

INDICE SINTETICO

1	Gli inizi della biologia molecolare	1
2	La struttura del DNA	15
3	La versatilità dell'RNA	37
4	Struttura e ripiegamento delle proteine	62
5	L'organizzazione del genoma e l'evoluzione	94
6	La replicazione del DNA e il mantenimento dei telomeri	122
7	Le vie di riparazione del DNA	162
8	La trascrizione nei batteri	187
9	La trascrizione negli eucarioti	216
10	I meccanismi epigenetici della regolazione genica	270
11	Il processamento dell'RNA e la regolazione genica post-trascrizionale	313
12	Il meccanismo della traduzione	360
13	La tecnologia del DNA ricombinante e gli organismi geneticamente modificati	384
14	L'analisi di organizzazione, espressione e funzione dei geni	453
15	La biologia molecolare in medicina	513

INDICE GENERALE

PREFAZIONE	XIII
LE RISORSE DIGITALI	XIV
INDICE DEI VIDEO	XV

1	Gli inizi della biologia molecolare	1
1.1	Introduzione	1
1.2	Approfondimenti sulla natura del materiale ereditario	3
	Le leggi dell'ereditarietà di Mendel	4
	La teoria cromosomica dell'ereditarietà	5
	Il principio trasformante è il DNA	6
	Un approccio creativo porta all'ipotesi un gene-un enzima	7
	L'importanza del progresso tecnologico: l'esperimento di Hershey-Chase	9
1.3	Un modello per la struttura del DNA: la doppia elica	10
1.4	Il dogma centrale della biologia molecolare	11
1.5	Un quadro evolutivistico per l'ereditarietà	12
	La teoria selezionista (neodarwiniana)	12
	La teoria neutrale dell'evoluzione molecolare	12
	I CONCETTI IN SINTESI	13
	I CONCETTI IN PRATICA	14

2	La struttura del DNA	15
2.1	Introduzione	15
2.2	La struttura primaria: i componenti degli acidi nucleici	16
	Gli zuccheri a cinque atomi di carbonio	16
	Le basi azotate	16
	Il gruppo funzionale fosfato	17
	Nucleosidi e nucleotidi	17
	La nomenclatura dei nucleotidi	18
	La lunghezza del DNA e dell'RNA	19
	Il significato di 5' e di 3'	19
2.3	La struttura secondaria del DNA	19
	Tra le basi azotate si formano legami idrogeno	19
	L'impilamento delle basi conferisce stabilità chimica alla doppia elica del DNA	20

La struttura della doppia elica di Watson e Crick	22
Solco maggiore e solco minore	22
Le diverse caratteristiche delle forme alternative della doppia elica	23
I filamenti di DNA possono separarsi in modo reversibile	25
2.4 Le strutture secondarie insolite del DNA	28
▶ FOCUS 2.1 Origami di DNA: costruire "nanomacchine" con le molecole	29
Le strutture scivolote	29
Le strutture cruciformi	30
Il DNA a tripla elica	30
Il DNA G-quadruplex o a quartetti di G	31
▶ MEDICINA 2.1 L'atassia di Friedreich e il DNA a tripla elica	32
2.5 La struttura terziaria del DNA	33
Il superavvolgimento del DNA	33
Il significato del superavvolgimento <i>in vivo</i>	34
I CONCETTI IN SINTESI	35
I CONCETTI IN PRATICA	35

3 La versatilità dell'RNA	37
3.1 Introduzione	37
3.2 L'RNA partecipa a una vasta gamma di processi cellulari	38
3.3 I motivi strutturali dell'RNA	40
La struttura secondaria dell'RNA	40
La struttura del tRNA: informazioni importanti sui motivi strutturali dell'RNA	42
I motivi frequenti della struttura terziaria dell'RNA	44
La cinetica del ripiegamento dell'RNA	47
3.4 La scoperta della catalisi da RNA	49
L'autosplicing dell'RNA di <i>Tetrahymena thermophila</i>	49
▶ FOCUS 3.1 Il mondo a RNA	51
Il ribozima RNasi P	52
I ribozimi catalizzano diverse reazioni chimiche	52
3.5 I genomi a RNA	56
I virus eucarioti a RNA	56
▶ MEDICINA 3.1 I patogeni virali emergenti	58
I retrovirus	59
I batteriofagi a RNA	59
I viroidi e altri patogeni subvirali	59
I CONCETTI IN SINTESI	60
I CONCETTI IN PRATICA	61

4 Struttura e ripiegamento delle proteine	62
4.1 Introduzione	62
4.2 La struttura primaria: gli aminoacidi e il codice genetico	63
I ventidue aminoacidi codificati geneticamente che formano le proteine	63
La struttura primaria delle proteine	63
La traduzione del codice genetico	63
Il ventunesimo e il ventiduesimo aminoacido codificati geneticamente	67
La preferenza per i codoni	67
Le configurazioni D ed L degli aminoacidi in natura	68
4.3 La struttura tridimensionale delle proteine	69
La struttura secondaria	69
La struttura terziaria	71
La struttura quaternaria	72
Le proteine intrinsecamente disordinate	75
4.4 La funzione delle proteine e il controllo della loro attività	77
Gli enzimi sono catalizzatori biologici	78
La regolazione dell'attività delle proteine mediante modifiche post-traduzionali	79
La regolazione allosterica dell'attività delle proteine	81
4.5 Il ripiegamento corretto e non corretto delle proteine	83
Le chaperon molecolari	83
Le vie di degradazione delle proteine nelle cellule eucariote	85
La degradazione proteica nelle cellule procariote	86
La separazione di fase	87
Le malattie da ripiegamento non corretto delle proteine	88
▶ MEDICINA 4.1 I prioni	89
I CONCETTI IN SINTESI	91
I CONCETTI IN PRATICA	92

5 L'organizzazione del genoma e l'evoluzione	94
5.1 Introduzione	94
5.2 L'organizzazione del genoma varia tra organismi diversi	95
Quanti sono i domini della vita, due o tre?	95
Le due classi di dimensioni del genoma: piccolo e compatto o grande ed esteso	96

5.3	Il compattamento del genoma eucariote	97		
	Gli istoni sono piccole proteine cariche positivamente	98		
	I nucleosomi sono l'unità di base dell'impacchettamento della cromatina	100		
	Gli ordini superiori della struttura della cromatina	101		
	L'ulteriore compattamento del DNA richiede domini ad ansa	102		
	La cromatina interamente condensata: i cromosomi metafasici	103		
	L'organizzazione e l'espressione del materiale genetico	107		
5.4	La maggior parte del genoma eucariote non è codificante	109		
	Gli elementi interspersi sono soprattutto elementi trasponibili	110		
	Le sequenze ripetute in tandem si organizzano in serie con un numero variabile di ripetizioni	110		
5.5	Il trasferimento genico orizzontale contribuisce all'evoluzione del genoma	111		
	I genomi degli organuli rivelano un'origine endosimbiotica	111		
	► MEDICINA 5.1 Il DNA mitocondriale e le malattie	114		
	Il trasferimento di DNA tra compartimenti	114		
5.6	L'organizzazione del genoma procariote e virale	115		
	L'organizzazione del genoma batterico	116		
	Il DNA plasmidico	116		
	L'organizzazione del genoma degli archei	117		
	L'organizzazione del genoma virale	117		
	I CONCETTI IN SINTESI	120		
	I CONCETTI IN PRATICA	120		
6	La replicazione del DNA e il mantenimento dei telomeri	122		
6.1	Introduzione	122		
6.2	I primi indizi sul meccanismo di replicazione del DNA batterico	123		
	L'esperimento di Meselson-Stahl	123		
	La visualizzazione del DNA batterico che si replica	123		
6.3	Le DNA polimerasi catalizzano la sintesi del DNA da 5' a 3'	125		
	La replicazione semidiscontinua del DNA	126		
6.4	Il replisoma batterico	128		
	Le DNA polimerasi batteriche svolgono diverse funzioni	129		
	L'inizio della replicazione nei batteri	129		
	La replicazione nei batteri è mediata dal replisoma	130		
	Le topoisomerasi rilassano il DNA superavvolto	131		
	La sintesi del filamento guida è veramente continua?	133		
6.5	Il replisoma eucariote	134		
	La mappatura delle origini di replicazione	134		
	L'attivazione selettiva delle origini di replicazione negli eucarioti	135		
	Le fabbriche di replicazione	136		
	La rimozione degli istoni nelle origini di replicazione	136		
	La formazione del complesso di prereplicazione e l'abilitazione alla replicazione	137		
	► FOCUS 6.1 La nomenclatura dei geni coinvolti nella replicazione del DNA	138		
	Lo svolgimento della doppia elica a livello delle forcelle di replicazione	140		
	L'innesco mediato da RNA della sintesi del DNA del filamento guida e di quello discontinuo	141		
	Lo scambio delle polimerasi	141		
	L'allungamento dei filamenti guida e di quelli discontinui	141		
	La PCNA: una pinza scorrevole con molti partner proteici	143		
	Il proofreading a opera delle DNA polimerasi replicative	143		
	La maturazione dei filamenti nascenti di DNA	144		
	La deposizione degli istoni sul DNA di nuova sintesi	147		
	Le topoisomerasi districano il DNA appena sintetizzato	147		
6.6	Metodi alternativi di replicazione del DNA circolare	147		
	La replicazione a cerchio rotante	147		
	► MEDICINA 6.1 Farmaci antitumorali diretti contro le topoisomerasi	148		
	I modelli di replicazione degli organuli	148		
	► MEDICINA 6.2 La RNasi MRP e l'ipoplasia della cartilagine e dei peli	150		
6.7	Il mantenimento dei telomeri: il ruolo della telomerasi nella replicazione del DNA, nell'invecchiamento e nel cancro	150		
	I telomeri	150		
	La soluzione al problema della replicazione delle estremità	151		
	Il mantenimento dei telomeri da parte della telomerasi	153		
	Altri metodi di mantenimento dei telomeri	154		
	Il reclutamento della telomerasi sui telomeri	154		
	La regolazione dell'attività della telomerasi	154		
	Telomerasi, invecchiamento e cancro	156		
	► MEDICINA 6.3 La discheratosi congenita: perdita della funzione della telomerasi	158		
	I CONCETTI IN SINTESI	160		
	I CONCETTI IN PRATICA	161		

7 Le vie di riparazione del DNA 162

7.1 | Introduzione 162

7.2 | Le mutazioni e il danno al DNA 162

Le transizioni e le trasversioni possono portare a mutazioni silenti, missenso e nonsense 163

L'espansione delle ripetizioni trinucleotidiche causa instabilità genetica 165

Le classi generali del danno al DNA 165

7.3 | L'aggiornamento della lesione 168

7.4 | L'inversione diretta del danno al DNA 169

L'inversione dei dimeri di timina per azione della DNA fotoliasi 169

L'inversione del danno mediata dalla DNA metiltrasferasi 171

La rimozione dei legami incrociati DNA-proteina a opera della proteasi SPRTN 171

7.5 | La riparazione dei cambiamenti di singole basi e delle distorsioni strutturali mediante rimozione del danno al DNA 172

La riparazione per escissione delle basi 172

La riparazione delle basi male appaiate 172

► **MEDICINA 7.1** Il cancro coloretale ereditario non associato a poliposi: un difetto della riparazione delle basi male appaiate 175

La riparazione per escissione dei nucleotidi 178

► **MEDICINA 7.2** Lo xeroderma pigmentoso e le malattie correlate: i difetti della riparazione per escissione dei nucleotidi 178

7.6 | La riparazione delle rotture a doppio filamento mediante rimozione del danno al DNA 181

La ricombinazione omologa 181

► **MEDICINA 7.3** Il cancro ereditario al seno: le mutazioni di *BRCA1* e di *BRCA2* 182

La giunzione di estremità non omologhe 183

I CONCETTI IN SINTESI 185

I CONCETTI IN PRATICA 186

8 La trascrizione nei batteri 187

8.1 | Introduzione 187

8.2 | Il meccanismo della trascrizione 188

La struttura del promotore batterico 188

La struttura dell'RNA polimerasi batterica 189

Come fa l'RNA polimerasi a trovare un promotore? 192

L'inizio della trascrizione 193

L'allungamento 194

► **FOCUS 8.1** L'RNA polimerasi: un motore molecolare 196

Il meccanismo di proofreading 197

La terminazione della trascrizione 197

8.3 | Indizi sulla regolazione genica forniti dall'operone del lattosio (*lac*) 199

Il modello dell'operone di Jacob e Monod per la regolazione genica 199

Gli operoni sono comuni nei procarioti 200

La caratterizzazione del repressore Lac 200

La regolazione dell'operone del lattosio (*lac*) 200

Il promotore *lac* e il gene strutturale *lacZ* sono molto usati in biologia molecolare 204

8.4 | Il meccanismo di azione dei regolatori trascrizionali 204

Il legame cooperativo delle proteine al DNA 204

I cambiamenti allosterici e il legame al DNA 204

La formazione di anse del DNA 206

8.5 | Il controllo dell'espressione genica da parte dell'RNA 208

Il ripiegamento differenziale dell'RNA: l'attenuazione trascrizionale dell'operone del triptofano 209

I ribointerruttori 209

I ribozimi ribointerruttori 211

8.6 | I circuiti di regolazione genica 212

I fattori σ alternativi 212

Il quorum sensing 213

I CONCETTI IN SINTESI 214

I CONCETTI IN PRATICA 215

9 La trascrizione negli eucarioti 216

9.1 | Introduzione 216

9.2 | Uno sguardo d'insieme sulla regolazione trascrizionale 217

I territori cromosomici e le fabbriche di trascrizione 217

Gli eucarioti hanno tipi diversi di RNA polimerasi 218

► **MEDICINA 9.1** L'architettura nucleare e le malattie da invecchiamento precoce 219

9.3 | Gli elementi regolatori dei geni che codificano per proteine 220

Struttura e funzione degli elementi del promotore 221

Struttura e funzione degli elementi regolatori a lungo raggio 222

9.4	Il macchinario generale di trascrizione e il processo trascrizionale	225			
	► MEDICINA 9.2 La talassemia ispanica e i siti di ipersensibilità alla DNasi I	226			
	I componenti del macchinario generale di trascrizione	227			
	La struttura dell'RNA polimerasi II	227			
	I fattori generali di trascrizione e la formazione del complesso di preinizio	229			
	Il Mediatore: un ponte levatoio molecolare	230			
	L'inizio della trascrizione	232			
	L'allungamento	235			
	Proofreading e arretramento	236			
9.5	Il ruolo di specifici fattori di trascrizione nella regolazione genica	237			
	I fattori di trascrizione mediano l'attivazione o la repressione trascrizionale di geni specifici	238			
	I fattori di trascrizione sono proteine modulari	238			
	I motivi del dominio di legame al DNA	238			
	► FOCUS 9.1 Homeobox e omeodomini	240			
	► MEDICINA 9.3 La cefalopolisindattilia di Greig e la segnalazione da parte di Sonic hedgehog	243			
	Il dominio di transattivazione	245			
	Il dominio di dimerizzazione	246			
	I fattori pionieri	246			
9.6	I coattivatori e i corepressori trascrizionali	247			
	I complessi di modifica della cromatina	247			
	► FOCUS 9.2 Esiste un codice istonico?	249			
	Le varianti dell'istone linker	250			
	I complessi di rimodellamento della cromatina	251			
9.7	L'assemblaggio del complesso di trascrizione: i modelli dell'enhanceosoma e del "colpisci e fuggi" a confronto	254			
	Il modello dell'enhanceosoma	254			
	Il modello "colpisci e fuggi"	254			
	La fusione dei modelli	255			
	L'allungamento della trascrizione attraverso la barriera dei nucleosomi	255			
	La terminazione	257			
9.8	Importazione ed esportazione nucleare delle proteine	257			
	► MEDICINA 9.4 I difetti dell'Allungatore e la disautonomia familiare	258			
	► FOCUS 9.3 Il complesso del poro nucleare	259			
	Le carioferine mediano l'importazione e l'esportazione nucleare	260			
	La via di importazione nucleare	261			
	La via di esportazione nucleare	264			
	L'importazione nucleare regolata e le vie di trasduzione del segnale	265			
	I CONCETTI IN SINTESI	267			
	I CONCETTI IN PRATICA	269			
			10	I meccanismi epigenetici della regolazione genica	270
			10.1	Introduzione	270
			10.2	I marcatori epigenetici	271
				La metilazione delle citosine del DNA segnala i geni per il silenziamento	271
				Le isole CpG si trovano vicino ai promotori dei geni	274
				Il mantenimento stabile delle modifiche degli istoni	275
				► MEDICINA 10.1 L'epigenetica e il cancro	275
				► MEDICINA 10.2 La sindrome dell'X fragile e la metilazione anomala del DNA	276
			10.3	L'imprinting genomico	277
				► MEDICINA 10.3 L'imprinting genomico e le malattie dello sviluppo del sistema nervoso	278
				L'instaurazione e il mantenimento dell'imprinting	281
				I meccanismi di espressione monoallelica	282
				L'imprinting genomico è indispensabile per uno sviluppo normale	283
				Le origini dell'imprinting genomico	284
			10.4	L'inattivazione del cromosoma X	284
				L'inattivazione casuale del cromosoma X nei mammiferi	285
				I meccanismi molecolari che stabilizzano l'inattivazione del cromosoma X	285
				I geni legati all'X hanno tutti un'espressione monoallelica?	286
			10.5	Il controllo epigenetico degli elementi trasponibili	287
				La scoperta degli elementi mobili nel mais da parte di Barbara McClintock	287
				I trasposoni di DNA hanno una vasta gamma di ospiti	289
				► MEDICINA 10.4 Geni che saltano e malattie umane	290
				I trasposoni di DNA si spostano con un meccanismo "taglia e cuci"	291
				I retrotrasposoni si spostano con un meccanismo "copia e incolla"	292
				Alcuni retrotrasposoni LTR sono attivi nel genoma dei mammiferi	293
				I retrotrasposoni non LTR includono LINE e SINE	294
				La metilazione degli elementi trasponibili	295
				Il silenziamento degli elementi trasponibili mediante piccoli RNA regolatori	295
			10.6	L'epigenetica e l'eredità nutrizionale	296
				Nel topo, una dieta priva di acido folico può attivare un retrotrasposone	296
				Gli effetti epigenetici paterni	298
				L'ereditarietà epigenetica transgenerazionale avviene nella specie umana?	298

10.7	L'esclusione allelica	298	11.6	L'editing dell'RNA	339
	Il cambio del tipo di accoppiamento del lievito e il silenziamento	298		L'editing dell'RNA nei tripanosomi	339
	Il cambio dell'antigene nei tripanosomi	301		L'editing dell'RNA nei mammiferi	342
	► MEDICINA 10.5 La tripanosomiasi: la "malattia del sonno" umana	301		► MEDICINA 11.4 Sclerosi laterale amiotrofica: un difetto dell'editing dell'RNA?	343
	La ricombinazione V(D)J e la risposta immunitaria adattativa	306	11.7	La regolazione genica post-trascrizionale mediante RNAi	345
	► FOCUS 10.1 L'addomesticamento molecolare di un trasposone: l'evoluzione del sistema V(D)J	308		Uno sguardo di insieme alla via dell'RNAi indotta dai siRNA	346
I CONCETTI IN SINTESI		310		La scoperta dell'RNAi	347
I CONCETTI IN PRATICA		312		Il macchinario dell'RNAi	348
				La scoperta dei miRNA in <i>Caenorhabditis elegans</i>	348
				Il processamento dei miRNA	349
				I miRNA sono caricati su un complesso Argonata (Ago) di silenziamento	351
				I miRNA indirizzano l'mRNA alla degradazione o all'inibizione trascrizionale	351
				I miRNA possono regolare una vasta gamma di mRNA bersaglio	352
				Che cosa stabilisce se deve essere bloccata la traduzione o tagliato l'mRNA?	352
			11.8	Il turnover dell'RNA nel nucleo e nel citoplasma	353
				Il controllo di qualità dell'RNA e gli esosomi nucleari	353
				Il turnover dell'RNA citoplasmatico	354
			I CONCETTI IN SINTESI		356
			I CONCETTI IN PRATICA		358
11	Il processamento dell'RNA e la regolazione genica post-trascrizionale	313	12	Il meccanismo della traduzione	360
11.1	Introduzione	313	12.1	Introduzione	360
11.2	La scoperta dei geni interrotti	314	12.2	Struttura e assemblaggio dei ribosomi	360
	► FOCUS 11.1 Piccoli RNA nucleolari codificati da introni e geni "rovesciati"	315		La struttura dei ribosomi	360
11.3	Lo splicing avviene attraverso meccanismi diversi	316		Il nucleolo	363
	Gli introni di gruppo I richiedono un cofattore esterno G per lo splicing	316		La biogenesi dei ribosomi	364
	Gli introni di gruppo II richiedono una A sporgente interna per lo splicing	316	12.3	Le aminoacil-tRNA sintetasi	365
	Gli introni mobili di gruppo I e II	317		Il caricamento delle aminoacil-tRNA sintetasi	365
	Gli introni degli archei sono sottoposti a splicing da un'endoribonucleasi	319		L'attività di proofreading delle aminoacil-tRNA sintetasi	366
	Alcuni geni nucleari dei tRNA contengono un introne	320	12.4	L'inizio della traduzione	367
11.4	Le modifiche cotrascrizionali del pre-mRNA nucleare	320		Formazione del complesso ternario e caricamento sulla subunità ribosomiale 40S	368
	L'aggiunta del cappuccio 5' di 7-metilguanossina	322		Il caricamento dell'mRNA sulla subunità ribosomiale 40S	368
	La modifica N ⁶ -metiladenosina (m ⁶ A) avviene durante la trascrizione	323		Scansione e riconoscimento dell'AUG	369
	Terminazione e poliadenilazione	323			
	► MEDICINA 11.1 La distrofia muscolare oculofaringea: espansione di una ripetizione trinucleotidica nel gene di una proteina che lega poliA	325			
	La poliadenilazione alternativa	326			
	► MEDICINA 11.2 L'atrofia muscolare spinale: difetti della biogenesi delle snRNP	328			
	► MEDICINA 11.3 Le mutazioni del gene <i>Prp8</i> causano la retinite pigmentosa	333			
11.5	Lo splicing alternativo	334			
	Gli effetti dello splicing alternativo sull'espressione genica	335			
	► FOCUS 11.2 Il gene <i>DSCAM</i> : splicing alternativo estremo	335			
	La regolazione dello splicing alternativo	336			
	Il <i>trans</i> -splicing	337			

▶ TECNICHE 12.1 Saggi di toeprinting della traduzione	370	Il DNA plasmidico come vettore	393
L'unione delle subunità ribosomiali 40S e 60S	371	▶ TECNICHE 13.1 La reazione a catena della polimerasi (PCR)	394
▶ MEDICINA 12.1 Il fattore di inizio eucariote 2B e la scomparsa della sostanza bianca	371	Il batteriofago lambda (λ) come vettore	398
12.5 Allungamento e altri eventi all'interno del tunnel ribosomiale	371	▶ TECNICHE 13.2 La cromatografia liquida	399
La decodifica del messaggio	372	I vettori basati su cromosomi artificiali	400
Formazione del legame peptidico e traslocazione	373	Le fonti del DNA da clonare	401
L'attività peptidiltrasferasica	373	La costruzione di librerie di DNA	401
Le prove biochimiche che l'rRNA 23S è un ribozima	374	▶ TECNICHE 13.3 La sintesi del DNA complementare (cDNA)	402
Le prove strutturali che l'rRNA forma il sito attivo del ribosoma	375	13.5 Lo screening delle librerie e le sonde	403
Gli eventi nel tunnel ribosomiale	377	I tipi di sonde di DNA ed RNA	404
12.6 La terminazione della traduzione	378	La marcatura delle sonde	404
12.7 Il controllo traduzionale e post-traduzionale	379	Lo screening delle librerie	404
La fosforilazione di eIF2 α blocca la formazione del complesso ternario	379	▶ TECNICHE 13.4 I metodi di marcatura radioattiva e non radioattiva	405
Quattro proteina chinasi distinte mediano la fosforilazione di eIF2 α	380	▶ TECNICHE 13.5 La marcatura degli acidi nucleici	406
I CONCETTI IN SINTESI	382	Lo screening delle librerie di espressione	406
I CONCETTI IN PRATICA	383	13.6 La mappatura di restrizione e l'analisi degli RFLP	409
13 La tecnologia del DNA ricombinante e gli organismi geneticamente modificati	384	La mappatura di restrizione	409
13.1 Introduzione	384	▶ TECNICHE 13.6 L'elettroforesi del DNA e dell'RNA	409
13.2 Gli inizi della tecnologia del DNA ricombinante	385	Il polimorfismo di lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP)	411
Indizi derivati dai siti coesivi del batteriofago lambda (λ)	385	▶ TECNICHE 13.7 Il Southern blot	412
Indizi dai sistemi batterici di restrizione e modifica	386	▶ MEDICINA 13.1 Il saggio PCR-RFLP per la malattia delle urine a sciroppo d'acero	414
I primi esperimenti di clonaggio	386	13.7 Il sequenziamento del DNA	415
▶ FOCUS 13.1 I timori suscitati dalle molecole di DNA ricombinante	388	Il sequenziamento manuale con il metodo dei dideoossi di Sanger	415
13.3 Il taglio e l'unione del DNA	388	Il sequenziamento automatizzato del DNA	416
Le classi principali di endonucleasi di restrizione	388	Il sequenziamento di nuova generazione	417
Le sequenze di riconoscimento delle endonucleasi di restrizione di tipo II	389	13.8 Introduzione agli organismi geneticamente modificati	419
La DNA ligasi unisce frammenti lineari di DNA	390	13.9 I topi transgenici: microiniezione nel pronucleo	420
13.4 Il clonaggio molecolare	392	Come si produce un topo transgenico	420
La scelta del vettore dipende dalle dimensioni dell'inserito e dallo scopo finale	392	I topi transgenici inducibili	423
		▶ TECNICHE 13.8 La mutagenesi inserzionale mediante trasposoni	423
		13.10 Il gene targeting nelle cellule staminali embrionali di topo	424
		I topi knock out	425
		I topi knock in	428
		I topi knock down	428
		I topi knock out e knock in condizionali	428
		13.11 L'editing del DNA con CRISPR/Cas	430
		Il sistema di immunità adattativa CRISPR/Cas	430
		Le applicazioni di CRISPR/Cas	430
		Un topo per ogni occasione	432

13.12	Le applicazioni degli animali geneticamente modificati	433	14.3	Genomica, proteomica e oltre	461
	I primati transgenici non umani	433		Che cos'è la bioinformatica?	461
	Bestiame transgenico e gene pharming	434		La genomica e la genomica sintetica	462
	Gene drive	434		La proteomica	463
				L'era delle omiche e la biologia dei sistemi	463
13.13	La clonazione mediante trasferimento nucleare	435	14.4	Il sequenziamento di interi genomi	463
	L'equivalenza genetica dei nuclei delle cellule somatiche: esperimenti di clonazione delle rane	435		L'approccio di assemblaggio del genoma clone per clone	464
	La clonazione dei mammiferi mediante trasferimento nucleare	436		L'approccio a shotgun dell'intero genoma	464
	"L'innovazione dell'anno": la clonazione di Dolly	437		Le bozze e le sequenze rifinite	465
	Il metodo della clonazione mediante trasferimento nucleare	437		L'analisi comparativa dei genomi	465
	La fonte di mtDNA nei cloni	439		► FOCUS 14.2 L'analisi comparativa dei genomi: informazioni dal pesce palla e dal pollo	466
	Perché la clonazione mediante trasferimento nucleare è inefficiente?	439		La famiglia umana	468
	► FOCUS 13.2 Animali da compagnia geneticamente manipolati	442		Che cos'è un gene e quanti ce ne sono nel genoma umano?	468
	Le applicazioni della clonazione mediante trasferimento nucleare	443		Dai geni all'espressione genica	469
				► FOCUS 14.3 Gli organismi modello	470
13.14	Le piante transgeniche	446	14.5	I geni reporter	472
	Il trasferimento di geni mediato da T-DNA	446		I geni reporter di uso comune	473
	► FOCUS 13.3 I raccolti geneticamente modificati: stai mangiando pomodori ingegnerizzati geneticamente?	447		L'analisi della regolazione genica	473
	Elettroporazione e microbalistica	448		► TECNICHE 14.1 La tecnologia antisense	474
				► TECNICHE 14.2 La mutagenesi <i>in vitro</i>	476
I CONCETTI IN SINTESI		449		La purificazione e le etichette (<i>tag</i>) di rilevazione: le proteine di fusione	476
I CONCETTI IN PRATICA		451		► TECNICHE 14.3 La produzione di proteine ricombinanti	479
				Le etichette di proteine fluorescenti	480
				► TECNICHE 14.4 Microscopia a fluorescenza, confocale, multifotonica e a super risoluzione	481
14	L'analisi di organizzazione, espressione e funzione dei geni	453	14.6	La trascrittomica: espressione e localizzazione dell'RNA	485
14.1	Introduzione	453		L'ibridazione Northern blot	485
14.2	La tipizzazione del DNA	453		Il saggio di protezione dall'RNasi (RPA)	486
	► FOCUS 14.1 La tipizzazione del DNA non umano	454		L'ibridazione <i>in situ</i>	487
	I polimorfismi del DNA:			La PCR a trascrittasi inversa	487
	le basi della tipizzazione del DNA	455		La PCR real time quantitativa (Q-PCR)	488
	L'analisi dei minisatelliti	455		I microarray di DNA	489
	Il fingerprinting del DNA classico: analisi dei minisatelliti con una sonda multilocus	456		Il sequenziamento dell'RNA (RNA-seq)	490
	Le analisi basate sulla reazione a catena della polimerasi	457		La trascrittomica <i>in situ</i>	491
	L'analisi delle brevi ripetizioni in tandem (STR)	457	14.7	La proteomica: espressione e localizzazione delle proteine	491
	L'analisi del DNA mitocondriale	458		Il Western blot	491
	L'analisi del cromosoma Y	460		► TECNICHE 14.5 L'elettroforesi su gel delle proteine	492
	L'analisi mediante amplificazione casuale del DNA polimorfico (RAPD)	460		► TECNICHE 14.6 La produzione di anticorpi	494
				Le analisi <i>in situ</i>	496
				Il test ELISA	497
				Gli array di proteine	497
				La spettrometria di massa	498
				► FOCUS 14.4 Il proteoma nucleolare	500

14.8	L'analisi delle interazioni acidi nucleici-proteine	501		
	Il saggio di spostamento della mobilità elettroforetica (EMSA)	501		
	Il footprinting con la DNasi I	501		
	Il saggio di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP)	503		
	Legame crociato e immunoprecipitazione (CLIP)	503		
14.9	L'analisi delle interazioni proteina-proteina	504		
	Il saggio di pull-down	504		
	Il saggio di coimmunoprecipitazione	504		
	Il saggio del doppio ibrido di lievito	504		
	Il trasferimento dell'energia di risonanza della fluorescenza (FRET)	505		
	La biotinilazione dipendente dalla vicinanza (BioID)	506		
14.10	L'analisi strutturale delle proteine	506		
	La cristallografia a raggi X	506		
	La criomicroscopia elettronica (cryo-EM)	507		
	La spettroscopia di risonanza magnetica nucleare (NMR)	508		
	La microscopia a forza atomica (AFM)	508		
	I CONCETTI IN SINTESI	509		
	I CONCETTI IN PRATICA	511		
15	La biologia molecolare in medicina	513		
15.1	Introduzione	513		
15.2	La medicina genomica	513		
	Gli studi di associazione a livello dell'intero genoma e la medicina personalizzata	513		
	I polimorfismi a singolo nucleotide	514		
	► MEDICINA 15.1 La mappatura di SNP associati a malattie: la malattia di Alzheimer	515		
	Le varianti strutturali	516		
	I polimorfismi genici e il comportamento umano	516		
	Comportamento aggressivo, impulsivo e violento	517		
	Loci di suscettibilità alla schizofrenia	519		
	Il microbioma umano	519		
15.3	La biologia molecolare del cancro	519		
	L'attivazione di protooncogeni e oncogeni	521		
	► FOCUS 15.1 Il modo in cui le cellule tumorali metastatizzano: il ruolo di Src	524		
	L'inattivazione dei geni oncosoppressori	525		
	► MEDICINA 15.2 L'ipotesi dei "due colpi" di Knudson e il retinoblastoma	526		
	► FOCUS 15.2 La scoperta di p53	529		
	L'espressione alterata degli RNA non codificanti nel cancro	530		
	I riarrangiamenti cromosomici e il cancro	531		
	I virus e il cancro	532		
	► MEDICINA 15.3 Il virus del papilloma umano (HPV) e il cancro della cervice uterina	534		
	La cancerogenesi chimica	536		
15.4	La terapia genica	538		
	I progressi nella terapia genica	538		
	► MEDICINA 15.4 La terapia genica del cancro: una "bacchetta magica"?	538		
	► MEDICINA 15.5 Le terapie con RNAi	539		
	I vettori per la terapia genica delle cellule somatiche	539		
	► FOCUS 15.3 Il trasferimento genico mediato da retrovirus: come creare un "vettore sicuro"	541		
	► FOCUS 15.4 La prima morte causata dalla terapia genica	543		
	L'ingegneria genetica di miglioramento	544		
	La terapia genica delle malattie da immunodeficienza ereditaria	544		
	La terapia genica della fibrosi cistica	545		
	La terapia genica dell'HIV-1	546		
	► FOCUS 15.5 Il ciclo vitale di HIV-1	547		
	Il futuro della terapia genica	549		
	I CONCETTI IN SINTESI	550		
	I CONCETTI IN PRATICA	551		
	INDICE ANALITICO	553		