei trattini (-) nell'allineamento della sequenza *INS_CHICK*? Quale può essere l'interpretazione dal punto di vista evolutivo?
- 6) Puoi confrontare la sequenza dell'insulina umana con quella di un altro animale scelto. Ad esempio *INS_HUMAN* vs *INS_PANTR*, oppure *INS_HUMAN* vs *INS_PIG*, etc. Anche in questi casi determina la percentuale di conservazione dei diversi segmenti.

- A questo punto proviamo a confrontare fra di loro tutte le sequenze aminoacidiche di insulina che abbiamo a disposizione. Cliccare sul tasto **Return** per ritornare alla pagina iniziale di "Protein Tools". Spuntare tutte le sequenze, selezionare **CLUSTALW – Multiple Sequence Alignment** e quindi **Run**.
- Nella schermata successiva, controllare che siano confermate le sequenze scelte e cliccare **Submit**.
- Nella nuova schermata, scendere fino al "Sequence alignment" e rispondere alle domande.

Domande

- 7) In diverse regioni delle sequenze non vi è conservazione di aminoacidi tra le varie specie. A quali segmenti corrispondono?
- 8) In quali tratti della catena polipeptidica invece compaiono gli asterischi?
- 9) Che considerazioni puoi fare a riguardo?
- Scorrere verso il basso per osservare ora la sezione "Clustal W Dendrogram". In base alle differenze nelle sequenze aminoacidiche, il programma costruisce degli alberi filogenetici (dendrogrammi). In un albero filogenetico si distinguono "rami", che si sviluppano a partire da "nodi" (un punto di divergenza evolutiva da un antenato comune) e che terminano in "foglie", che corrispondono alle sequenze presenti nei singoli taxa.

La lunghezza dei “rami” indica il tempo trascorso da un evento di divergenza. Esistono due tipi di alberi filogenetici: “rooted tree”, ossia “con radici” e “unrooted tree”, ossia “senza radici”. Nel primo caso si prende un evento, evolutivamente molto distante rispetto agli altri, come punto di partenza (la “radice”); nel secondo caso questo riferimento manca e l’albero può essere utile per esaminare la distanza filogenetica di gruppi definiti di organismi. Osservando l’albero filogenetico ottenuto, rispondere alle successive domande.

Domande

10) Esaminando l’albero “unrooted”, quali due specie risultano più vicine filogeneticamente? Spiega il motivo della tua scelta.

11) La lunghezza dei “rami” dà un’idea della distanza evolutiva: dopo aver stampato il dendrogramma e usando un righello, indica la distanza evolutiva in mm tra l’uomo e gli altri animali:

- uomo e cavallo:
- uomo e chimera:
- uomo e coniglio:
- uomo e maiale:
- uomo e missina:
- uomo e mucca:
- uomo e pecora:
- uomo e pollo:
- uomo e salmone:
- uomo e scimpanzè:
- uomo e topo:

12) L’insulina della pecora è più strettamente vicina a quella del pollo o dell’uomo?

13) Che relazione evolutiva c’è tra l’insulina di maiale, pecora e mucca?

14) Commenta il significato di questi risultati sulla base delle tue conoscenze.

- A questo punto, scendere in fondo alla pagina e cliccare su **Import Alignments**.



- Spuntare la casella a sinistra di **CLUSTALW – Protein** e quindi selezionare, nel riquadro centrale bianco, **DRAWGRAM – DRAWGRAM – Draw Rooted Phylogenetic Tree from Alignment**. Cliccare su **Run**.



- Nella schermata successiva, confermare con **Submit**. A questo punto comparirà un albero filogenetico “rooted”, in base al quale rispondere alle successive domande.

Domande

- 15) Quale specie è più affine alla mucca? Quale più affine al salmone?
- 16) Osserva le coppie “scimpanzè-uomo”, “salmone-missina”, “pecora-mucca”. Si tratta di coppie di animali differenziate ciascuna da un unico “nodo”. Quali differenze puoi notare nelle divergenze di queste coppie?
- 17) Il termine “omologia” indica una caratteristica o una struttura che in due o più specie si è differenziata a partire da un antenato comune. Allo stesso modo “omologia di sequenza” si riferisce alle somiglianze tra le sequenze nucleotidiche nel DNA o tra le sequenze aminoacidiche nelle proteine. Indica le due specie che condividono il più alto grado di omologia per l’insulina.
- 18) Nota: è importante capire che questi alberi filogenetici generati usando strumenti bioinformatici sono basati solo su dati relativi a singole sequenze nucleotidiche o aminoacidiche. Oltre all’omologia di una sequenza, bisogna usare altri metodi per determinare le relazioni evolutive tra le specie. Ne sai indicare qualcuno?

A questo punto ritorniamo al quesito iniziale di questo percorso: **quale animale scegliere per estrarre insulina il più possibile simile a quella umana, da usare nella cura del diabete?**

Domande

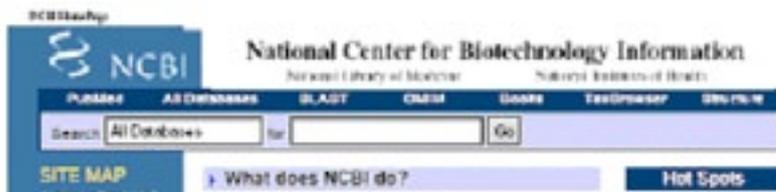
- 19) Basandoti sull’omologia di sequenza dell’insulina, quale specie animale riterresti più adatta per estrarre questo ormone?

20) Pensi che l'utilizzo di questo animale, possa avere implicazioni etiche e commerciali (considera se si tratta di una specie diffusa, facilmente allevabile, che non sia protetta, etc.)?

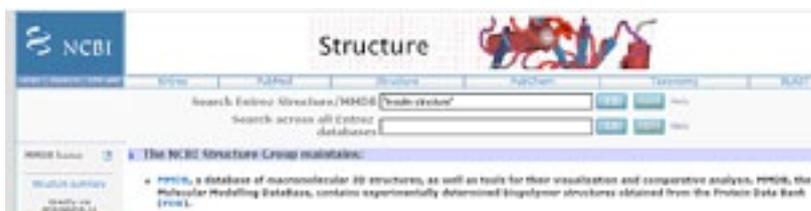
21) Sulla base di queste considerazioni, e tenendo conto anche dell'omologia, quale animale potrebbe allora essere un "donatore" ideale?

AI.4 Visualizzare la struttura tridimensionale

- Esistono anche database per le strutture tridimensionali delle proteine. Andare sul sito: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> e selezionare **Structure** dalla barra blu in alto.



- Nella nuova schermata, alla voce "Search Entrez Structure/MMDB" bisogna inserire la proteina di cui si vuole visualizzare la struttura (in questo caso scrivere tra virgolette "insulin structure") e cliccare su **GO**.



- Dalla ricerca si ottengono diversi modelli, ciascuno identificato da una sigla (ad es. **2AIY**). Usando il programma Cn3D (scaricabile gratuitamente dal sito) è possibile visualizzare la struttura 3-D delle proteine. Cliccando sulla sigla e su "**Related Structures**" si ottengono informazioni aggiuntive come:



- l'articolo scientifico di riferimento (**Reference**): è importante visualizzarlo perché sono specificati il tipo di insulina (ricombinante o no), la tecnica usata e le condizioni in cui è stata analizzata la struttura tridimensionale della proteina (a volte è specificato infatti che l'ormone si trova in soluzione con qualche altra sostanza, es. fenolo, che compare poi nell'immagine della struttura);

- informazioni sulle catene polipeptidiche che saranno visualizzate (*Biopolymer chains page*); mettendo il cursore sulle diverse catene appare il numero di aminoacidi; inoltre la catena è messa in relazione con la famiglia proteica a cui appartiene (sequenza rossa). Ad esempio l'insulina appartiene alla famiglia "IGF_like family" (famiglia di proteine simili all'"Insulin like Growth Factor"), nel sottogruppo "insulina- simile", specifico dei vertebrati. Dal sito si apprende che questa famiglia comprende l'insulina e i fattori di crescita insulina-simili I e II, in generale peptidi con diverse funzioni in processi di controllo come metabolismo, crescita, differenziazione e riproduzione; a livello cellulare essi controllano il ciclo cellulare, l'apoptosi, la migrazione cellulare e la differenziazione. Ad eccezione dell'Insulin like Growth Factor, le forme attive di questi ormoni proteici sono formate da due catene (A e B) legate da due ponti disolfuro. In particolare nella catena A si conserva in tutti i membri della famiglia la posizione di quattro residui di cisteina: Cys1 forma un ponte disolfuro interno alla catena con la Cys3, mentre Cys2 e Cys4 si legano ai residui di cisteina della catena B. In tutti i casi le due catene si formano a partire da un propeptide;
- indicazione del solvente eventualmente presente, alla voce *Ligand* (es. fenolo).

The screenshot displays the NCBI MMDB Structure Summary for entry 2AIY. It includes the following information:

- Reference:** O'Donoghue SI, Chang X, Alsecher R, Niggli M, Led AJ. [Symmetric hexamer: calculation of the 3D human insulin structure](#). *J. Biomol. NMR* 18, p.93-108. [Reference]
- Description:** DE Human Insulin Hexamer (Symmetric), Nmr, 2D Structure.
- Deposition:** 19981208
- Author:** O'Donoghue SI, Chang X, Alsecher R, Niggli M, Led AJ
- Taxonomy:** [Homo sapiens](#)
- MMDB:** [12675](#) **POB:** [2AIY](#) **Structure Neighbors:** [VAST](#)

Below the summary, there are buttons for 'View 3D Structure' and 'Structure/Sequence Viewer'. The 'Biopolymer chains page' section shows a sequence alignment viewer with two chains (Chain 1 and Chain 2) and their corresponding amino acid sequences.

- Cliccando direttamente sull'immagine, viene visualizzata la struttura 3D dell'insulina (**2AIY – Cn3D 4.1**) e, in un altro riquadro, le sequenze aminoacidiche delle catene rappresentate (**2AIY – Sequence/Alignment Viewer**). Nello specifico, l'immagine scelta **2AIY** riporta la struttura 3D di un esamero, ossia un complesso molecolare ottenuto dall'associazione di sei monomeri d'insulina, ciascuno formato dalle catene A e B; il complesso, avendo simmetria trigonale, può anche essere interpretato come l'associazione di tre dimeri di insulina.
- Spontandosi col mouse su un punto qualsiasi della figura e tenendo premuto il tasto sinistro si può ruotare a piacere l'immagine.

- Sono possibili diverse opzioni:
 - andando su **Style_Rendering Shortcuts** si sceglie il tipo di modellizzazione (a sfere e bastoncini, a tubi, etc). Selezionando *worms* si ha una struttura “vermiforme” facilmente interpretabile.
 - andando su **Style_Coloring Shortcuts** si sceglie il criterio di colorazione: *Secondary Structure* evidenzia con colori diversi le strutture ad alfa elica o a foglietto ripiegato; Molecole associa a ciascuna catena polipeptidica un colore diverso; *Hydrophobicity* evidenzia le zone idrofile e idrofobiche, *Charge* le cariche, etc.
 - Con **Style _ Favorites _ Add/Replace** si può salvare con nome l’immagine tra i preferiti (comparirà nella tendina in basso).
 - Con **Style _ Edit Global Style** si ha una visione complessiva delle impostazioni ed è possibile modificarle: in *Settings* si modifica il tipo di modellizzazione, i colori di catene e sfondo, si decide se visualizzare o meno molecole estranee (esempio ioni zinco, fenolo, etc) o gli oggetti che evidenziano la struttura secondaria, i ponti disolfuro. Per prendere familiarità, selezionare e deselezionare queste voci, osservando le variazioni nell’immagine. In *Labels* è possibile visualizzare i nomi degli aminoacidi (alla voce “Spacing” si sceglie se scrivere un nome ogni uno, due, tre, ... aminoacidi). In Details si modificano le dimensioni del tipo di modellizzazione scelta (ad esempio il diametro della struttura “vermiforme”).
 - Alla voce **Show/Hide _ Pick Structures** ... si decide se visualizzare tutte le catene, oppure solo alcune. Può essere utile per identificare quali sono le catene A e B di ciascun monomero.
 - Con **View _ Animation _ Spin** si fa partire la rotazione automatica del modello.
- Si propone la seguente esercitazione.

Domande

22) Nella figura 2AIY selezionare *Style _ Coloring Shortcuts* e scegliere la modalità di colorazione molecole. Con *Show/Hide _ Pick Structures* ... visualizzare solo un singolo monomero di insulina (catene A e B), mentre usando *Style _ Edit Global Style* eliminare le molecole estranee e gli oggetti indicanti l’alfa elica. Orientare il monomero in modo da averne una visione comoda. Dal riquadro 2AIY - Sequence/Alignment Viewer selezionare gli ultimi 3 aa della catena B (P-K-T, ossia prolina-lisina-treonina): nell’immagine essi saranno evidenziati in giallo. Senza chiudere l’immagine, tornare a <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/> per cercare la struttura di un’insulina ricombinante, ad esempio l’insulina Lyspro. Per farlo si potrebbe inserire nella ricerca „Lys pro - human insulin“ (tra virgolette). Compaiono diverse molecole d’insulina mutanti, quella che ci interessa ha la sigla 1LPH: Lys(B28)pro(B29)-Human Insulin, ossia un’insulina umana ricombinante ottenuta mettendo un residuo di lisina in posizione 28 nella catena B e uno di prolina in posizione 29 sempre nella catena B. Aprire l’immagine 3-D,

4 Terapia con Insulina ricombinante

L'utilizzo di insulina animale, oltre a non soddisfare la richiesta di ormone per uso terapeutico, generava in alcuni pazienti l'attivazione del sistema immunitario. La produzione di insulina semisintetica risolveva in parte il problema, poiché risultava comunque vincolata alla disponibilità di insulina di maiale di partenza. La possibilità di ottenere insulina umana in quantità illimitata avrebbe dunque avuto un enorme impatto sul mercato farmaceutico.

4.1 Verso l'Insulina ricombinante

Alcune fondamentali scoperte scientifiche durante lo scorso secolo hanno rivoluzionato l'approccio terapeutico utilizzato per il diabete ed hanno consentito di giungere alla produzione di insulina umana ricombinante.

4.1.1 Enzimi di restrizione

Nel 1962, Werner Arber, un biochimico svizzero, provò l'esistenza di quelle che egli chiamò "forbici molecolari", ossia di proteine in grado di tagliare il DNA. Arber dimostrò infatti che il batterio *E. Coli* possiede un sistema immunitario enzimatico in grado di riconoscere e distruggere DNA estraneo, e di modificare il DNA nativo per impedirne la degradazione. Arber ed i suoi colleghi (Daniel Nathans e Hamilton Smith) chiamarono questo gruppo di proteine enzimi di restrizione, e nel 1978 ricevettero il Premio Nobel in medicina per la scoperta. Essi mostrarono inoltre che l'attività di questi enzimi è controllata: ciascun enzima infatti possiede una propria sequenza bersaglio (detta anche sequenza consenso o sito di restrizione), che riconosce e taglia.

4.1.2 Le ligasi

Poco dopo la scoperta di Arber, Arthur Kornberg identificò un meccanismo per saldare il DNA, un enzima che egli chiamò DNA ligasi.

Kornberg era impegnato nel tentativo di costruire DNA virale artificiale a partire da frammenti di DNA virale, ma fino ad allora non era stato in grado di sintetizzare molecole biologicamente attive. Una volta aggiunta la ligasi, invece, si accorse che l'enzima era in grado di saldare le estremità dei frammenti di DNA e di riformare i legami fosfodiesterici tra i nucleotidi.

Il DNA artificiale era indubbiamente attivo dal punto di vista biologico – esso infatti si riproduceva autonomamente – e per questo Kornberg fu accolto dalla comunità scientifica come lo scienziato in grado di "generare la vita in un tubo di laboratorio".

4.1.3 Il clonaggio

Alla fine degli anni '60 le tecniche per tagliare e saldare il DNA si erano ormai perfezionate. Ma gli scienziati erano ancora alla ricerca di un meccanismo per copiare il DNA in modo da ottenerne quantità sufficienti per lavorarci.

La scoperta arrivò nel 1971, quando alcuni scienziati misero a punto la trasformazione batterica, che consiste nel facilitare l'introduzione di piccole molecole circolari di DNA (chiamate plasmidi, Fig. 4.1) nei batteri (come *Escherichia Coli*, Fig. 4.2), processo che in natura avviene in misura minima. Ciò si ottiene modificando alcune proprietà chimico-fisiche delle membrane cellulari con l'impiego di sostanze chimiche (CaCl₂), associate a rapidi sbalzi di temperatura o di scariche elettriche ad alto voltaggio (elettroporazione); ne deriva così una temporanea permeabilizzazione delle cellule al DNA esogeno.

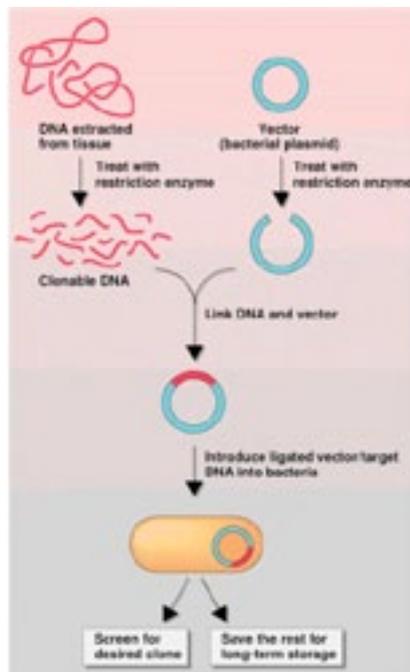


Fig. 4.3 Fasi del clonaggio (da www.courses.cm.utexas.edu)

I plasmidi sono strutture extracromosomiche che si trovano in natura in alcuni batteri e contengono geni che conferiscono ai batteri la resistenza agli antibiotici, sequenze di origine e termine della replicazione. Il DNA plasmidico può essere modificato inserendo segmenti di DNA estraneo in siti di inserimento appositamente creati sul plasmide. Una volta inserito nei batteri, il plasmide (e di conseguenza il DNA estraneo) viene rapidamente amplificato grazie alla elevata frequenza di replicazione dei batteri (Fig. 4.3).

4.1.4 La tecnologia del DNA ricombinante

Gli scienziati avevano ormai capito come tagliare, saldare e copiare il DNA. Già durante il periodo di perfezionamento di queste tecniche, essi avevano cominciato a pensare alle possibili applicazioni pratiche.

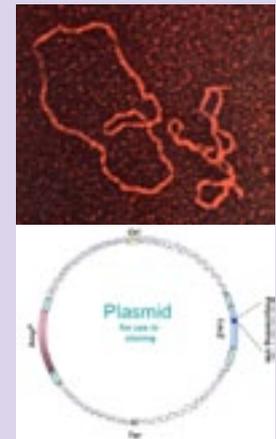


Fig. 4.1 in alto: Plasmidi (da www.gen.cam.ac.uk)
in basso: mappa di un plasmide (da www.langara.bc.ca)



Fig. 4.2 *Escherichia Coli* (da www.littletree.com)

Con il termine di DNA ricombinante (rDNA) si intende una sequenza di DNA ottenuta artificialmente dalla combinazione di materiale genetico proveniente da organismi differenti, come può avvenire per un plasmide contenente un gene d'interesse.

La tecnologia del DNA ricombinante si basa sulla scoperta (ad opera di Herbert W. Boyer e Stanley Cohen all'inizio degli anni '70) che i geni umani possono essere inseriti in plasmidi e quindi introdotti nei batteri, dove continuano ad essere attivati dando origine a proteine funzionali. Il DNA ricombinante ha inaugurato una nuova era in biologia. L'idea che il DNA continui a "funzionare" quando viene trasferito da un organismo ad un altro ha aperto la strada ad innumerevoli possibilità.

Nel 1976 le biotecnologie divennero realtà con il convergere di tutte le tecniche appena descritte in un unico esperimento volto alla produzione di una proteina umana a partire da DNA ricombinante (Fig.4.4). L'idea fu quella di utilizzare gli enzimi di restrizione per inserire il gene dell'insulina umana in un plasmide che fosse poi trasformato nei batteri. Facendo esprimere il gene umano nei batteri si sarebbero ottenute quantità illimitate di ormone.

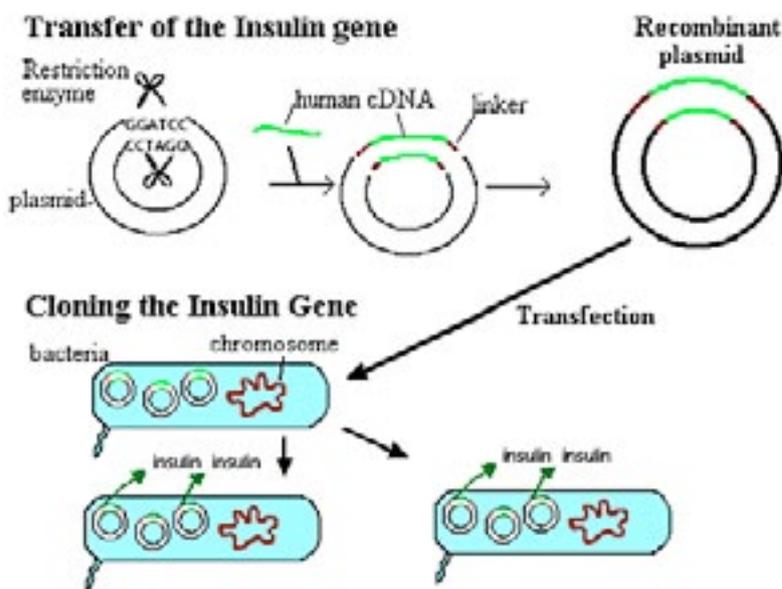


Fig. 4.4 Sintesi di insulina umana con la tecnica del DNA ricombinante (da www.accessexcellence.org)

L'insulina rappresentò il primo prodotto commerciale dell'industria biotecnologica: anziché quella estratta dal pancreas di maiale o di vitello ora i diabetici potevano ricevere un'insulina identica a quella normalmente prodotta dall'uomo.

In seguito alla scoperta del DNA ricombinante gli scienziati si trovarono a dover affrontare il problema della sicurezza di questa nuova tecnologia. La capacità di congiungere i geni avrebbe avuto lo stesso impatto della bomba atomica o del telescopio?

Queste problematiche furono discusse nel 1975 alla conferenza di Asilomar in California, dove scienziati, avvocati e media si confrontarono in un estenuante dibattito.

L'incontro si risolse con la diffusione di alcune linee guida che permettevano ai ricercatori di utilizzare solo alcuni tipi di batteri ritenuti "sicuri" e che imponevano restrizioni sull'utilizzo di DNA di mammifero tanto severe da potersi paragonare alle norme che oggi regolano l'utilizzo del virus Ebola.

Cinque anni dopo queste restrizioni furono corrette, permettendo un notevole avanzamento della ricerca sui mammiferi.

4.2 La sintesi di Insulina umana ricombinante

Negli anni '70 due aziende di biotecnologie – Genentech e Biogen – accettarono la sfida di sintetizzare insulina utilizzando la tecnologia del DNA ricombinante.

Nonostante l'idea fosse semplice, in realtà c'erano dei problemi sostanziali. Nessuno conosceva la sequenza nucleotidica dell'insulina umana e, come detto, in seguito alla conferenza di Asilomar erano state imposte severe restrizioni sulla produzione di DNA ricombinante umano.

Per ottenere la sequenza nucleotidica dell'insulina umana e successivamente trasferirla nei batteri, furono utilizzate due strategie. Alla fine solo una strategia e solo una delle due aziende si rivelarono vincenti.

4.2.1 Strategia della Genentech

Per sintetizzare insulina umana utilizzando la tecnologia del DNA ricombinante, era necessaria la sequenza del DNA dell'insulina. La sequenza aminoacidica dell'insulina era nota. Il gruppo di scienziati della Genentech dedusse la sequenza nucleotidica dell'insulina umana basandosi sulla sequenza aminoacidica. Partendo dai nucleotidi, i ricercatori furono poi in grado di sintetizzare la sequenza del DNA dell'insulina umana. La sequenza così generata fu poi inserita in un plasmide ed introdotta nei batteri, attraverso il processo di trasformazione, per produrre insulina.

In questo modo gli scienziati assemblarono la sequenza umana dell'insulina senza dover mai usare DNA umano, e questo permise loro di evitare alcune delle restrizioni applicate alla sintesi di DNA ricombinante umano derivate dalla conferenza di Asilomar.

4.2.2 Strategia della Biogen

Per ottenere insulina umana, Walter Gilbert ed il suo gruppo volevano isolare la sequenza del DNA che codifica per l'insulina umana. Essi conoscevano già la sequenza di insulina di ratto.

Le sequenze dell'insulina umana e di ratto sono molto simili. E' possibile quindi utilizzare la sequenza di ratto come sonda per isolare la sequenza umana. Per fare questo i ricercatori utilizzarono una "libreria" di sequenze di DNA umano racchiuse in batteriofagi. La sequenza di ratto venne marcata con radioattivo ed utilizzata come sonda per riconoscere il fago che contiene la sequenza di insulina umana.

A questo punto la sequenza di DNA poté essere isolata ed inserita nei batteri. Questa seconda strategia, seppur promettente, si rivelò purtroppo fallimentare poichè, a causa di una contaminazione nel corso degli esperimenti, la sequenza amplificata dagli scienziati non era quella dell'insulina umana, bensì quella di ratto.

4.3 La produzione di Insulina ricombinante

Per far sì che i batteri producano insulina, o qualsiasi altra proteina eucariotica, bisogna considerare alcuni fattori: i geni degli eucarioti (come l'uomo) contengono delle sequenze chiamate introni, che non codificano per nessuna proteina.

I batteri invece non hanno introni nei loro geni, di conseguenza non posseggono l'apparato biochimico necessario a rimuovere gli introni. C'è anche un altro fattore da considerare: alcune proteine eucariotiche vengono processate dopo la traduzione, è il caso ad esempio dell'insulina che viene inizialmente tradotta come preproinsulina e che, attraverso dei passaggi successivi di maturazione, raggiunge la sequenza e la conformazione finali. Nei batteri questi processi di maturazione non avvengono, per cui è stato necessario ricorrere a soluzioni alternative.

4.3.1 Insulina dai batteri

La produzione di proteine ricombinanti può avvenire in diversi sistemi: batteri, lieviti, cellule di insetto e di mammifero. Le cellule batteriche offrono il vantaggio della semplicità di manipolazione, di un ridotto tempo di replicazione e permettono di ottenere grandi quantità di prodotto a basso costo.

Per produrre insulina dai batteri gli scienziati hanno utilizzato due diversi metodi.

a) Metodo delle due catene

Questo fu il primo metodo utilizzato dalla Genentech in collaborazione con la Eli Lilly and Company. Innanzitutto, come detto, un filamento di DNA è stato sintetizzato sulla base della sequenza aminoacidica delle due catene – A e B. Dopodichè è stato utilizzato un enzima chiamato DNA polimerasi per sintetizzare il filamento complementare di DNA. In questo modo sono stati generati i due frammenti di DNA che devono essere inseriti nei plasmidi.

Ogni frammento è stato inserito in un plasmide all'interno del gene che codifica per la β -galattosidasi (LacZ), in modo tale che i batteri producano elevate quantità di proteine di fusione contenenti la sequenza dell'insulina attaccata di seguito all'estremità dell'enzima β -galattosidasi. Il plasmide contiene anche il gene che conferisce resistenza all'antibiotico tetraciclina. I plasmidi vengono trasformati nei batteri. La tetraciclina viene aggiunta per evitare che i batteri non trasformati possano crescere. I batteri trasformati crescono e la proteina di fusione β -galattosidasi-insulina viene raccolta e purificata. Le catene insuliniche vengono separate dalla β -galattosidasi attraverso un trattamento con bromuro di cianogeno, un prodotto chimico che taglia i legami peptidici successivi ai residui di metionina.

Poiché nel punto di passaggio tra la β -galattosidasi e le catene insuliniche delle proteine di fusione viene inserito il codone della metionina, il trattamento con bromuro di cianogeno produce catene integre di insulina, staccandole dalle proteine di fusione. Alla fine le due catene proteiche vengono mescolate ed in condizioni opportune si formano i ponti disolfuro, rendendo possibile la sintesi di insulina umana funzionale dai batteri.

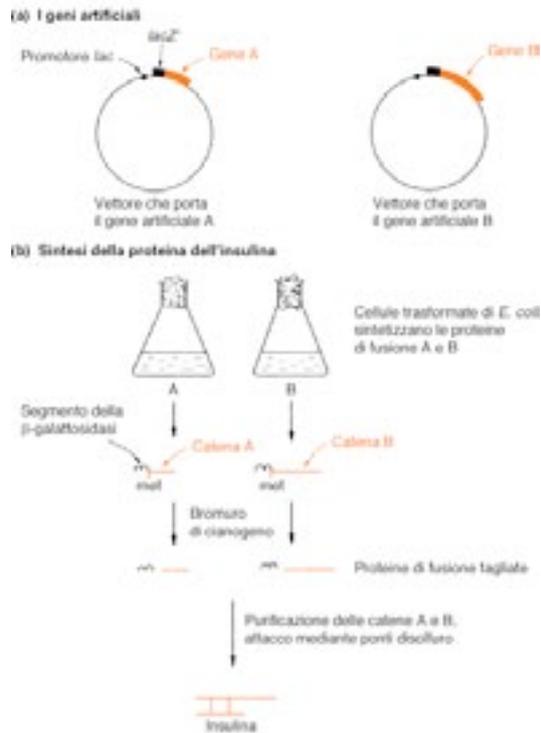


Fig. 4.5 Produzione di insulina ricombinante con il metodo delle due catene (da www.zanichelli.it)

b) Metodo della proinsulina

La strategia delle due catene è stata modificata in seguito con la produzione di un'unica proteina di fusione β -galattosidasi-insulina, che può essere tagliata in una sola tappa per rilasciare insulina matura. Questa tecnica consiste nel sintetizzare il cDNA della proinsulina a partire dall'mRNA, modificandone la sequenza con l'aggiunta di un codone all'estremità 5' che codifica per la metionina. Il cDNA modificato viene quindi inserito in un gene plasmidico (come LacZ, utilizzato anche nel metodo precedente) e amplificato nei batteri. La proinsulina prodotta dai batteri viene poi separata dall'enzima β -galattosidasi degradando il residuo di metionina. La catena di insulina viene quindi indotta al processo di ripiegamento che consente la formazione dei ponti disolfuro e il peptide C viene rimosso attraverso un taglio enzimatico che dà origine alla proteina matura.

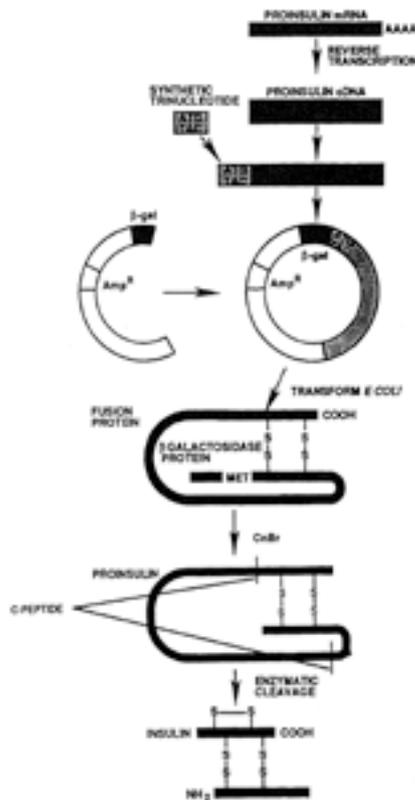


Fig. 4.6 Metodo della proinsulina (da Recombinant DNA - a short course; Watson JD et al, 1983)

4.3.2 Insulina dal lievito

Per semplificare il processo di purificazione dell'insulina, una volta che questa veniva prodotta all'interno dei batteri, gli scienziati pensarono di fare in modo che l'insulina fosse secreta direttamente nel mezzo di coltura. A tale scopo essi decisero di utilizzare i lieviti piuttosto che i batteri.

Il lievito è un eucariote, un organismo munito di nucleo, in grado quindi di effettuare i vari passaggi che permettono la maturazione dell'insulina umana. La sequenza della proinsulina viene inserita in un plasmide, ed il plasmide ricombinante trasformato nei lieviti. I lieviti possono a questo punto produrre proinsulina, la quale viene processata nel lievito analogamente a quanto succede nell'uomo (Fig. 4.7). La proinsulina si ripiega in una struttura a gomito ed i ponti disolfuro tra i residui di cisteina vengono formati normalmente. La sequenza di 33 aminoacidi viene rimossa normalmente generando la proteina matura. La Novo Nordisk S/A è stata la prima azienda ad ottenere proinsulina secreta dal lievito *Saccharomyces cerevisiae*.

Attualmente esistono diverse categorie di insulina: ultrarapida, pronta o rapida, ritardata, ultralenta e premiscelata. Esse si differenziano non per il principio attivo, che è lo stesso per tutte ed è rappresentato dall'insulina umana, ma per la velocità di assorbimento.

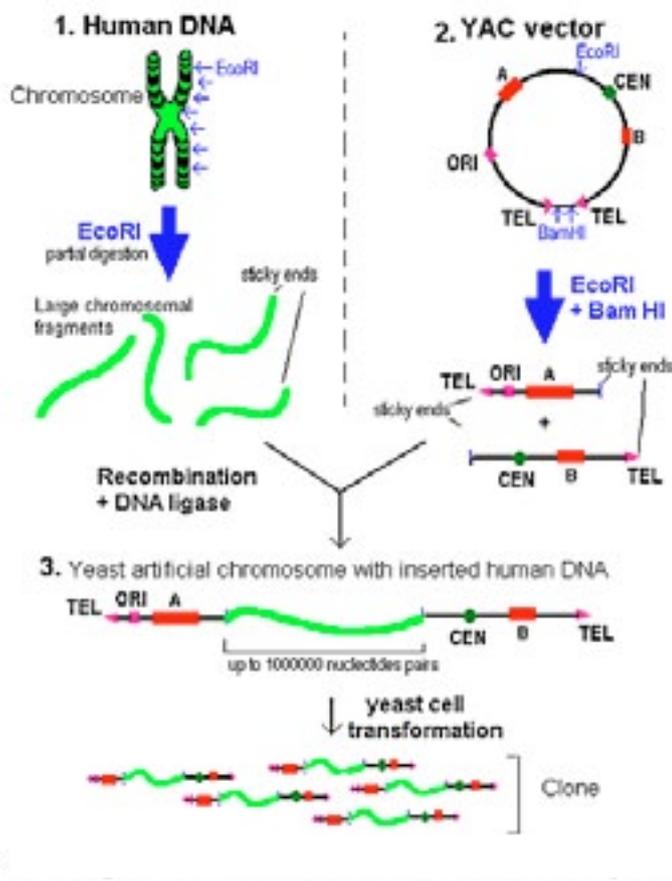


Fig. 4.7 Produzione di insulina dal lievito (da www.access Excellence.org)

Da un punto di vista clinico, monomeri e dimeri diffondono più rapidamente nel sangue rispetto alla forma ad esamero, quindi i preparati di insulina contenenti soprattutto esameri sono di assorbimento più lento. Per questo motivo la ricerca ha mirato ad ottenere molecole di insulina ricombinante in cui fosse minima la tendenza a formare dimeri ed esameri. È il caso dell'insulina "Lispro" o "insulina intelligente", ottenuta invertendo i residui di lisina e prolina in posizione C-terminale nella catena B (Fig. 4.8): questa modifica, pur non alterando il sito per il recettore, consente un più rapido assorbimento dell'ormone.

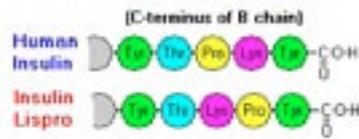


Fig. 4.8 Insulina Lispro (da www.minerva.unito.it)

Negli ultimi anni, migliorando le modalità di somministrazione dell'ormone, si sono impostati schemi terapeutici di trattamento più razionale. La possibilità di associare insuline con diversa durata d'azione permette il raggiungimento di un buon controllo glicemico. Fondamentale è il concetto di utilizzo dell'insulina ad azione rapida in corrispondenza dei pasti e di insulina ritardata per coprire il fabbisogno insulinico notturno ed eventuali periodi della giornata caratterizzati da iperglicemia.

Attività II – Biologia molecolare

Simulazione della sintesi di Insulina ricombinante

All.1 Introduzione

Questa attività ha lo scopo di ripercorrere le fasi cruciali che conducono alla sintesi dell'insulina ricombinante umana.

Il gene dell'insulina oggi può essere isolato dal genoma umano attraverso la tecnica chiamata Polimerase Chain Reaction (PCR).

Fino alla metà degli anni '80, come abbiamo visto, l'unico modo per ottenere delle copie di DNA consisteva nell'inserire diversi frammenti di DNA nei batteri e del selezionare il frammento desiderato tra innumerevoli colonie cresciute su una piastra. Nel 1985 Kary Mullis inventò un nuovo metodo estremamente preciso per selezionare ed amplificare un segmento di DNA – la PCR appunto – che gli valse il Premio Nobel per la Chimica nel 1993.

La PCR è una tecnica 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.

Una volta isolato, il gene dell'insulina può essere modificato alle due estremità attraverso l'inserzione di sequenze riconosciute da un enzima di restrizione; lo stesso enzima riconosce inoltre una sequenza specifica sul plasmide.

L'enzima di restrizione taglia in maniera specifica ed asimmetrica il plasmide e le estremità del gene dell'insulina, generando delle estremità coesive che facilitano l'inserzione del gene nel plasmide (Fig. All.1).

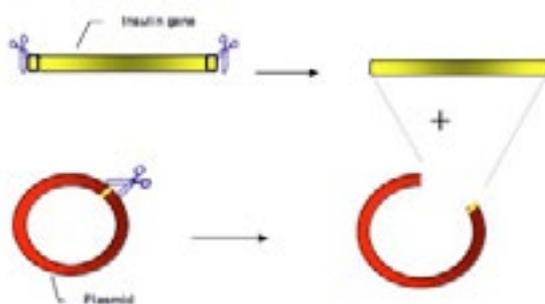


Fig. All.1 Sintesi del plasmide ricombinante

Il plasmide ricombinante viene quindi integrato nella cellula batterica (attraverso il processo di trasformazione, Fig. All.2) e contiene tutti gli elementi necessari per la trascrizione del gene dell'insulina che viene poi tradotto utilizzando il sistema di traduzione dei batteri.

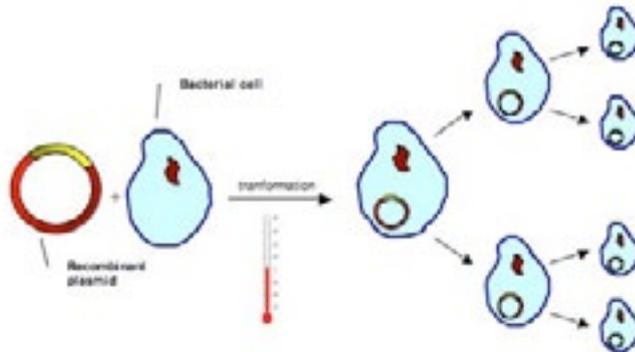


Fig. All.2 Integrazione del plasmide ricombinante nelle cellule batteriche

All.2 Protocollo

Per cominciare questa attività ogni gruppo riceverà un tubo (**TUBO A**) contenente i diversi plasmidi ricombinanti generati dall'integrazione del gene dell'insulina nel plasmide, dopo che questi sono stati digeriti con lo stesso enzima di restrizione.

Ci sono diverse possibilità di interazione tra plasmide e gene:

Caso 1 – il plasmide si è richiuso senza interagire con il gene

Caso 2 – il gene si è integrato nel plasmide ma nella direzione sbagliata

Caso 3 – il gene si è integrato nel plasmide nella giusta direzione

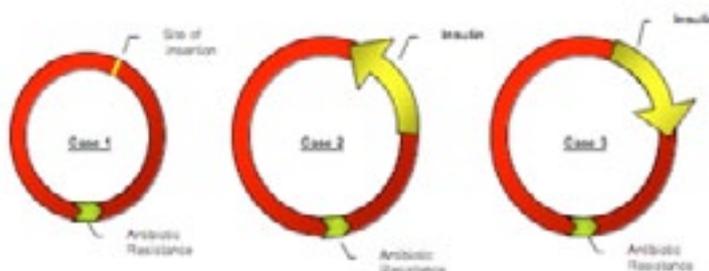


Fig. All.3 Possibilità di interazione tra gene e plasmide

Lo scopo della nostra attività è di selezionare il caso in cui il gene si è inserito correttamente nel plasmide. Solo in questo caso, infatti, sarà possibile ottenere la proteina funzionale.

Per selezionare il plasmide ricombinante corretto è necessario introdurre il prodotto dell'interazione tra gene e plasmide (contenente tutte le diverse combinazioni) nei batteri attraverso il processo di trasformazione. Durante questo processo alcune cellule batteriche permetteranno l'ingresso ad un plasmide ricombinante.

Per cominciare dunque ogni gruppo dovrà eseguire il processo di trasformazione batterica per introdurre i diversi plasmidi ricombinanti (**TU BO A**) nelle cellule batteriche (**TUBO B**).

1. Prendere 3µl dal TUBO A ed aggiungerli al TUBO B contenente 50 µl di batteri.
2. Agitare il tubo picchiettando con le dita ed incubare in ghiaccio per 30 min.

Il prossimo passaggio consiste nell'aumentare rapidamente la temperatura, per lasciare entrare i plasmidi nei batteri.

3. Dopo l'incubazione in ghiaccio trasferire il tubo a 42°C per 2 min.
4. Subito dopo trasferire il tubo nuovamente in ghiaccio per altri 2 min.
5. Aggiungere nel tubo 500µl di tampone LB ed incubare a 37°C in agitazione per 30 min, per aiutare la ripresa dei batteri trasformati dopo lo shock termico e dar loro il tempo di esprimere il gene che induce resistenza all'antibiotico.
6. Al termine dell'incubazione centrifugare il tubo a 3000 rpm per 1 min. Rimuovere 500µl del sovrantante. Mescolare bene il contenuto rimanente nel tubo con la pipetta.
7. Trasferire 50µl del contenuto del tubo su una piastra di agar (con Antibiotico) e distribuire sulla superficie della piastra con l'aiuto di un'ansa.
8. Incubare la piastra (capovolta) a 37°C tutta la notte.

Il plasmide contiene un gene che conferisce ai batteri la resistenza ad uno specifico antibiotico. Di conseguenza solo i batteri che avranno incorporato un plasmide saranno in grado di crescere in presenza di antibiotico.

Crescendo sulla piastra i batteri formano delle colonie composte da cellule identiche. Ogni colonia deriva da una diversa cellula di partenza, quindi ogni colonia contiene un diverso plasmide ricombinante. Il nostro scopo è trovare una colonia batterica contenente il plasmide con il gene inserito correttamente: queste cellule saranno in grado di produrre insulina ricombinante.

Il giorno seguente sarà possibile vedere quante colonie saranno cresciute sulle piastre in seguito alla trasformazione.

A questo punto potremo analizzare le colonie e selezionare quelle che hanno incorporato il plasmide ricombinante corretto durante il processo di trasformazione. Per fare questo è necessario far crescere le colonie separatamente e farle amplificare ulteriormente in sospensione.

9. Ogni membro del gruppo dovrà prelevare una colonia dalla piastra e trasferirla in un tubo contenente 3 ml di tampone LB con antibiotico.
10. Incubare i tubi a 37°C in agitazione tutta la notte per garantire n'ottimale crescita dei batteri.

Il giorno successivo, a partire da questa sospensione batterica si dovrà isolare e purificare il DNA plasmidico.

11. Versare 2 ml della sospensione batterica in un tubo da 2 ml.
12. Centrifugare a 14000 rpm per 30 sec per raccogliere le cellule.
13. Eliminare il sovrnatante.
14. Risospendere (con il vortex) il pellet di cellule in 300µl del tampone P1.
15. Aggiungere 300µl del tampone P2 e capovolgere lentamente il tubo per 3-5 volte.
16. Lasciare sul bancone per 5 min. 13. Eliminate the supernatant.

Il tampone P2 distrugge la membrana cellulare e l'RNA, in modo da isolare il DNA dai batteri. Inoltre questo periodo di incubazione assicura il rilascio del plasmide ricombinante dai batteri trattenendo il DNA cromosomico.

17. Aggiungere 300µl del tampone P3 ed agitare delicatamente il tubo.
18. Incubare in ghiaccio per 10 min.

Il tampone P3 provoca la precipitazione di tutti i detriti cellulari; il plasmide ricombinante rimane invece nel sovrnatante.

19. Centrifugare a 14000 rpm per 10 min.
20. Trasferire 900µl del sovrnatante (che contiene il plasmide ricombinante) in un nuovo tubo da 1.5 ml.
21. Aggiungere 630µl di isopropanolo per far precipitare il DNA, agitare il tubo delicatamente.
22. Centrifugare a 14000 rpm per 20 min.
23. Rimuovere il sovrnatante ed aggiungere 200µl di etanolo al 70% per lavare il DNA.
24. Centrifugare a 14000 rpm per 2 min.
25. Rimuovere completamente il sovrnatante e lasciare asciugare il pellet di DNA per qualche minuto.
26. Risospendere il DNA in 50µl di acqua, eventualmente incubare a 50°C per facilitare la solubilizzazione del DNA in acqua sterile.

A questo punto è possibile eseguire l'analisi del DNA per scoprire se la coltura di batteri che stiamo esaminando abbia incorporato il plasmide ricombinante giusto durante il processo di trasformazione.

A questo scopo, è necessario digerire il DNA con un altro enzima di restrizione (chiamato BamHI) che darà vita a frammenti di lunghezza diversa, a seconda dell'orientamento del gene nel plasmide.

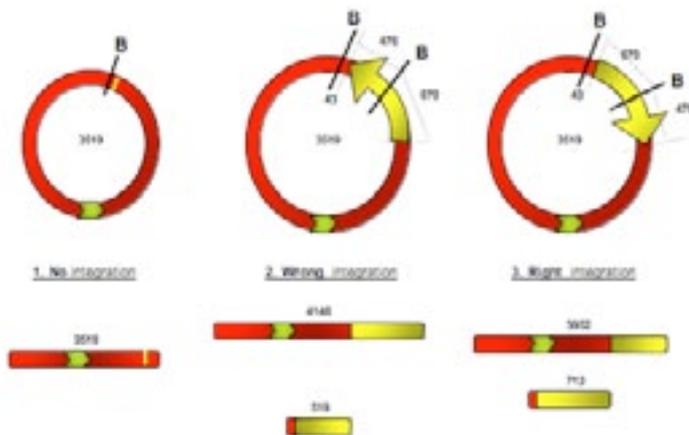


Fig. All.4 Analisi delle bande per selezionare le colonie che produrranno insulina ricombinante

27. Preparare il mix di reagenti per la reazione enzimatica. Per ogni campione di DNA bisogna utilizzare:

- 1 μ l di enzima (BamHI)
- 2 μ l di tampone specifico per BamHI
- 0.1 μ l BSA 100X
- 13.9 μ l di acqua sterile

28. In un nuovo tubo (TUBO C) aggiungere 17 μ l del mix di reagenti + 3 μ l del DNA da analizzare, mischiare e centrifugare 2-3 secondi a 14000rpm

29. Incubare a 37°C.

La reazione con l'enzima dovrebbe durare un paio d'ore circa. Ogni gruppo dovrà poi caricare il prodotto della digestione su un gel di agarosio al 2%.

30. Pesare 1 g di agarosio e scioglierlo in una beuta con 50 ml di tampone TAE 1X contenente un intercalante del DNA. Far bollire la soluzione nel microonde e agitare fino a quando questa non diventa trasparente.

31. Preparare la vaschetta per elettroforesi con bordi di nastro adesivo ed inserire il pettine.

32. Versare la soluzione di agarosio nella vaschetta per elettroforesi. Lasciare polimerizzare (solidificare).

Sullo stesso gel dovrà essere caricato inoltre un controllo (**C**), ovvero un plasmide chiuso, per avere la conferma che la reazione enzimatica ha funzionato e che il plasmide è stato digerito. Infatti, se l'aspetto del nostro campione sul gel somiglia al controllo, vorrà dire che probabilmente il plasmide ricombinante è ancora chiuso e che l'enzima non ha funzionato.

Per caricare i campioni sul gel bisogna prima aggiungere ad ogni tubo il Loading Buffer (**LB**), che rende i campioni più pesanti in modo che questi precipitino sul fondo del pozzetto.

Inoltre, per determinare le dimensioni dei frammenti di DNA generati dalla digestione enzimatica, bisogna utilizzare anche un riferimento di misura (**S**) che consiste in una miscela di frammenti di DNA le cui dimensioni sono note.

33. Rimuovere il nastro adesivo dal gel. Sistemare il gel nella cameretta e riempire la cameretta con il tampone TAE 1X (il gel deve essere immerso completamente nel liquido).

34. Prelevare 10 μ l del prodotto della digestione (TUBO C) e versarli in un nuovo tubo (TUBO D).

35. Aggiungere 4 μ l di Loading Buffer (LB) al prodotto della digestione enzimatica (TUBO D) ed al controllo (C).

36. Caricare 14 μ l del controllo (C) nel primo pozzetto del gel.

37. Caricare 14 μ l del prodotto di digestione (TUBO D) nel secondo pozzetto.

38. Caricare 5 μ l del riferimento (S) nel terzo pozzetto.

39. Far correre il gel a 100V per circa un'ora.

40. Osservare le dimensioni dei frammenti con la luce UV.

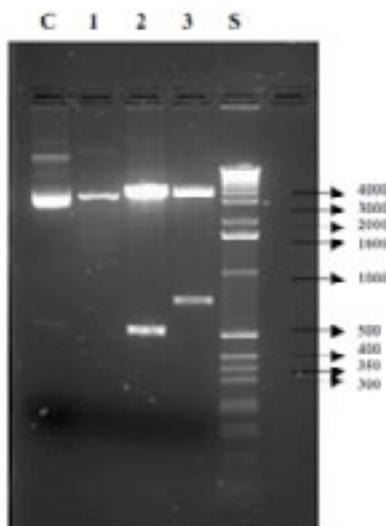


Fig. All.5 Foto della corsa dei campioni su gel di agarosio. Da sinistra: Controllo C (plasmide chiuso); Campione 1 (plasmide che non ha integrato il gene); Campione 2 (plasmide con gene inserito in modo non corretto); Campione 3 (plasmide con gene inserito in modo corretto); riferimento di misura S.

Confrontando la misura dei frammenti generati nel nostro campione con i DNA di riferimento (le cui dimensioni sono espresse in paia di basi) saremo in grado di stabilire se la nostra colonia di partenza aveva effettivamente incorporato il plasmide ricombinante giusto oppure no.

Le colonie batteriche contenenti il plasmide con il gene dell'insulina inserito in maniera corretta saranno ulteriormente amplificate e, in risposta ad uno stimolo appropriato, produrranno insulina ricombinante.

All.3 Reagenti e strumenti utilizzati

All.3.1 Descrizione dei prodotti utilizzati

- **TUBO A:** contiene i vari prodotti dell'interazione tra il plasmide (pCR®-Blunt II-TOPO®, 3.519 paia di basi, prodotto commerciale distribuito da Invitrogen) e l'inserito (sequenza di 1.146 paia di basi amplificata in laboratorio)
- **TUBO B:** Ceppo DH5α del batterio *Escherichia coli*. Questi batteri sono stati trattati con cloruro di calcio per diventare chimicamente competenti.
- **Tampone LB (per un litro di soluzione):** 10g di triptone, 5g di estratto di lievito, 10g di NaCl. pH 7.0
- **Antibiotico:** kanamicina, utilizzato alla concentrazione finale di 25µg/ml
- **Tampone P1:** Tris-Cl 50mM, pH 8.0; EDTA 10mM; RNasi A 100µg/ml
- **Tampone P2:** NaOH 200 mM, SDS 1%
- **Tampone P3:** acetato di potassio 3 M, pH 5.5
- **BamHI:** enzima di restrizione che riconosce la sequenza (GGATCC) (GGATCC)
- **Tampone specifico per BamHI:** NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 1 mM, BSA 100 µg/ml
- **Intercalante del DNA:** SYBR Safe™ DNA Gel Stain in TAE 1X, prodotto commerciale distribuito da Invitrogen
- **Tampone TAE 1X:** Tris-acetato 0.04 M, EDTA 0.001 M
- **Loading Buffer (LB) 6X:** Tris-HCl 10 mM, pH 7.5; EDTA 50 mM, Ficoll 400 10%, Blu du Bromofenolo 0.25%
- **Controllo (C):** plasmide chiuso derivante dalla fusione di plasmide ed inserto (4.665 paia di basi)
- **Riferimento (S):** 1 Kb DNA Ladder, prodotto commerciale distribuito da Invitrogen

All.3.2 Materiale e soluzioni necessarie

- Guanti
- Pipette (P2, P200, P1000)
- Puntali
- Tubi Eppendorf (1.5ml, 2ml)
- Vaschette per ghiaccio
- Timer
- Beute di vetro
- Anse per batteri
- Tubi per batteri
- Acqua sterile
- Isopropanolo
- Etanolo 70%
- Ghiaccio
- Agarosio
- Piastre di agar con antibiotico

All.3.3 Strumenti necessari

- Camerette per elettroforesi ed alimentatore
- Forno a microonde
- Vortex
- Blocco riscaldante
- Incubatore a 37°C
- Ultracentrifuga
- Transilluminatore UV

All.4 Norme di sicurezza nei laboratori

All.4.1 Norme generali

Non si dovrebbe rimanere a lavorare da soli in laboratorio, senza che nessun altro sia presente nelle vicinanze.

E' proibito fumare in laboratorio.

E' proibito consumare cibo o bevande in laboratorio, come pure vietato conservarle in frigoriferi dove vengono stoccate sostanze ad uso del laboratorio stesso.

Nei laboratori deve essere indossato il camice, che va tolto prima di accedere in locali ad uso della comunità.

Per le pulizie non usare mai sostanze acide o miscele cromatiche ma specifici detersivi.

E' obbligo informarsi prima di maneggiare sostanze o materiali pericolosi sulle precauzioni necessarie da prendere. Sostanze di vario tipo, in confezione originale, sono contrassegnate da un'etichetta dove un simbolo, indica la natura del pericolo che si corre nel maneggiarle (ad es. tossico, irritante, corrosivo, esplosivo, ecc.).

In ogni laboratorio deve essere predisposta una cassetta con materiale di pronto soccorso corredata da istruzioni che, in caso di incidente, possano indicare le modalità di primo intervento più adeguate.

E' da evitare l'uso di vetreria che presenti bordi scheggiati o crepe. Quando in un laboratorio vengono eseguite lavorazioni pericolose è necessario indossare guanti monouso da lavare e buttare a fine lavoro.

Le persone che alla sera lasciano per ultime il laboratorio, sono tenute a controllare che tutto sia a posto (solventi, apparecchiature, sostanze chimiche, colture, ecc.).

All.4.2 Precauzioni da adottare durante l'utilizzo di apparati elettrici

Non usare mai adattatori multipli per collegare più strumenti.

Riferire immediatamente ogni mal funzionamento di apparati elettrici, o l'esistenza di fili elettrici consunti e di spine o prese danneggiate.

In caso di mal funzionamento di un apparato elettrico e' necessario interrompere il collegamento con la rete, e richiedere un intervento tecnico adeguato.

Le apparecchiature con motori elettrici non vanno disposte vicino a materiali infiammabili o esplosivi. L'alto voltaggio di apparecchi elettrici (ad es. apparati per elettroforesi) può essere letale. E' necessario segnalare il pericolo con appositi cartelli.

All.4.3 Precauzioni da prendere nell'utilizzo di sostanze tossiche-nocive

La presenza nei laboratori di sostanze tossiche-nocive va sempre segnalata con appositi cartelli.

Le sostanze tossiche esercitano i loro effetti nocivi per ingestione, per assorbimento cutaneo e per inalazione. Per evitare l'ingestione, anche casuale di tali sostanze bisogna astenersi dal consumare cibi o bevande nei laboratori.

Indossare sempre guanti di qualità adeguata, che vanno sempre sciacquati prima di essere rimossi dalle mani;

Per evitare contaminazioni di altri ambienti e' necessario togliere i guanti prima di lasciare il laboratorio;

I solventi volatili vanno sempre usati sotto cappa aspirante adeguata;

Se necessario usare una mascherina avendo cura di scegliere i filtri adeguati alla sostanza da manipolare.

All.4.4 Precauzioni da prendere quando si lavora con materiale biologico

Gli agenti infettanti comprendono protozoi parassiti, elminti, funghi, batteri e virus. E' inoltre importante ricordare che venire a contatto con animali o tessuti, secrezioni, sangue e urine da loro derivati, può comportare un rischio di infezione.

Particolare attenzione va fatta nell'uso di materiale biologico di origine umana (sangue, tessuti, linee cellulari), le misure di protezione da adottare non devono essere inferiori a quelle del secondo livello di contenimento.

In ogni laboratorio deve essere presente un disinfettante efficace, da utilizzare in caso di necessità; vietato pipettare con la bocca, mangiare, bere o fumare in laboratorio.

Necessario lavarsi le mani prima di uscire dal laboratorio.

All.4.5 Precauzioni nell'uso di radiazioni ultraviolette

Le sorgenti di radiazione ultravioletta (UV) sono di uso comune in laboratorio (ad esempio lampade per l'osservazione di gel elettroforetici o di cromatogrammi, e lampade germicide); indispensabile schermare la sorgente o indossare occhiali speciali per UV.

La radiazione UV a bassa lunghezza d'onda porta alla formazione di ozono per reazione fotochimica con l'ossigeno dell'aria. Concentrazioni di ozono maggiori di 0,1 ppm possono causare bruciore agli occhi e fastidi al naso e alla gola. Per evitare rischi dall'ozono occorre provvedere ad una buona ventilazione della zona dove e' presente la sorgente UV.

All.4.6 Norme per l'uso delle centrifughe

Il personale che intende usare le centrifughe deve essere perfettamente a conoscenza delle loro modalità d'uso e dei vari comandi. In particolare, prima dell'utilizzo deve accertarsi che:

- Tutte le centrifughe siano provviste di un dispositivo che impedisca l'avviamento con il coperchio aperto;
- Non vengano superate le velocità massime consentite, in relazione anche alla densità del materiale da centrifugare;
- Equilibrare con cura i contenitori da sottoporre a centrifugazione;
- I manuali delle centrifughe e dei rotori siano facilmente reperibili in prossimità delle apparecchiature stesse;

Inoltre deve preoccuparsi di:

- Lasciare perfettamente puliti centrifuga e rotori dopo l'uso, così da poter essere impiegati successivamente senza rischio anche se siano state usate sostanze tossiche o nocive, o materiali con potenziale rischio biologico;
- Fermare immediatamente una centrifuga che vibri o che emetta rumori anomali.

All.4.7 Utilizzo del forno a microonde

Non accendere il forno se è vuoto

Non utilizzare il forno con materiali infiammabili

Non utilizzare il forno con recipienti sigillati (potrebbero esplodere): svitare i tappi delle bottiglie, rimuovere i coperchi

Non utilizzare il forno con oggetti metallici o metallizzati: (es. bottiglie coperte di stagnola) e con carta d'argento

Non riempire eccessivamente i recipienti: il liquido bollendo, potrebbe traboccare

Proporzionare la potenza e il tempo di riscaldamento al contenuto in acqua di quanto viene riscaldato. In particolare, nel caso di soluzioni acquose, il liquido potrebbe surriscaldarsi oltre il punto di ebollizione, senza che appaiano bollicine. Ciò può portare al traboccamento improvviso di liquido bollente. Per prevenire questo pericolo, mescolare il liquido prima di scaldarlo e lasciarlo riposare per qualche minuto prima di togliere il recipiente dal forno

Utilizzare i guanti imbottiti per togliere i recipienti dal forno

Dopo l'uso pulire il forno con carta spruzzata con detersivo per vetri

In caso di incendio del contenuto del forno, tenere chiusa la porta, spegnere il forno, staccare la spina dalla presa di corrente lasciando che il fuoco si estingua per soffocamento

All.4.8 Utilizzo dell'apparecchiatura per elettroforesi

Assicurarsi che l'alimentatore sia spento, prima di collegare i morsetti

Assicurarsi che il coperchio della vaschetta sia correttamente posizionato, prima di collegare i morsetti

Alla fine della corsa, prima di rimuovere il coperchio della cella elettroforetica, spegnere l'alimentatore e staccare i morsetti

Appendice I: Specie animali utilizzate per l'analisi comparata dell'insulina



Immagine da <http://www.probertencyclopaedia.com/>

BOVIN – *Bos Taurus* (mucca)

Regno: Animalia
 Phylum: Chordata
 Subphylum: Vertebrata
 Classe: Mammalia
 Ordine: Artiodactyla
 Famiglia: Bovidae
 Genere: ***Bos***
 Specie: ***B. taurus***



Immagine da <http://www.probertencyclopaedia.com/>

CHICK – *Gallus gallus* (pollo)

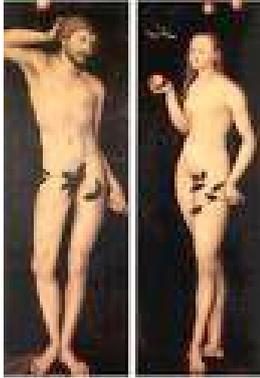
Regno: Animalia
 Phylum: Chordata
 Subphylum: Vertebrata
 Classe: Aves
 Ordine: Galliformes
 Famiglia: Phasianidae
 Genere: ***Gallus***
 Specie: ***G. gallus***



Immagine da <http://www.probertencyclopaedia.com/>

HORSE – *Equus caballus* (cavallo)

Regno: Animalia
 Phylum: Chordata
 Subphylum: Vertebrata
 Classe: Mammalia
 Ordine: Perissodactyla
 Sottordine: Hyppomorpha
 Famiglia: Equidae
 Genere: ***Equus***
 Specie: ***E. caballus***



Olio di Lucas Cranach, Uffizi - Firenze

HUMAN – *Homo sapiens* (uomo)

Regno: Animalia
 Phylum: Chordata
 Subphylum: Vertebrata
 Classe: Mammalia
 Ordine: Primates
 Superfamiglia: Hominoidea
 Famiglia: Hominidae
 Genere: ***Homo***
 Specie: ***H. sapiens***



Immagine da <http://filaman.ifm-geomar.de/>

HYDCO – *Hydrolagus colliei* (chimera)

Regno: Animalia
 Phylum: Chordata
 Subphylum: Vertebrata
 Classe: Chondrichthyes
 Ordine: Chimaeriformes
 Famiglia: Chimaeridae
 Genere: ***Hydrolagus***
 Specie: ***H. colliei***



Immagine da <http://musmusculus.info/>

MOUSE – *Mus musculus* (topo domestico)

Regno: Animalia
 Phylum: Chordata
 Subphylum: Vertebrata
 Classe: Mammalia
 Ordine: Rodentia
 Famiglia: Muridae
 Genere: ***Mus***
 Specie: ***M. musculus***



Immagine da <http://www.fishbase.org/>

MYXGL – *Myxine glutinosa* (missina atlantica)

Regno: Animalia
 Phylum: Chordata
 Subphylum: Craniata
 Ordine: Myxiniformes
 Famiglia: Myxinidae
 Genere: ***Mixine***
 Specie: ***M. glutinosa***



Immagine da <http://www.blevinsphoto.com/>

ONCKE – *Oncorhynchus keta* (salmone keta)

Regno: Animalia
 Phylum: Chordata
 Subphylum: Vertebrata
 Classe: Osteichthyes
 Sottoclasse: Actinopterygii
 Ordine: Salmoniformes
 Famiglia: Salmonidae
 Genere: ***Oncorhynchus***
 Specie: ***O. keta***



Immagine da www.raitre.rai.it/

PANTR – *Pan troglodytes* (scimpanzé)

Regno: Animalia
 Phylum: Chordata
 Subphylum: Vertebrata
 Classe: Mammalia
 Ordine: Primates
 Superfamiglia: Hominoidea
 Famiglia: Hominidae
 Genere: ***Pan***
 Specie: ***M. troglodytes***



Immagine da www.raitre.rai.it/

PIG – *Sus scrofa* (maiale)

Regno: Animalia
 Phylum: Chordata
 Subphylum: Vertebrata
 Classe: Mammalia
 Ordine: Artiodactyla
 Sottordine: Suiformes
 Famiglia: Suidae
 Genere: ***Sus***
 Specie: ***S. scrofa***



Immagine da <http://www.ischiainformazioni.net/>

RABIT – *Oryctolagus cuniculus* (coniglio)

Regno: Animalia
 Phylum: Chordata
 Subphylum: Vertebrata
 Classe: Mammalia
 Ordine: Lagomorpha
 Famiglia: Leporidae
 Genere: ***Oryctolagus***
 Specie: ***O. cuniculus***



Immagine da <http://gattivity.blogosfere.it/>

SHEEP – *Ovis aries* (pecora)

Regno: Animalia

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Classe: Mammalia

Ordine: Artiodactyla

Famiglia: Bovidae

Sottofamiglia: Caprinae

Genere: ***Ovis***

Specie: ***O. aries***

Appendice II: Aminoacidi e loro simboli

Amino acid	1 lettera	3 lettere
Alanina	A	Ala
Arginina	R	Arg
Asparagina	N	Asn
Acido aspartico	D	Asp
Asn+Asp	B	Asx
Cisteina	C	Cys
Glutamino	Q	Gln
Acido glutammico	E	Glu
Gln+Glu	Z	Glx
Glicine	G	Gly
Istidina	H	His
Isoleucina	I	Ile
Leucina	L	Leu
Lisina	K	Lys
Metionina	M	Met
Fenilalanina	F	Phe
Prolina	P	Pro
Serina	S	Ser
Treonina	T	Thr
Triptofano	W	Trp
Tirosina	Y	Tyr
Valina	V	Val

Appendice III: Risposte alle domande del percorso di Bioinformatica

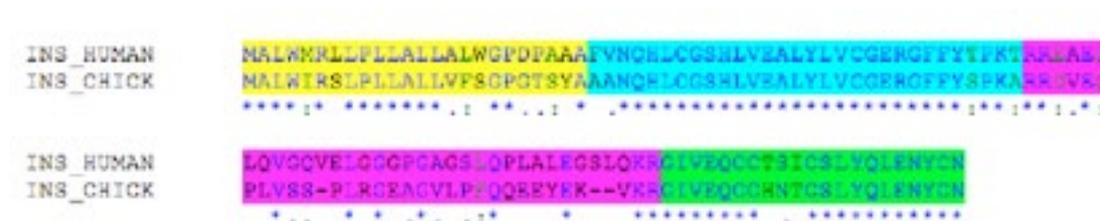
1) Considera la sequenza dell'insulina umana: la catena A è formata da 21 aminoacidi, la B da 30 aminoacidi. Nella sequenza data, ci sono effettivamente 51 aminoacidi in tutto?

No, ce ne sono di più: 110.

2) Inizialmente infatti l'insulina viene sintetizzata in una forma detta "preproinsulina", un polipeptide di 108 aminoacidi, in cui vi sono sequenze in più, che in seguito saranno eliminate: una sequenza "pre" aminotermine (peptide segnale, 24 aa) che consente la secrezione della proteina, e una sequenza "pro" (peptide C) che determina il corretto ripiegamento del filamento polipeptidico. Nel polipeptide considerato esse si trovano in quest'ordine:



Individua, nella sequenza aminoacidica dell'uomo e del pollo, i diversi segmenti.



3) Qual è la percentuale di conservazione nei diversi segmenti? Completa la tabella:

	peptide segnale		catena B		peptide C		catena A	
	n° *	%	n° *	%	n° *	%	n° *	%
INS_HUMAN VS INS_CHICK	15	62,5	26	86,7	11	31,4	18	85,7

4) Quali sequenze sono maggiormente conservate? Quali meno? Che considerazioni puoi fare?

Le sequenze relative alle catene A e B sono maggiormente conservate; il peptide segnale e soprattutto il peptide C sono meno conservati. Probabilmente la divergenza tra insulina umana e del pollo ha interessato soprattutto la sequenza del peptide segnale e del peptide C; le mutazioni in essi apparse potrebbero non essere state eliminate dalla selezione naturale in quanto queste sequenze non sono determinanti per la forma attiva dell'insulina.

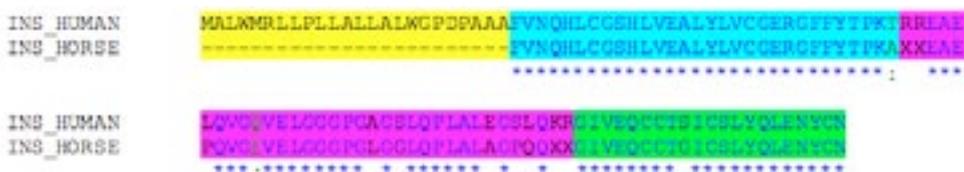
5) Perché pensi siano stati inseriti dei trattini (-) nell'allineamento della sequenza INS_CHICK? Quale può essere l'interpretazione dal punto di vista evolutivo?

Per ottenere il massimo valore statistico dell'allineamento. Si potrebbe ipotizzare, ad esempio, che l'evoluzione abbia portato all'inserimento di alcuni aminoacidi nella sequenza dell'insulina umana.

6) Puoi confrontare la sequenza dell'insulina umana con quella di un altro animale scelto. Ad esempio INS_HUMAN vs INS_PANTR, oppure INS_HUMAN vs INS_PIG, etc. Anche in questi casi determina la percentuale di conservazione dei diversi segmenti.



	peptide segnale		catena B		peptide C		catena A	
	n° *	%	n° *	%	n° *	%	n° *	%
INS_HUMAN VS INS_MOUSE	16	66,7	27	90	23	65,7	20	95,2



	peptide segnale		catena B		peptide C		catena A	
	n° *	%	n° *	%	n° *	%	n° *	%
INS_HUMAN VS INS_HORSE	0	0	29	96,7	24	68,6	20	95,2



	peptide segnale		catena B		peptide C		catena A	
	n° *	%	n° *	%	n° *	%	n° *	%
INS_HUMAN VS INS_HYDCO	0	0	22	73,7	6	17,1	14	66,7

INS_MYXGL MALSPFLAAVIRLVLLLSRAPPSADTRTTGHLOGKDLVNALYIACQVRCGFFDPTKGR
 INS_HUMAN MALMRLLLPLLALLALWG--PDPAAAIVNQHLCCSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRRRAED

INS_MYXGL LGALAAFLPAYAKCKEIQDDEISGGTKEVLFKRIIVKQCTTKRCHLYOLENVCN
 INS_HUMAN EDLQVG-QVLEGGPGAGSLQPLALECSLQKRIIVKQCTTSICELYOLENVCN

	peptide segnale		catena B		peptide C		catena A	
	n° *	%	n° *	%	n° *	%	n° *	%
INS_HUMAN VS INS_MYXGL	8	30,8	18	58,1	5	13,9	16	76,2

INS_ONCKE MAPWLOAASLLVLLALS-PC-VDAAAQHLCCSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRRRAED
 INS_HUMAN MALMRLLLPLLALLALWGPDPAALFVNQHLCCSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRRRAED

INS_ONCKE L-IGFLEPKSAKENEIYFPKQTEMVVKRIIVKQCTTKRCHLYOLENVCN
 INS_HUMAN LQVQVELEGGPGAGSLQPLALECSLQKRIIVKQCTTSICELYOLENVCN

	peptide segnale		catena B		peptide C		catena A	
	n° *	%	n° *	%	n° *	%	n° *	%
INS_HUMAN VS INS_ONCKE	11	45,8	24	80	5	14,3	13	61,9

INS_PANTR MALMRLLLPLLALLALWGPDPAALFVNQHLCCSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRRRAED
 INS_HUMAN MALMRLLLPLLALLALWGPDPAALFVNQHLCCSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRRRAED

INS_PANTR LQVQVELEGGPGAGSLQPLALECSLQKRIIVKQCTTSICELYOLENVCN
 INS_HUMAN LQVQVELEGGPGAGSLQPLALECSLQKRIIVKQCTTSICELYOLENVCN

	peptide segnale		catena B		peptide C		catena A	
	n° *	%	n° *	%	n° *	%	n° *	%
INS_HUMAN VS INS_PANTR	22	91,7	30	100	35	100	21	100

INS_PIG MALNTRLLPLLALLALWAPAPAQAIVNQHLCCSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRRRAED
 INS_HUMAN MALMRLLLPLLALLALWGPDPAALFVNQHLCCSHLVEALYLVCGERGFFYTPKTRRRAED

INS_PIG FQKAVELEGGEG--LQALALECPQKRIIVKQCTTSICELYOLENVCN
 INS_HUMAN LQVQVELEGGPGAGSLQPLALECSLQKRIIVKQCTTSICELYOLENVCN

	peptide segnale		catena B		peptide C		catena A	
	n° *	%	n° *	%	n° *	%	n° *	%
INS_HUMAN VS INS_PIG	20	83,3	29	96,7	24	68,6	21	100

9) Che considerazioni puoi fare a riguardo?

Probabilmente l'evoluzione del peptide segnale e del peptide C ha consentito una maggiore variabilità tra le specie; le mutazioni in essi apparse potrebbero non essere state eliminate dalla selezione naturale in quanto queste sequenze non sono determinanti per la forma attiva dell'insulina.

10) Esaminando l'albero "unrooted", quali due specie risultano più vicine filogeneticamente? Spiega il motivo della tua scelta.

L'uomo e lo scimpanzè; infatti hanno un solo "nodo" che li separa e i loro "rami" sono molto corti, quindi si sono differenziati da un antenato comune in tempi relativamente recenti.

11) La lunghezza dei "rami" dà un'idea della distanza evolutiva: dopo aver stampato il dendrogramma e usando un righello, indica la distanza evolutiva in mm tra l'uomo e gli altri animali.

NOTA: in base all'ingrandimento con cui si stampa, si possono misurare valori diversi, pertanto qui sono semplicemente indicate le coppie in ordine crescente di distanza.

- uomo e scimpanzè

- uomo e maiale

- uomo e cavallo

- uomo e mucca

- uomo e pecora

- uomo e coniglio

- uomo e topo

- uomo e chimera

- uomo e pollo

- uomo e salmone

- uomo e missina

12) L'insulina della pecora è più strettamente vicina a quella del pollo o dell'uomo?

Considerando il numero di "nodi" che separano le coppie di specie e la lunghezza dei "rami", si osserva che l'insulina della pecora è più simile a quella umana.

13) Che relazione evolutiva c'è tra l'insulina di maiale, pecora e mucca?

La linea evolutiva che ha portato alle varianti di insulina nelle tre specie, si è a un certo punto differenziata in una nuova linea che ha dato origine al maiale, mentre l'altro "ramo" si è "biforcato" successivamente differenziando così pecora e mucca; queste due specie hanno un antenato comune relativamente recente e

sembrano pertanto filogeneticamente più vicine, mentre l'antenato comune di pecora-mucca-maiale è più distante nel tempo.

14) Commenta il significato di questi risultati sulla base delle tue conoscenze.

Come ci si poteva aspettare, i pesci e la missina stanno dalla parte opposta del dendrogramma rispetto agli altri animali, tutti terrestri. Il pollo, un uccello, è a sua volta distanziato dal resto degli animali, mammiferi.

15) Quale specie è più affine alla mucca? Quale più affine al salmone?

La pecora è più affine alla mucca, mentre la missina è più affine al salmone.

16) Osserva le coppie "scimpanzè-uomo", "salmone-missina", "pecora-mucca". Si tratta di coppie di animali differenziate ciascuna da un unico "nodo". Quali differenze puoi notare nelle divergenze di queste coppie?

Il momento in cui si è avuta divergenza è più distante nel tempo per la coppia "salmonemissina", mentre è più recente per la coppia "scimpanzè-uomo".

17) Il termine "omologia" indica una caratteristica o una struttura che in due o più specie si è differenziata a partire da un antenato comune. Allo stesso modo "omologia di sequenza" si riferisce alle somiglianze tra le sequenze nucleotidiche nel DNA o tra le sequenze aminoacidiche nelle proteine. Indica le due specie che condividono il più alto grado di omologia per l'insulina.

Sono l'uomo e lo scimpanzè.

18) Nota: è importante capire che questi alberi filogenetici generati usando strumenti bioinformatici sono basati solo su dati relativi a sequenze nucleotidiche o aminoacidiche. Oltre all'omologia di una sequenza, bisogna usare altri metodi per determinare le relazioni evolutive tra le specie. Ne sai indicare qualcuno?

Sempre utilizzando la bioinformatica, si ottengono alberi filogenetici più attendibili integrando le omologie di sequenza di più geni e/o proteine. Tradizionalmente, la filogenesi animale viene fatta basandosi sulle differenze di struttura corporea, su differenze anatomiche e fisiologiche fra le specie, sullo sviluppo embrionale, sulle modalità riproduttive, etc.

A questo punto ritorniamo al quesito iniziale di questo percorso: **quale animale scegliere per estrarre insulina il più possibile simile a quella umana, da usare nella cura del diabete?**

19) Basandoti sull'omologia di sequenza dell'insulina, quale specie animale riterresti più adatta per estrarre questo ormone?

Lo scimpanzè.

20) Pensi che l'utilizzo di questo animale possa avere implicazioni etiche e commerciali (considera se si tratta di una specie diffusa, facilmente allevabile, che non sia protetta, etc.)?

Lo scimpanzè è certamente l'animale che ha l'insulina più simile a quella umana; tuttavia non è una specie cosmopolita e il suo allevamento in cattività trova l'opposizione di parte dell'opinione pubblica. In natura esistono meno di 200.000 individui, presenti nelle foreste tropicali pluviali di pianura e di montagna oppure in terreni boscosi di savana tropicale in soli 21 Stati Africani, dalla costa ovest del continente fino alle regioni occidentali di Uganda, Rwanda, Burundi e Tanzania. Al pari delle altre scimmie antropomorfe (gorilla, orango e bonobo), gli scimpanzè sono minacciati d'estinzione, a causa della perdita dell'habitat, della caccia per le loro carni e dell'uccisione delle madri per il commercio dei piccoli. Sono anche allevati in cattività per la ricerca scientifica. Attualmente gli scimpanzè in Africa sono classificati come in estinzione, mentre quelli in cattività negli Stati Uniti sono definiti animali "in pericolo". Un recente comunicato ("Reuters" - 24 Maggio, 2007 - Will Dunham) fa sapere che l'U.S. National Institute of Health (NIH), che appoggia una varietà di studi biochimici sugli animali, cesserà l'allevamento degli scimpanzè, di proprietà del governo, per le ricerche. Fatte queste considerazioni, non è pensabile un allevamento di scimpanzè per estrarre insulina ad uso terapeutico. Il maiale presenta un alto grado di omologia con l'uomo per quanto riguarda l'insulina ma, a differenza dello scimpanzè, è una specie facilmente allevata in quasi tutto il mondo da millenni (nella sola Unione Europea si contano 120 milioni di maiali!) e ogni giorno ne vengono uccisi parecchi esemplari per ottenere prodotti soprattutto alimentari. Il suo "sacrificio" a scopi scientifici e medici comporta certo un minor numero di controindicazioni etiche rispetto all'utilizzo di primati, tanto è vero che il maiale è sempre stato l'animale d'elezione per gli xenotrapianti. Anche il cavallo produce insulina molto simile a quella umana, tuttavia il suo allevamento è certo più costoso e meno "produttivo" di quello del maiale.

- 21) Sulla base di queste considerazioni, e tenendo conto anche dell'omologia, quale animale potrebbe allora essere un "donatore" ideale?

Il maiale.

5 Bibliografia e sitografia

Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M, **DNA ricombinante**, Zanichelli Editore

Vander AJ, Sherman JH, Luciano DS, **Fisiologia dell'uomo**, Il Pensiero Scientifico Editore

Ladisch MR and Kohlmann KL, Recombinant Human Insulin, **Biotechnol. Progr.** 1992, (8)

469-478

Dugi K, Diabetes mellitus, **Science in School** 2006, (1) 61-65

<http://www.dnai.org/b/index.html>

<http://en.wikipedia.org/wiki/Insulin>

<http://www.vivo.colostate.edu>

<http://www.med.unibs.it>

<http://www.biotopics.co.uk/as/insulinproteinstructure.html>

<http://www.scienceinschool.org>

<http://www.gtac.edu.au>

<http://www.cusmibio.unimi.it>

Ringraziamenti



Si ringrazia la Fondazione Banca del Monte di Lombardia che ha reso possibile la collaborazione essenziale per la realizzazione di questo percorso didattico, attraverso il “Progetto Professionalità Ivano Becchi”.

Per i suggerimenti tecnici offerti durante la fase di realizzazione del progetto e per la lettura critica della bozza si ringraziano Daniela Marazziti, Cinzia Grazioli, Olivier Mirabeau, Daniele Malpetti, Alexandra Manaia e Julia Willingale-Theune.

Immagine in copertina: Structure composing, Paul Tucker – Original file “composing/layers” – from the EMBL Photolab archive;

Realizzazione grafica Nicola Graf

Realizzazione editoriale Rossana De Lorenzi e Corinne Kox;

Stampato da European Molecular Biology Laboratory (EMBL) Photolab.



L'ELLS utilizza i "creative commons" per proteggere i diritti del materiale prodotto che è rivolto a studenti, insegnanti ed altre istituzioni. I simboli sono presenti anche sul sito del "TeachingBASE" dell'ELLS e nelle versioni da scaricare nei formati pdf/doc/ppt.



Attribuzione – Non commerciale – Condividi allo stesso modo

E' possibile alterare o trasformare quest'opera per scopi non commerciali, purchè sia attribuita la paternità dell'opera ed utilizzata una licenza identica o equivalente.

E' possibile riprodurre e distribuire quest'opera così come tradurla, trasformarla e produrre nuove versioni basate su quella originale. L'opera risultante dovrà avere lo stesso tipo di licenza e non dovrà essere usata per fini commerciali.

Significato dei simboli

-  Riprodurre
-  Modificare
-  Attribuzione
-  Non commerciale
-  Condividi allo stesso modo

Per maggiori informazioni <http://creativecommons.org>

© Copyright European Molecular Biology Laboratory 2010

