



*PROGETTO BIOFORM*  
*Corso didattico sperimentale*

*Analisi*  
*dell'inserzione Alu*  
*nel locus PV92*

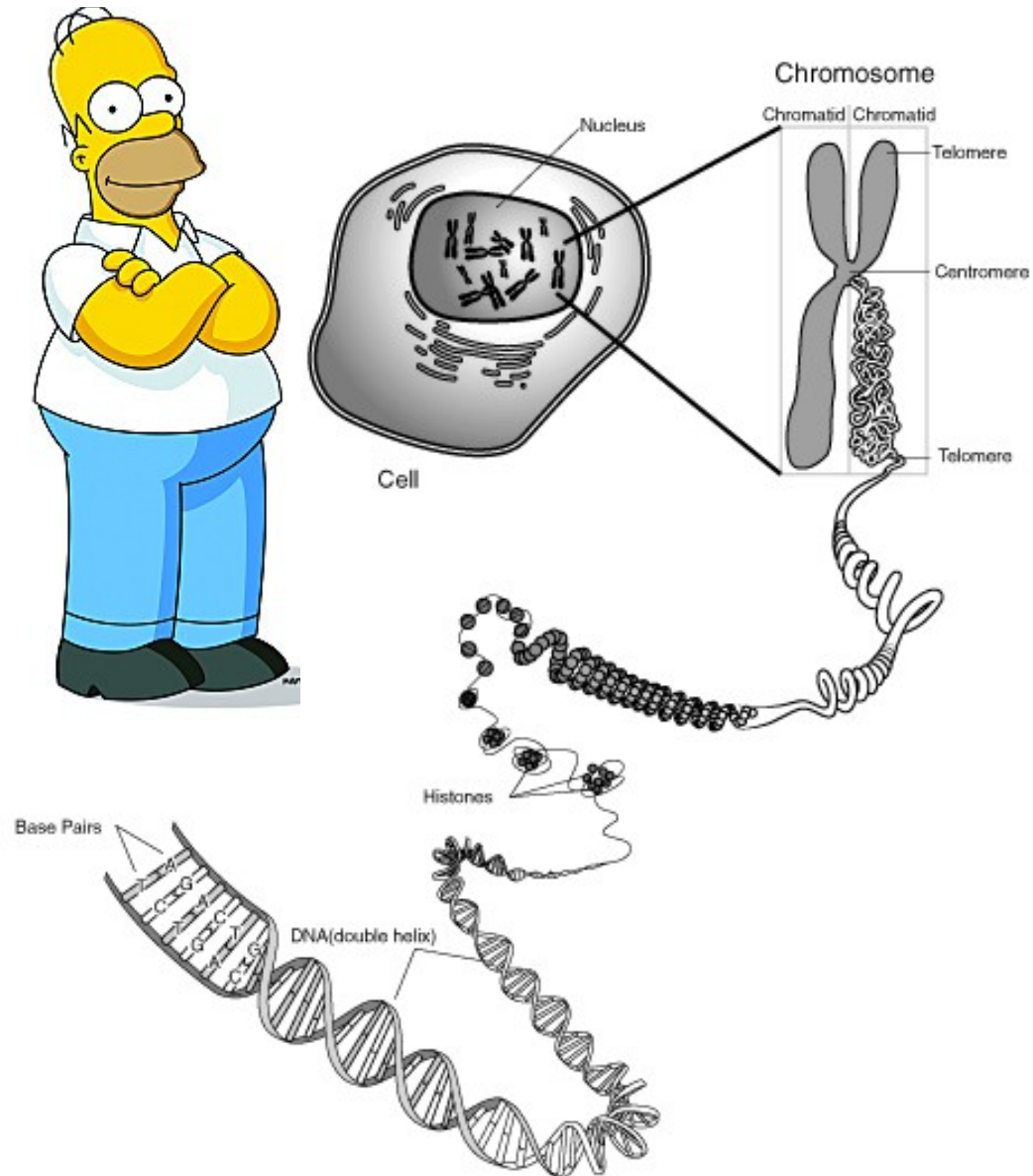
# Cosa sono le sequenze Alu?

*I geni rappresentano una piccola percentuale del genoma umano*

*Il genoma umano conta circa 3.000.000.000 di paia di basi*

*I circa 30.000 geni codificati rappresentano solo l'1,5% dell'intera sequenza*

*La maggioranza del genoma è costituito da sequenze ripetute di vario tipo*



# ***Alu è una sequenza ripetuta non codificante appartenente al gruppo delle SINEs***

*Le sequenze più ricorrenti nel genoma non sono quelle geniche ma sono sequenze ripetute denominate:*

*1) Sequenze semplici ripetute in tandem*

*Satelliti, Minisatelliti e Microsatelliti*

*2) Sequenze ripetitive disperse di varie lunghezze*

*LINEs (Long Interspersed Element)*

*SINEs (Short Interspersed Element)*

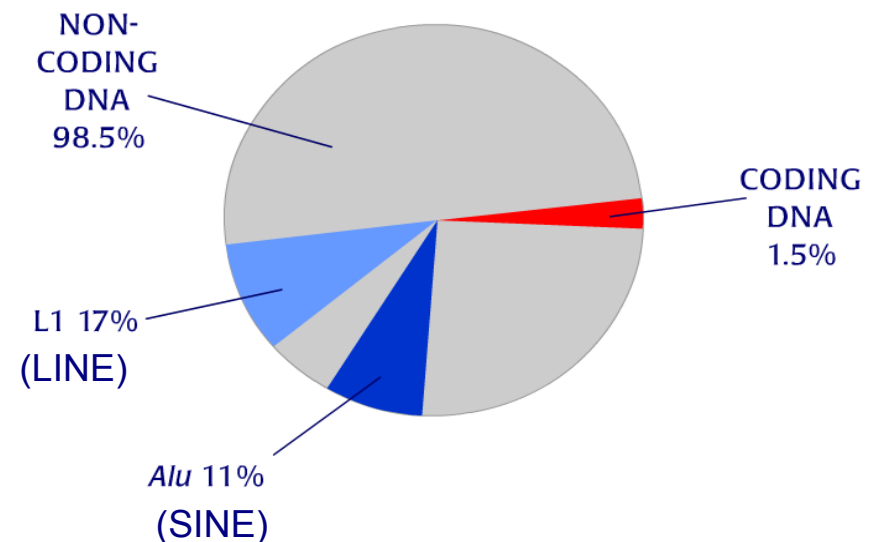
# ***LINEs e SINEs***

	Viral Superfamily	Nonviral Superfamily
Common types	Ty ( <i>S. cerevisiae</i> ) copia ( <i>D. melanogaster</i> ) LINEs L1 (mammals)	SINES B1/Alu (mammals) Processed pseudogenes of pol III transcripts
Termini	Long terminal repeats	No repeats
Target repeats	4–6 bp	7–21 bp
Reading frames	Reverse transcriptase and/or integrase	None (or none coding for transposon products)
Organization	May contain introns (removed in subgenomic mRNA)	No introns

*Nuovi dati di sequenziamento del genoma umano indicano che esistono nelle nostre cellule:*

*1.500.000 SINEs (70% Alu) = ~ 15% del genoma*

*850.000 LINEs = ~ 17% del genoma*



# ***LINEs: Long INterspersed Elements***

## ***Caratteristiche***

*Lunghezza = fino a 6Kb*

*Ripetitività = 20.000 – 50.000 copie*

*Normalmente non contengono promotori, ma contengono siti di Poliadenilazione al 3'. Cosa che indica la loro derivazione da trascritti della Polimerasi II.*

*Contengono delle ORF codificanti la trascrittasi inversa e un'endonucleasi.*

*Prototipo in cellule di mammifero: LINE1*

## ***Meccanismo probabile di propagazione delle Lines:***

*Trascrizione*

*Trasporto nel citoplasma*

*Traduzione*

*Legame dell'RT neoprodotta all'RNA*

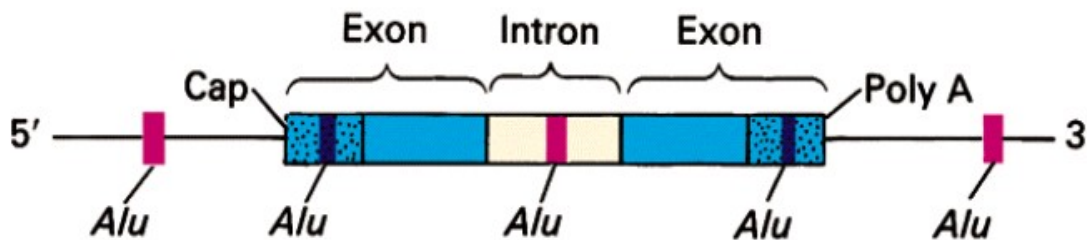
*Ritorno nel nucleo*

*Retrotrascrizione*

*Inserzione nel genoma*

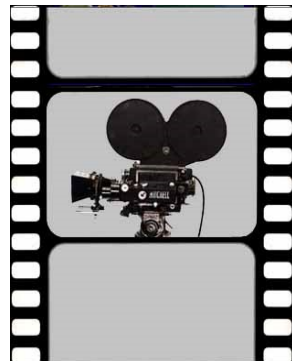
# SINEs: Short INterspersed Elements

## *Sequenze Alu*



*Poiché molte sequenze Sines contengono siti di restrizioni per **AluI**, questi elementi vengono spesso complessivamente chiamati **Sequenze Alu**.*

***Meccanismo di replicazione: il gene saltante***



## *Caratteristiche:*

*Lunghezza = ~300 bp*

*Ripetitività: > 1,500,000 volte nel genoma umano*

*Costituiscono >17% del genoma umano*

*Trovate principalmente in regioni intergeniche e introni*

*Si propagano per retroposizione ma NON codificano per enzimi coinvolti nella trasposizione*

*Contengono promotori interni (tipici di alcuni trascritti di RNA polimerasi III)*

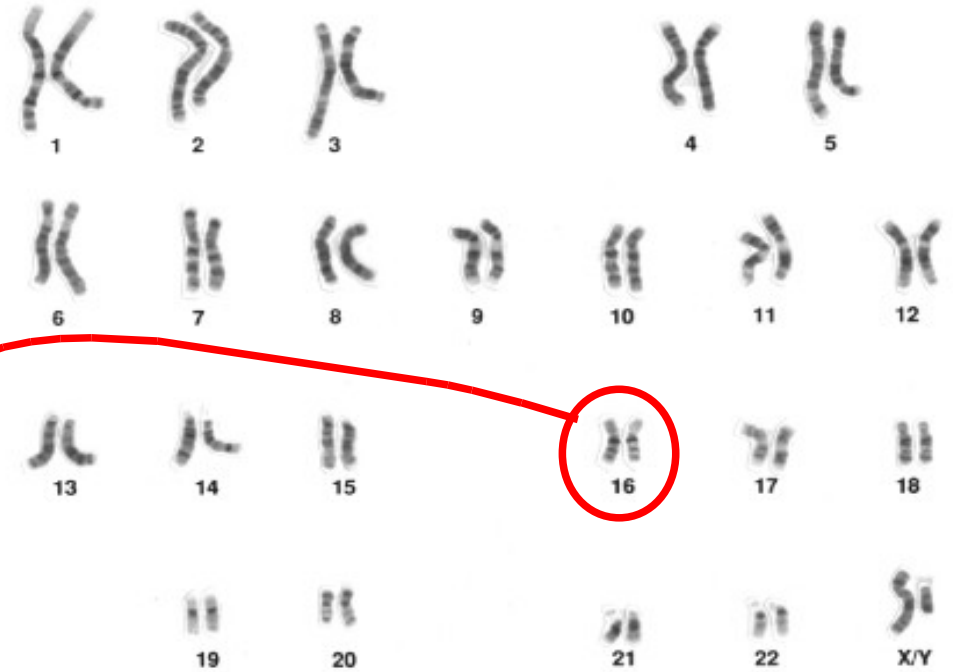
*Si pensa che la loro propagazione sia avvenuta sfruttando le funzioni delle LINEs*

# Il locus PV92

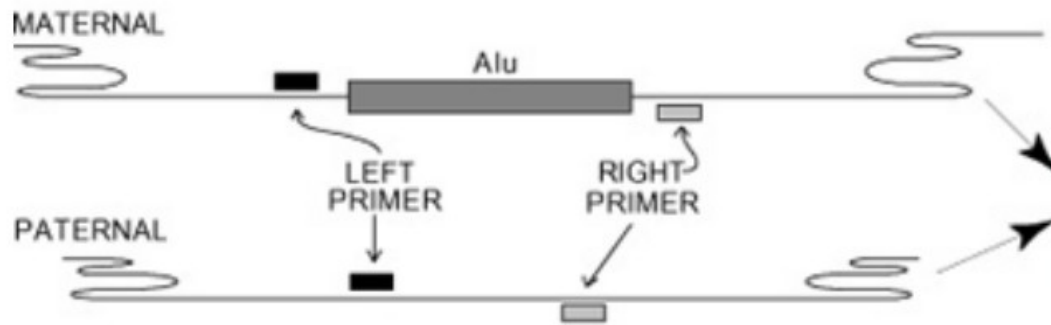
*Il locus PV92 è polimorfico ma è molto semplice da studiare poiché esistono solo 2 varianti: con e senza l'inserzione Alu*

*Poiché nessun gene è espresso in questo locus,*

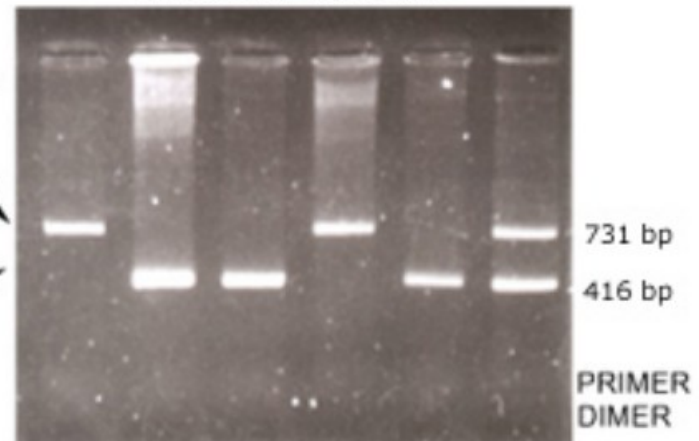
- 1) non c'è pressione evolutiva*
- 2) non ne deriva nessuna caratteristica morfologica*
- 3) non da nessuna informazione su predisposizioni a malattie ecc...*



## PV92 Locus on Chromosome 16



## RESULTS OF GEL ELECTROPHORESIS



# *L'esperimento!!!*

## *1. ESTRAZIONE DEL DNA...*

*Prelievo di cellule dalla cavità orale facendo un lavaggio energetico con soluzione fisiologica*



*Il liquido raccolto nel bicchiere viene mescolato e 1 ml viene trasferito in una provetta*



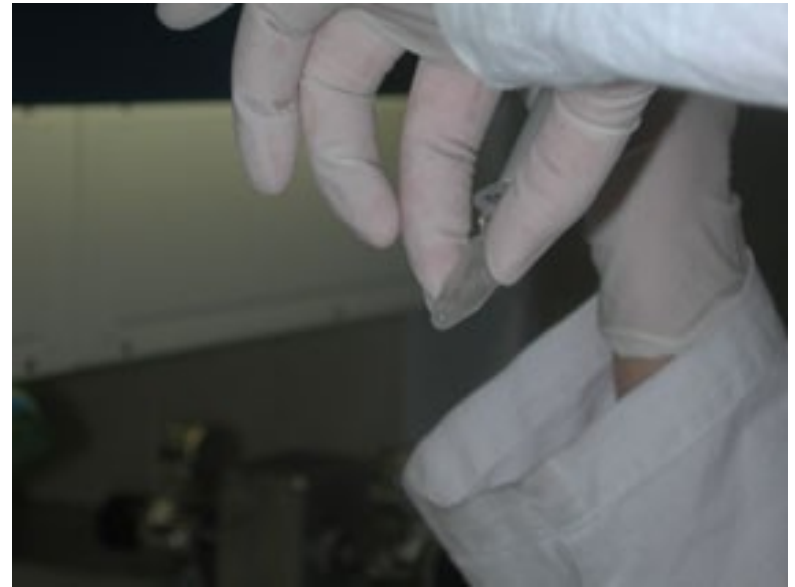
# ...ESTRAZIONE DEL DNA...

*I campioni vengono centrifugati. Sul fondo della provetta si deposita il pellet di cellule. Il sovranatante viene aspirato e buttato lasciando una piccola quantità di soluzione che servirà per risospendere le cellule*



# ...ESTRAZIONE DEL DNA

*Una aliquota di sospensione cellulare viene utilizzata per l'estrazione del DNA. Tale aliquota viene infatti mescolata vigorosamente con una soluzione chiamata CHELEX. La miscela viene fatta bollire per 10 minuti e successivamente centrifugata. Sul fondo della provetta si depositeranno le proteine mentre l'acido nucleico rimarrà nel sovranatante che deve essere quindi recuperato e trasferito in un tubo pulito, pronto per la PCR*

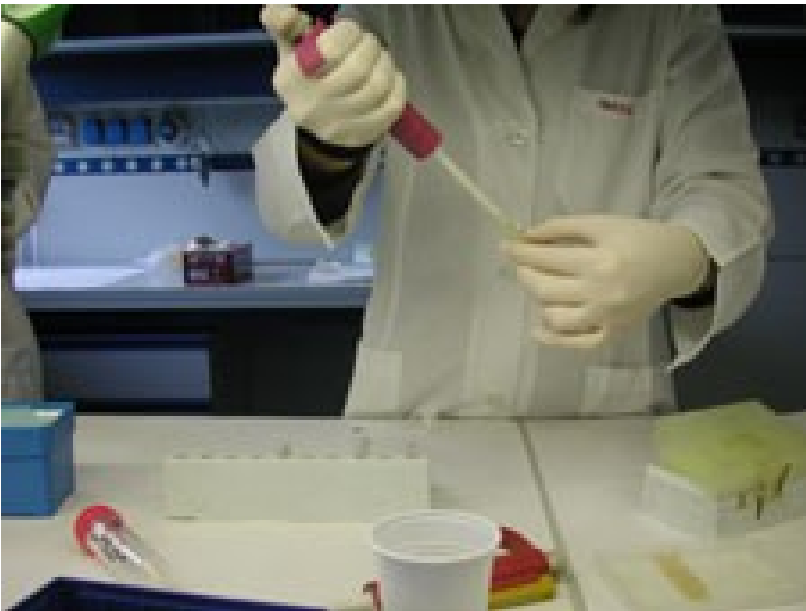


## 2. AMPLIFICAZIONE DEL DNA TRAMITE PCR...

*Si allestisce una reazione di PCR utilizzando dei tubi di PCR "Ready-To-Go Beads" che contengono i reagenti necessari per la reazione (sali minerali con funzione tamponante, desossinucleotidi trifosfati, cloruro di magnesio e la Taq polymerase liofilizzata). A tale tubo bisogna aggiungere l'acqua, gli oligonucleotidi specifici per la regione pv92 Alu, il colorante di caricamento ed un'aliquota di DNA estratto*

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

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



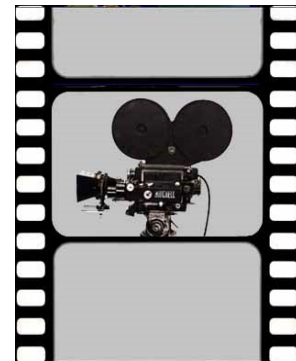
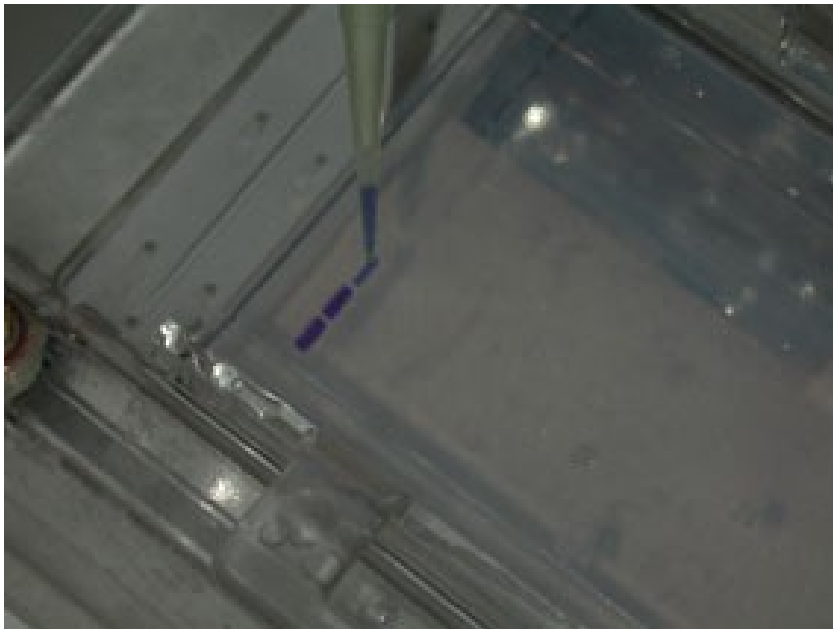
### 3. *ELETTROFORESI DEL PRODOTTO DI AMPLIFICAZIONE...*

*Si prepara un gel di agarosio al 2% in TBE 1x.  
Il prodotto di PCR viene caricato nel pozzetto del gel*



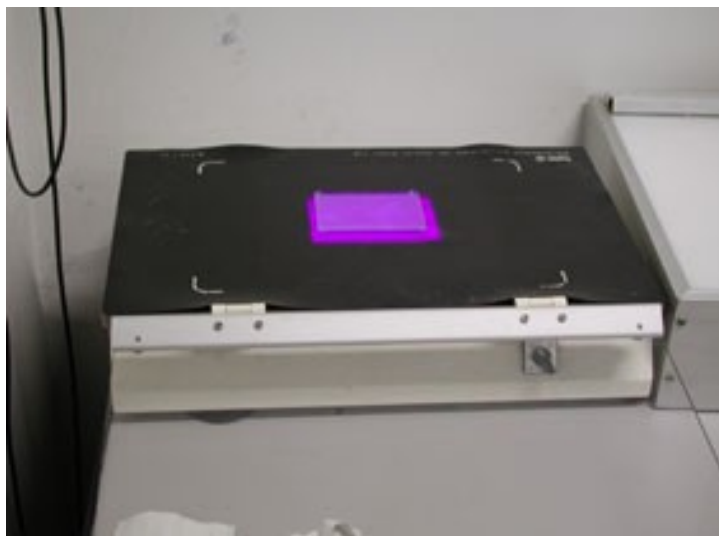
# ...ELETTROFORESI DEL PRODOTTO DI AMPLIFICAZIONE

- *Dopo aver caricato i campioni di PCR, si applica un voltaggio di 120 V per 30 minuti. Sotto l'azione di un campo elettrico il DNA viene separato sulla base del peso molecolare e migrerà dal polo negativo a quello positivo*

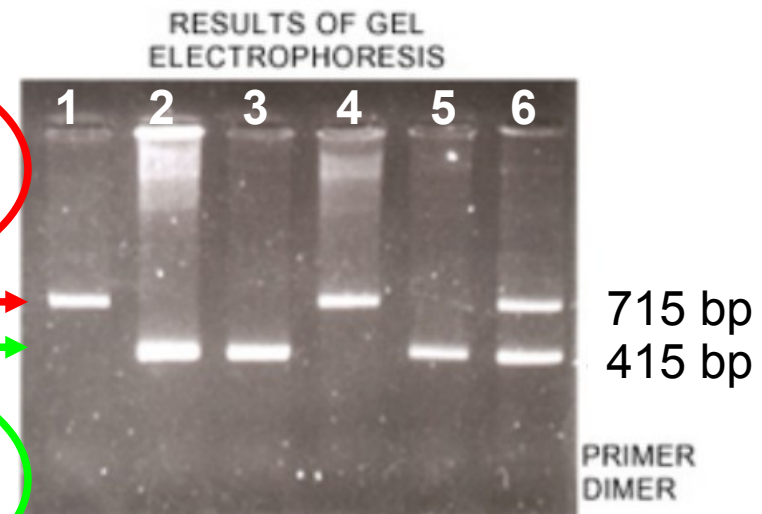
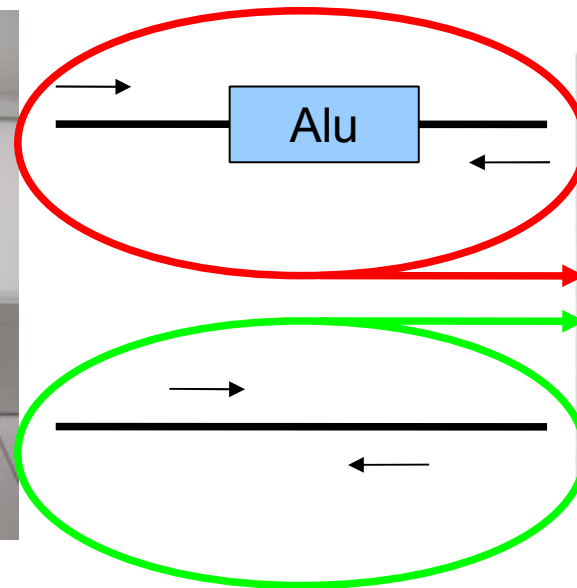


# 4. RIPRESA DELLE IMMAGINI

*Poichè il gel contiene una piccola quantità di etidio bromuro, alla fine della corsa elettroforetica è possibile visualizzare il DNA quando il gel viene illuminato con luce ultravioletta*



PV92



1,4) omozigoti +/+  
2,3,5) omozigoti -/-  
6) eterozigoti

# I risultati di Bioform 2008

*Calcolo della percentuale reale degli alleli Alu*

<b>Risultati globali</b>						
Totale studenti	Totale Studenti con rezione riuscita	Totale alleli +	Totale alleli -	Totale omozigoti -/-	Totale omozigoti +/+	Totale eterozigoti -/+ e +/-
938	917	389	1445	564	36	317
		percentuale totale alleli +	percentuale totale alleli -	percentuale totale omozigoti -/-	percentuale totale omozigoti +/+	percentuale totale eterozigoti -/+ e +/-
		21,2%	78,8%	61,5%	3,9%	34,6%

*Totale alleli Alu+ = 2 x omozigoti(+/+) + eterozigoti(+/- e -/+)*

*Totale alleli Alu+ = 2 x 36 + 317 = 389*

*Totale alleli Alu- = 2 x omozigoti(-/-) + eterozigoti(+/- e -/+)*

*Totale alleli Alu- = 2 x 564 + 317 = 1445*

# I risultati di Bioform 2008

*Calcolo della percentuale teorica eterozigoti*

<b>Risultati globali</b>						
Totale studenti	Totale Studenti con rezione riuscita	Totale alleli +	Totale alleli -	Totale omozigoti -/-	Totale omozigoti +/+	Totale eterozigoti -/+ e +/-
		389	1445	564	36	317
938	917	percentuale totale alleli +	percentuale totale alleli -	percentuale totale omozigoti -/-	percentuale totale omozigoti +/+	percentuale totale eterozigoti -/+ e +/-
		21,2%	78,8%	61,5%	3,9%	34,6%

**Legge di Hardy-Weinberg**

$$(p+q)=1$$

$$p^2+2pq+q^2=1$$

$p$ =frequenza allele +  
 $q$ =frequenza allele -  
 $pq$ = frequenza eterozigote

*Se la frequenza teorica degli eterozigoti è simile a quella misurata nei nostri esperimenti si può concludere che la nostra popolazione è in equilibrio di Hardy Weinberg*

$$2pq=[(1-p^2)-q^2] \quad 2pq=[(1-0,215^2)-0,788^2] \quad 2pq \text{ teorica}=33,4\% \quad \text{reale} = 34,6\%$$

$$p^2 \text{ teorica}=4,5\% \quad p^2 \text{ reale}= 3,9\% \quad q^2 \text{ teorica}=62,1\% \quad q^2 \text{ reale} = 61,5\%$$

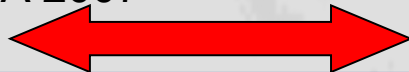
*La nostra popolazione è in equilibrio di Hardy- Weinberg*

*Le condizioni per cui un locus in una popolazione segue la legge di H-W sono le seguenti.*

**Popolazione praticamente infinita**  
**Assenza di immigrazione ed emigrazione**  
**Panmissia ossia incrocio casuale**  
**Non selezione**  
**Non mutazione**

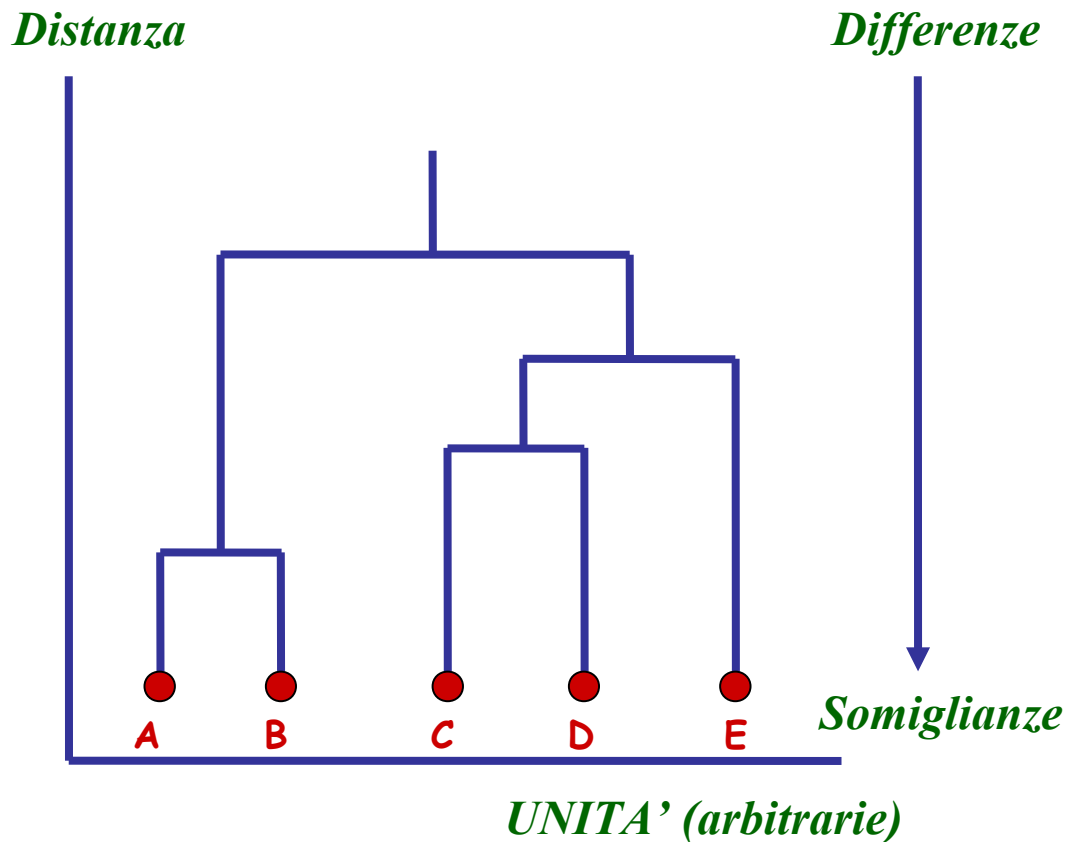
# Confronto fra i nostri risultati e quelli del resto del mondo

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

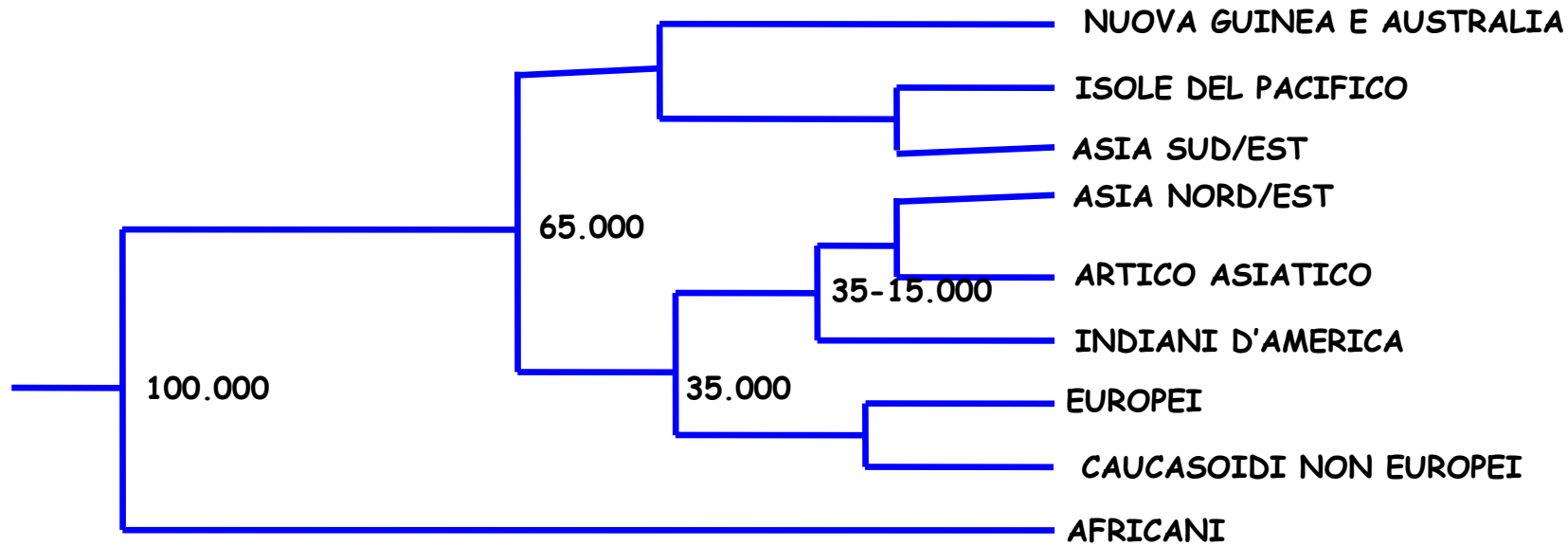


# ***Perchè i polimorfismi allelici sono importanti nella genetica delle popolazioni?***

*Confrontando differenze e somiglianze tra organismi a due a due si può ottenere un:*



***Dendrogramma Fenetico***



***Albero evolutivo ottenuto analizzando 110 geni polimorfici***

- *La differenza più grande separa gli africani e i non-africani*
- *I non-africani si separano in due rami maggiori*

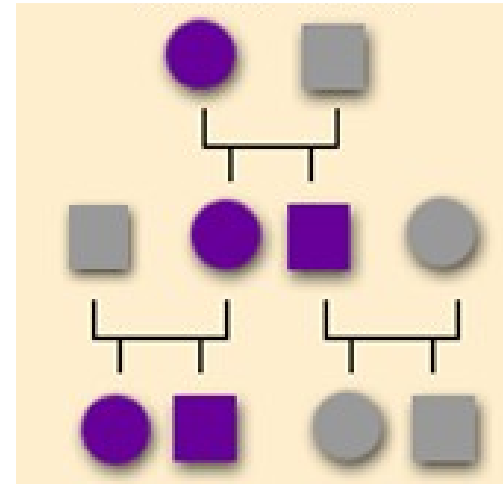
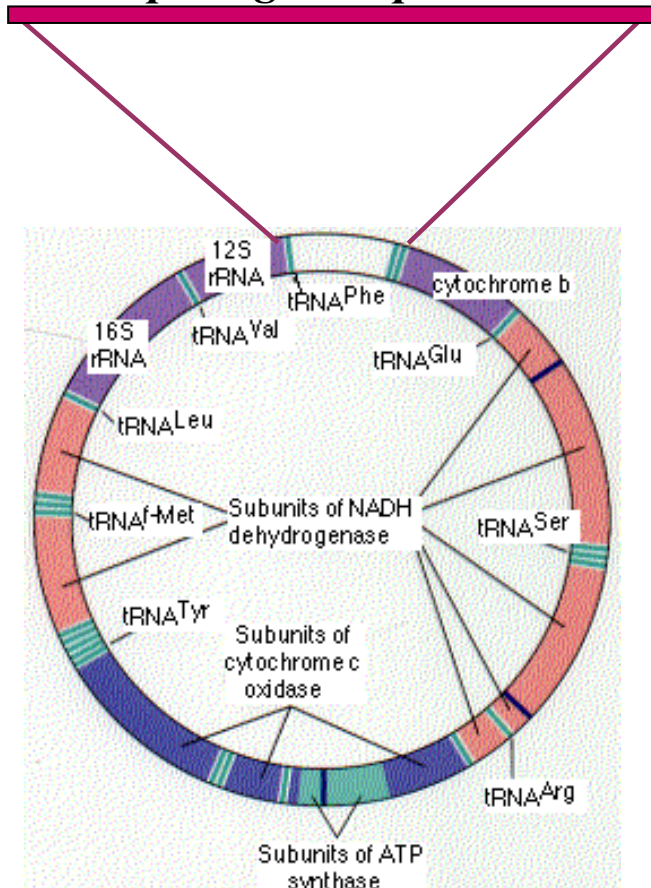
**CI SONO ANCHE PUNTI NON CHIARI:**

*SUD-EST ASIATICO: tende a rimanere con la Nuova Guinea e l'Australia ma ha caratteri simili al Nord-Est Asiatico*

*Gli europei somigliano sia agli africani che agli asiatici. Ciò può essere dovuto a migrazione e quindi a un forte flusso genico, come mostrato dall'analisi di questi 110 polimorfismi del DNA*

# Il DNA mitocondriale

*D-Loop: Regione Ipervariabile*



- *Il DNA Mitocondriale viene ereditato per via materna*
- *Le mutazioni vengono fissate poiché mancano sistemi di riparo*
- *Quindi è riflette più fedelmente le diversità tra individui*

## Mitochondrial DNA and human evolution

REBECCA L. CANN\*, MARK STONEKING & ALLAN C. WILSON

Department of Biochemistry, University of California, Berkeley, California 94720, USA

\* Present address: Department of Genetics, University of Hawaii, Honolulu, Hawaii 96822.

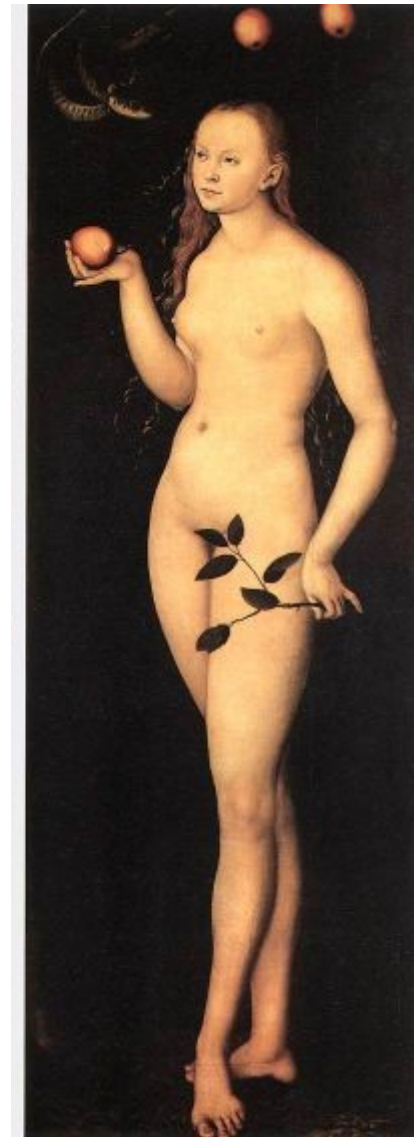
*DNA Mitocondriale da 147 popolazioni, da cinque diverse aree geografiche*

*Lo studio delle divergenze di sequenza del D-loop permette di stimare i tempi ai quali la separazione di diverse popolazioni è avvenuta.*

*Poiché il DNA mitocondriale si eredita in linea materna è come risalire ad una comune antenata, la cosiddetta EVA AFRICANA.*

*RITROVAMENTI PIU' ANTICHI DI HOMO SAPIENS SAPIENS*

<b>BORDER CAVES</b>	<b>130.000-74.000</b>	<b>Anni fa</b>	<b>AFRICA</b>
<b>KLASIES</b>	<b>115.000-74.000</b>	“ “	“
<b>QAFZEH</b>	<b>109.000-92.000</b>	“ “	<b>ISRAELE</b>



# *Migrazioni delle popolazioni di homo Sapiens Sapiens Ricostruite in Base all'analisi genetico demografica del DNA mitocondriale*

