

Biologia di sistema (System Biology)

La Biologia di sistema studia gli organismi viventi come **sistemi complessi**, integrando dati molecolari e cellulari per capire le interazioni e prevedere il comportamento biologico.

Obiettivi

1) Descrivere contemporaneamente tutte le componenti costituenti il sistema in un dato istante

2) Descrivere i cambiamenti nel tempo del sistema (ad es. risposta a stimoli esterni)

Approccio Riduzionistico allo studio dei sistemi biologici (bottom-up)

Tradizionalmente, la biologia ha studiato i sistemi biologici "pezzo per pezzo", analizzando singoli geni, proteine o processi isolati. Questo metodo ha permesso molte scoperte fondamentali, ma spesso non riesce a spiegare come tutte queste componenti interagiscano insieme nel contesto complesso di un organismo vivente.

Limiti dell'approccio riduzionistico:

Studia le parti in modo separato, senza considerare le interazioni complesse

Difficile prevedere il comportamento globale del sistema biologico

Poco efficace per comprendere malattie multifattoriali o risposte complesse

Approccio Olistico allo studio dei sistemi biologici (up-down)

Le **scienze omiche** superano questi limiti studiando **tutte le componenti di un sistema contemporaneamente e integrando i dati per ottenere una visione completa e dinamica.**

Questo cambio di paradigma è alla base della **Biologia di sistema**, che mira a comprendere la rete di interazioni e i cambiamenti nel tempo.

Le Scienze Omiche

Le scienze omiche studiano in modo globale e sistematico le componenti biologiche di un organismo, generando **grandi quantità di dati**. Questi dati vengono archiviati in **database pubblici e gratuiti**, che permettono di integrarli e analizzarli per comprendere le interazioni molecolari e il funzionamento dei sistemi viventi.

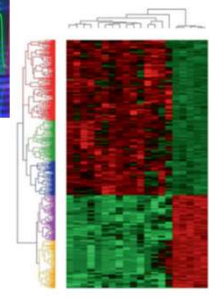
•Genomica

Studio dell'intero genoma (DNA)



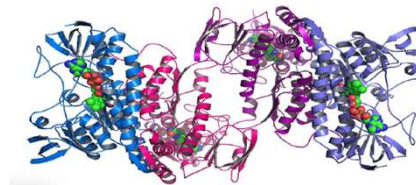
•Trascrittomica

Analisi di tutti gli RNA prodotti dai geni attivi



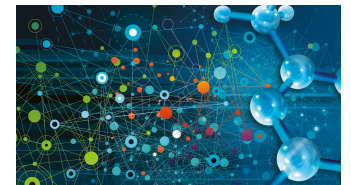
•Proteomica

Esplorazione dell'insieme delle proteine cellulari

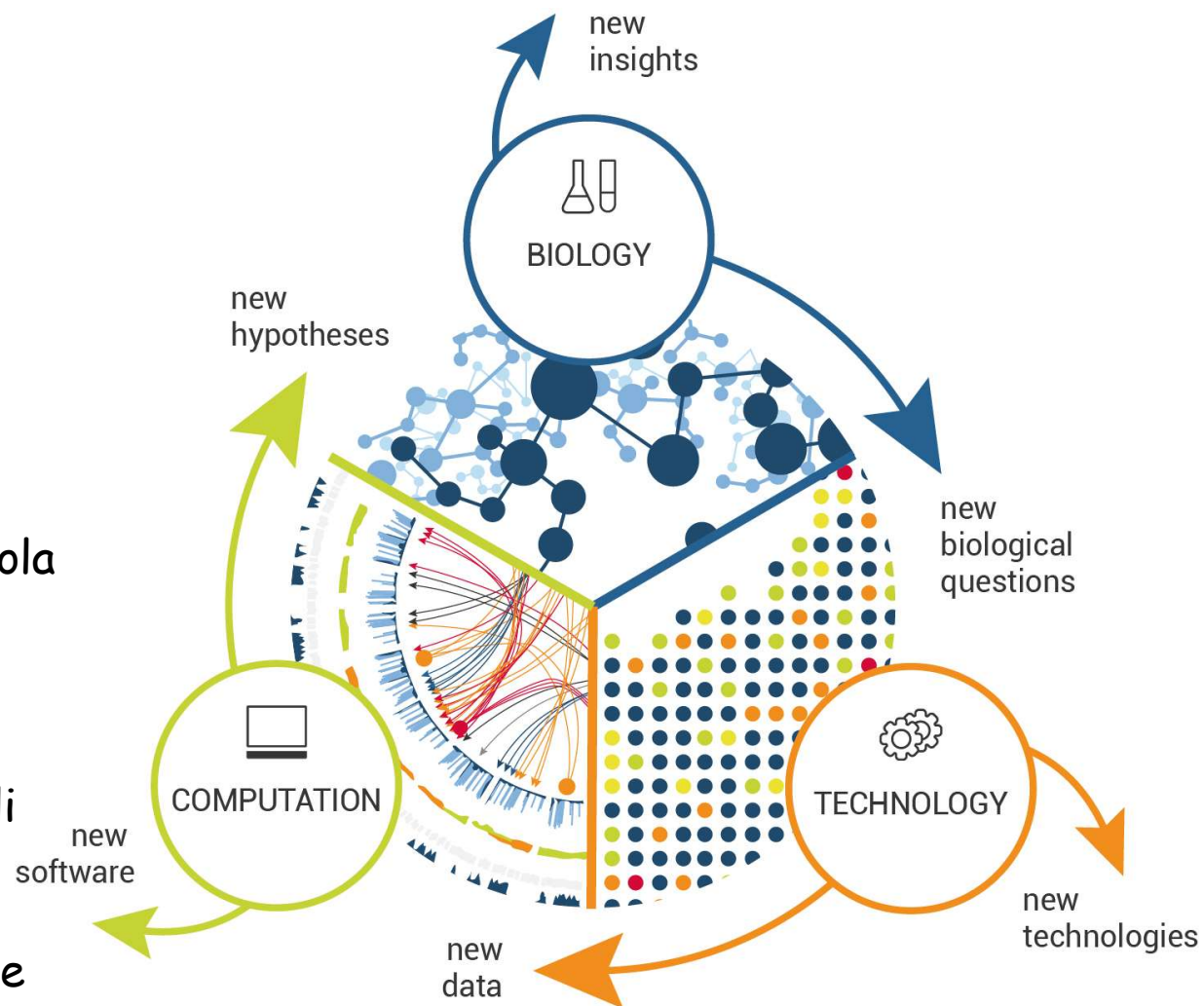


•Metabolomica

Studio delle piccole molecole e metaboliti prodotti del metabolismo



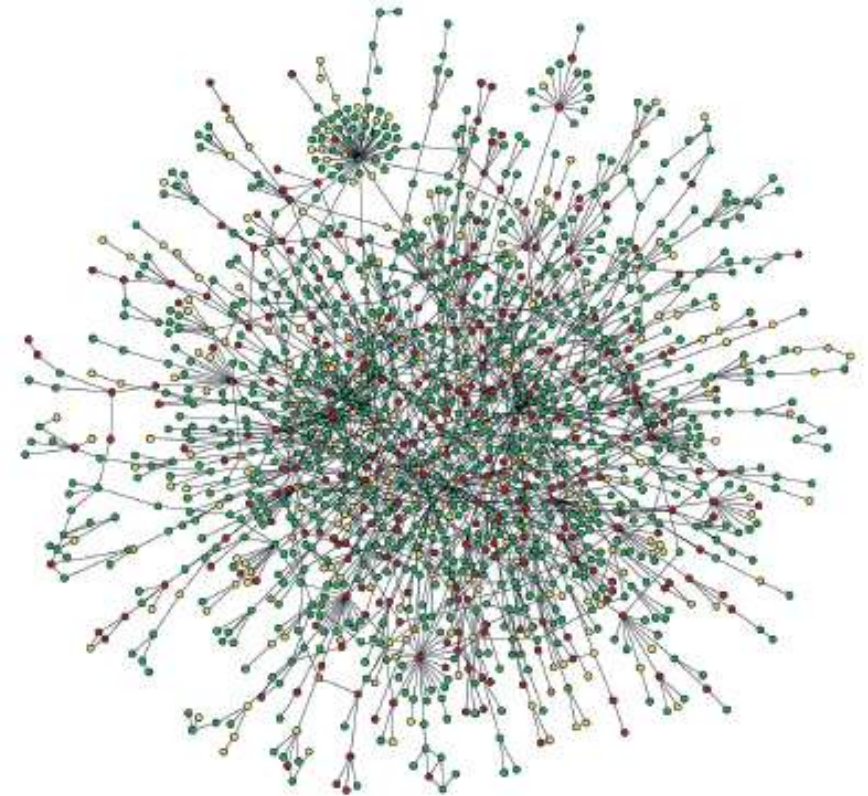
«La biologia di sistema e le scienze omiche si fondano su un'interazione continua e dinamica tra tre elementi chiave: la **biologia**, la **tecnologia** e la **computazione**. Questo ciclo virtuoso genera nuove domande biologiche, stimola lo sviluppo di tecnologie innovative, produce grandi quantità di dati e richiede nuovi strumenti computazionali per interpretarli. Grazie a questo processo integrato, è possibile ottenere nuove intuizioni e formulare ipotesi sempre più complesse, spingendo avanti la nostra comprensione dei sistemi biologici nel loro complesso.»



L'interattomica

Sfrutta i dati provenienti da altre analisi "omiche" per costruire modelli e reti di interazioni.

Elaborazione computazionale
integra questi dati per
ricostruire reti di interazioni,
ad esempio: proteina-proteina,
gene-proteina, pathway
metabolici.



Amplificazione/Clonazione

Ibridazione/Sonda

Sequenziamento

Clonazione del DNA

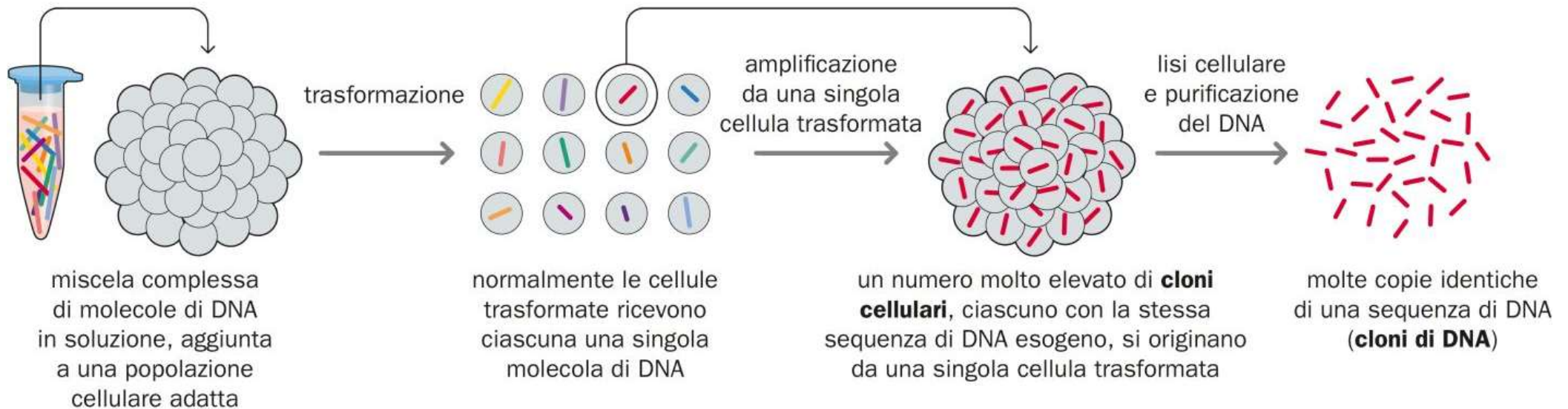
DNA eterologo inserito in vettori capaci di auto-replicarsi

Vettori ricombinanti inseriti in ospiti batterici

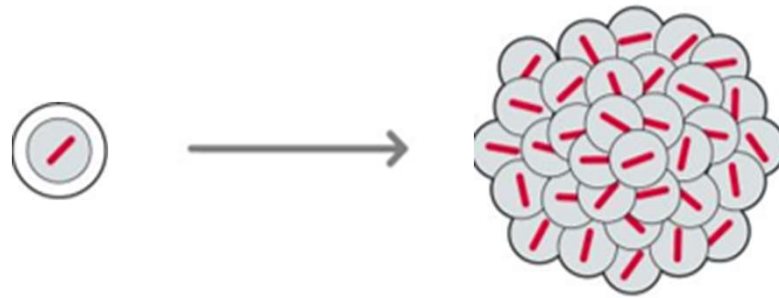
Amplificazione del plasmide ricombinante in molte copie

PCR- reazione a catena della polimerasi

Clonazione del DNA in batteri



Clonazione del DNA in batteri



Per essere trasmesso alle cellule figlie e amplificato numericamente, il DNA eterologo ricevuto in singola copia dalla prima cellula deve replicare.

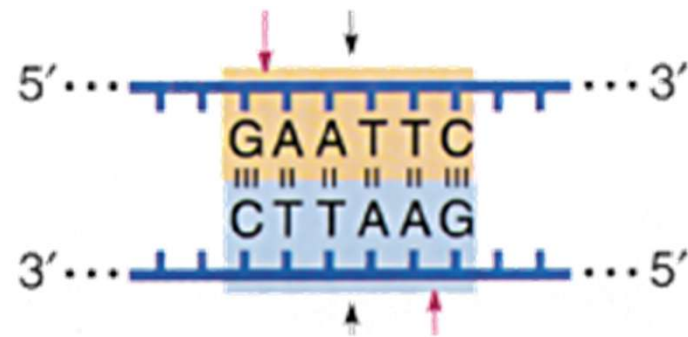
Per replicare, il DNA eterologo deve essere inserito in un «vettore» contenente elementi necessari al processo di replicazione.

Clonazione del DNA in batteri

Come si prepara un DNA da inserire in un vettore?

Enzimi di restrizione

Endonucleasi di origine batterica in grado di tagliare il DNA in specifici siti palindromici.



La frequenza con cui l'enzima di restrizione taglia il DNA, e quindi la dimensione dei frammenti che si ottengono, dipende dalla lunghezza in basi del sito di riconoscimento (Sito di restrizione)

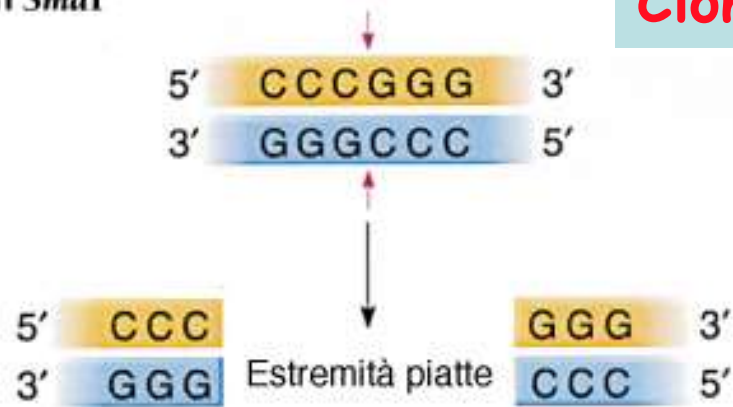
$1/4^n$ a n = numero di basi nella sequenza di restrizione

Sito di 4 basi= 1 taglio ogni 256 basi ($1/4^4$)

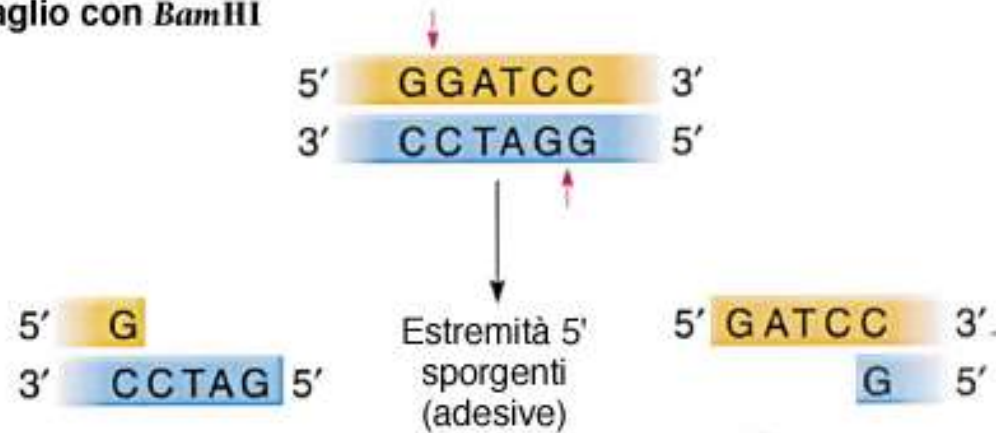
Sito di 6 basi= 1 taglio ogni 4096 basi ($1/4^6$)

Sito di 8 basi= 1 taglio ogni 65.476 basi ($1/4^8$)

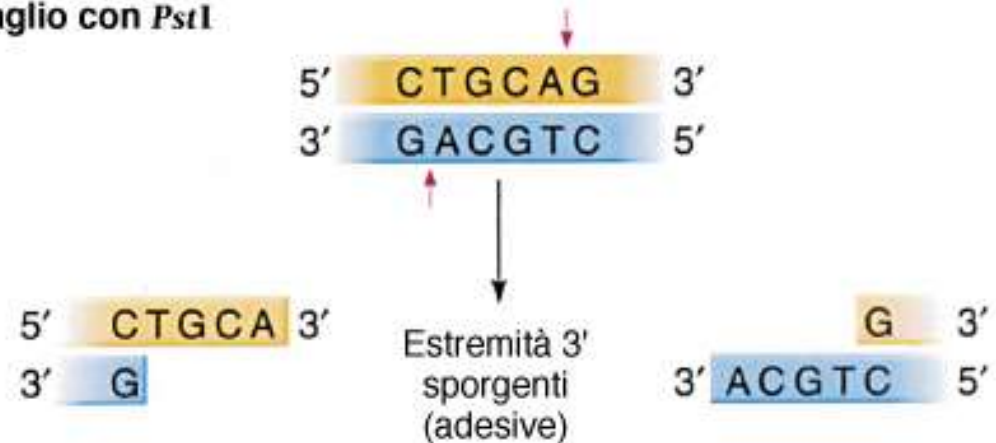
a) Taglio con *Sma*I



b) Taglio con *Bam*III



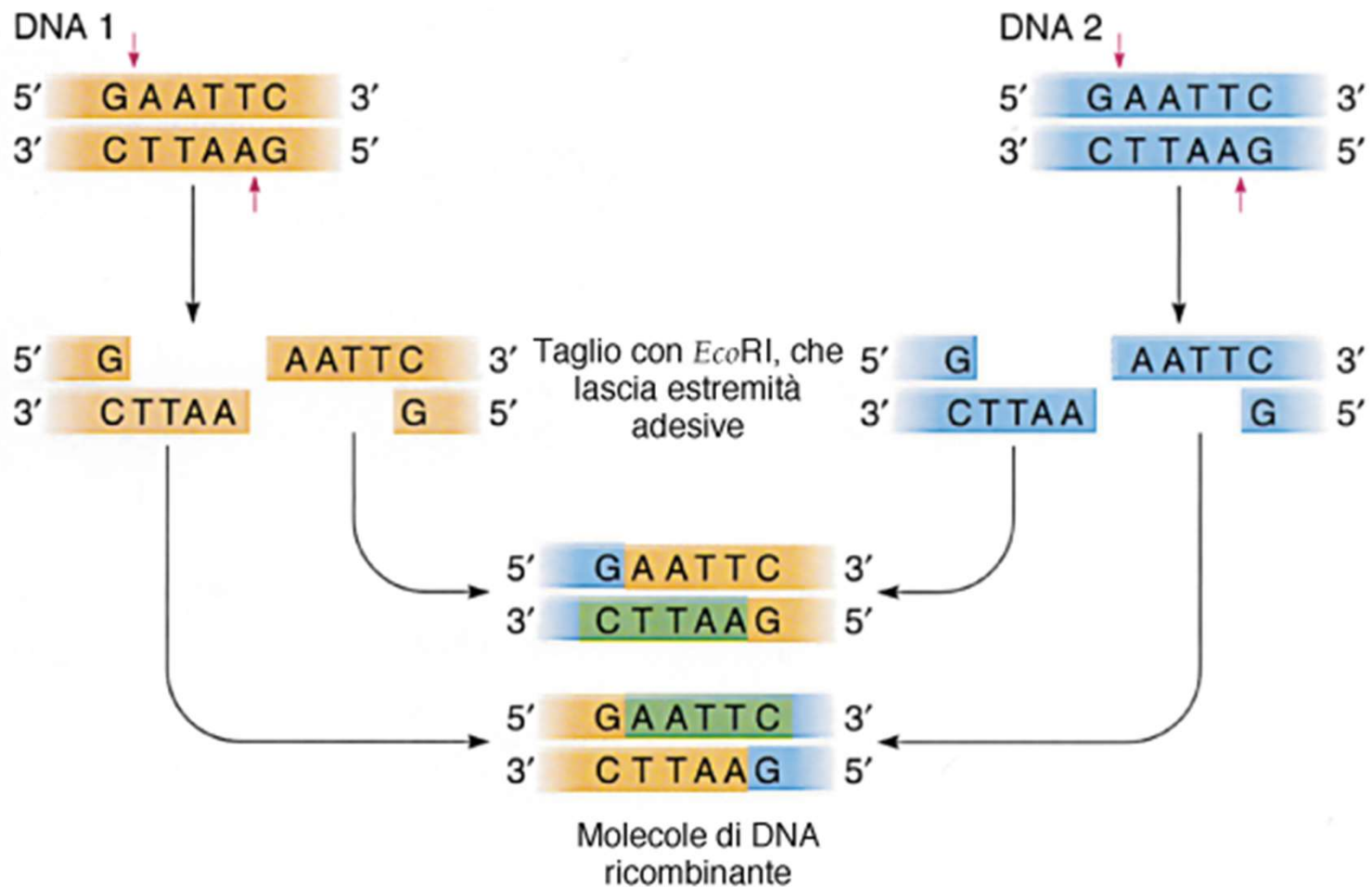
c) Taglio con *Pst*I



Gli enzimi di restrizione producono frammenti con estremità diverse

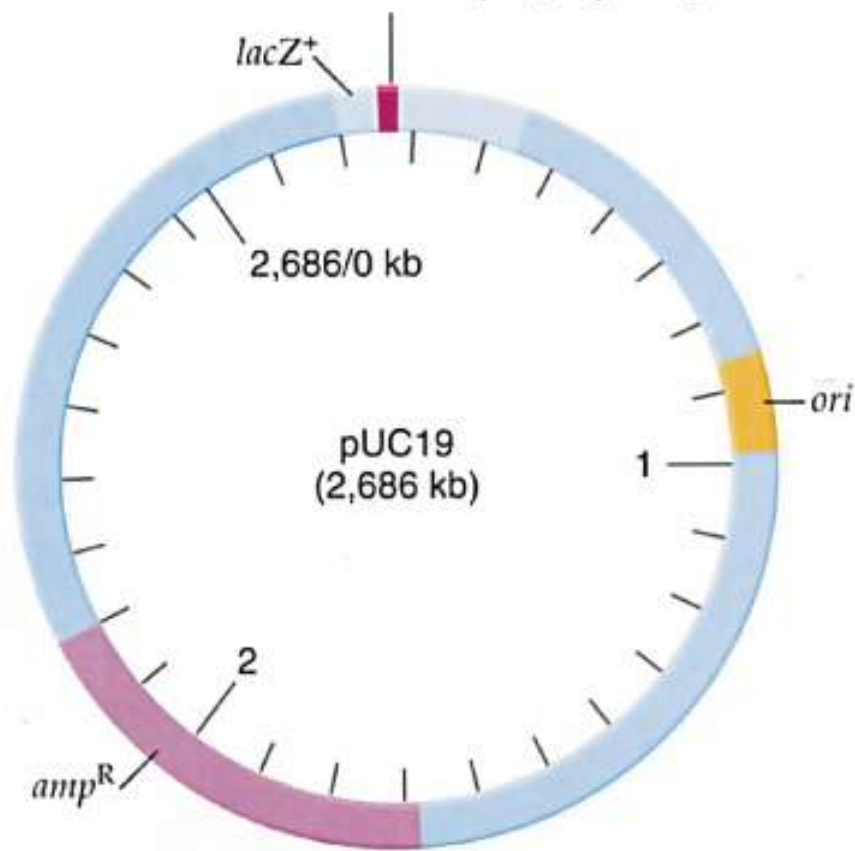
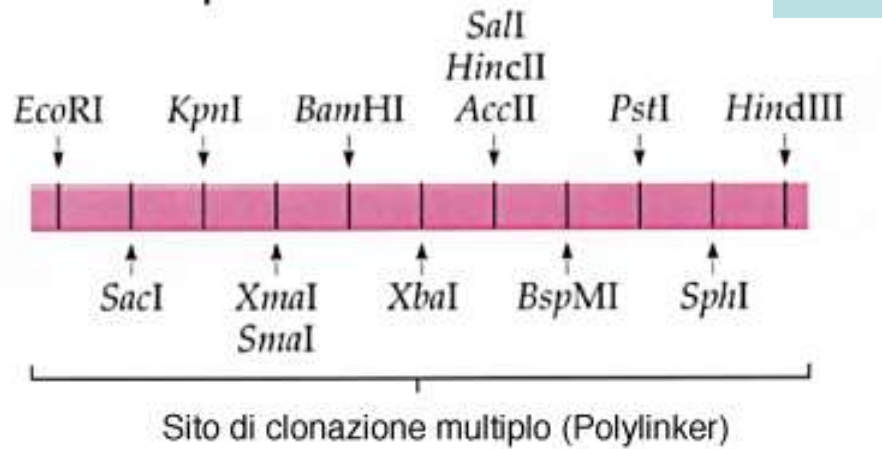
| Enzima | Sito di riconoscimento | N. basi | Estremità prodotte | Origine dell'enzima |
|---------------|-------------------------------|----------------|---------------------------|-------------------------------------|
| <i>EcoRI</i> | <i>G/AATTC</i> | 6 | 5' sporgente | <i>Escherichia Coli</i> |
| <i>BamHI</i> | <i>G/GATCC</i> | 6 | 5' sporgente | <i>Bacillus Amyloliquefaciens H</i> |
| <i>BglII</i> | <i>A/GATCT</i> | 6 | 5' sporgente | <i>Bacillus globigii</i> |
| <i>PstI</i> | <i>CTGCA/G</i> | 6 | 3' sporgente | <i>Providencia stuartii</i> |
| <i>XmaI</i> | <i>C/CCGGG</i> | 6 | 5' sporgente | <i>Xanthomonas malvacearum</i> |
| <i>SmaI</i> | <i>CCC/GGG</i> | 6 | piatte | <i>Serratia marcescens</i> |
| <i>Sau3A</i> | <i>/GATC</i> | 4 | 5' sporgente | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| <i>AluI</i> | <i>AG/CT</i> | 4 | piatte | <i>Arthrobacter luteus</i> |
| <i>NotI</i> | <i>GC/GGCCGC</i> | 8 | 5' sporgente | <i>Nocardia odititis</i> |
| <i>PacI</i> | <i>TTAAT/TAA</i> | 8 | 3' sporgente | <i>Pseudomonas alcaligenes</i> |

Creazione di una molecola di DNA ricombinante



Clonazione del DNA in batteri

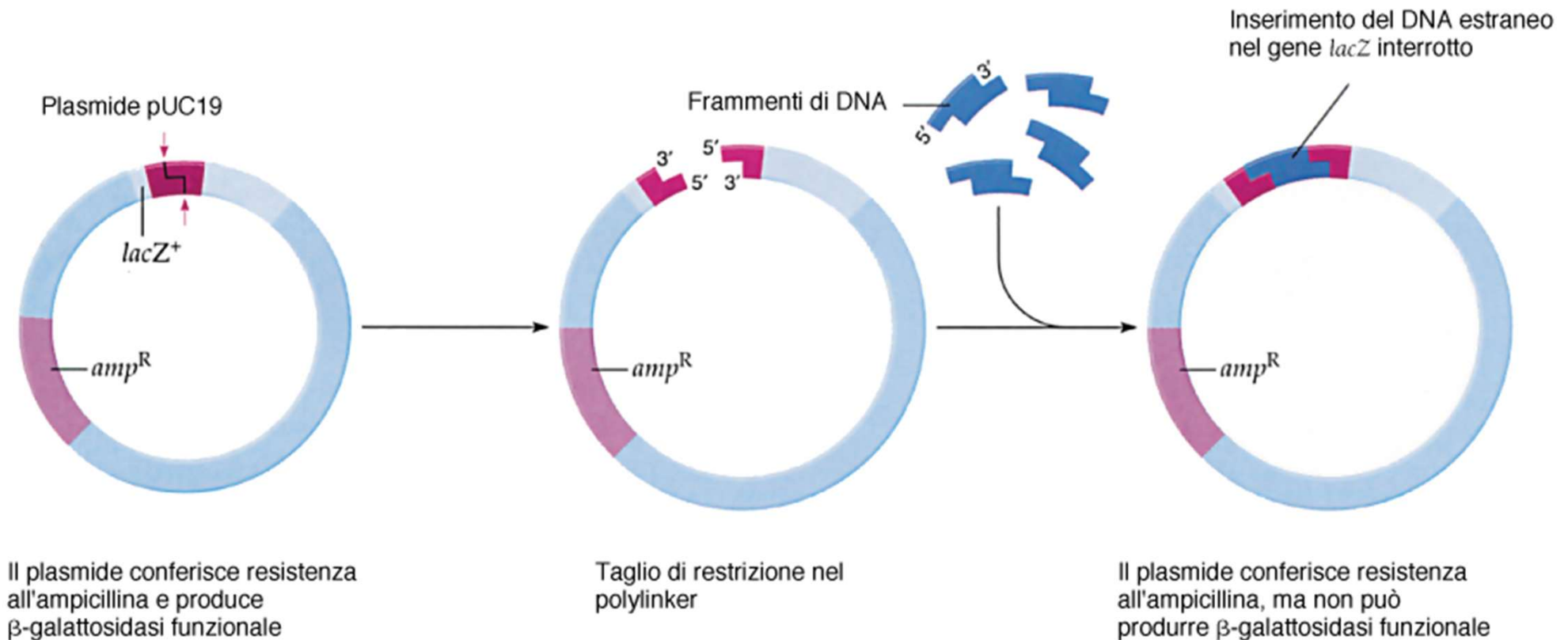
Vettore di clonazione pUC19



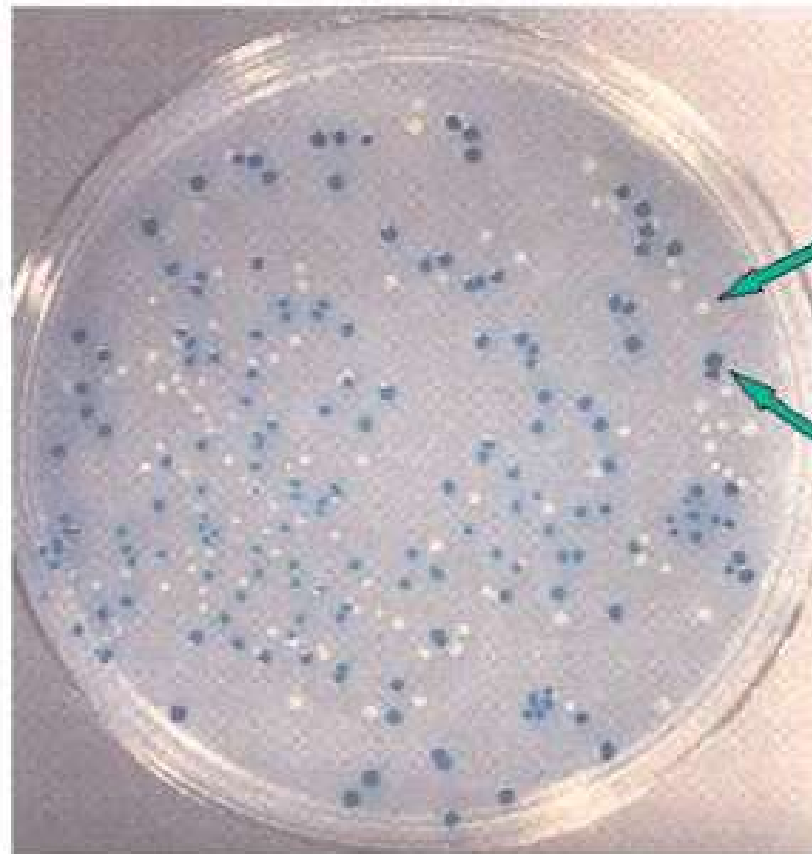
- ori* = Sequenza di origine di replicazione
- amp^R* = Gene per la resistenza alla ampicillina
- lacZ⁺* = Parte del gene per la β -galattosidasi

Clonazione di DNA:
vettori plasmidici

Clonaggio di DNA eterologo in PUC19



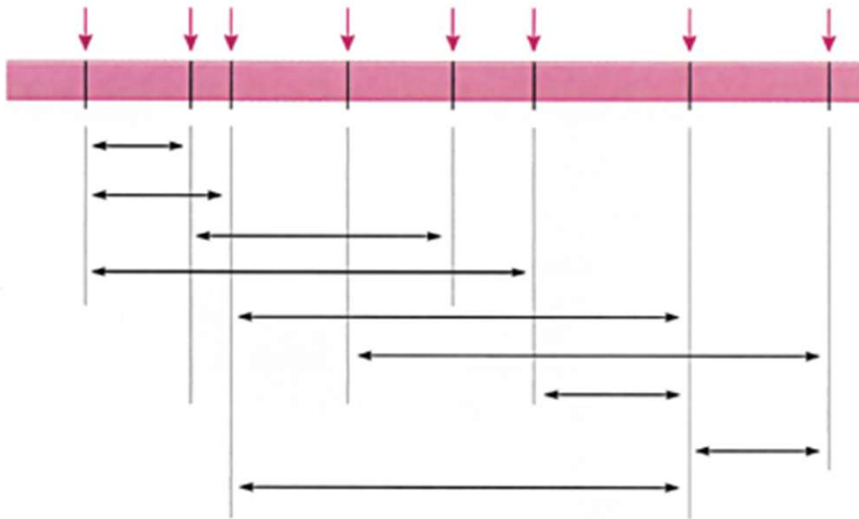
Clonazione del DNA in batteri



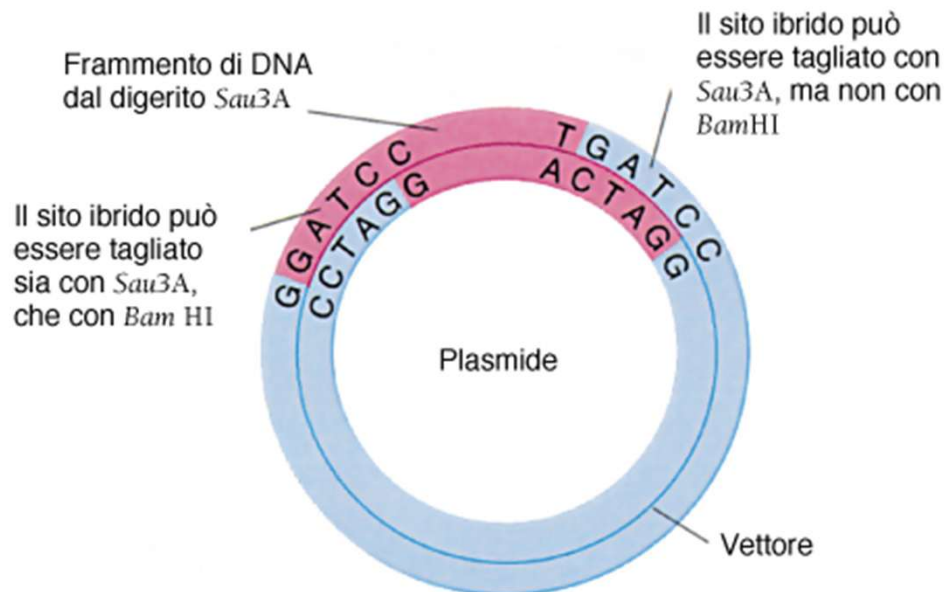
Colony with insert

Colony with no insert

a) Digestione parziale di DNA con un enzima di restrizione, per es. *Sau3A*, che genera una serie di frammenti sovrapposti, ciascuno con estremità appiccicose identiche 5' GATC



b) I frammenti risultanti possono essere inseriti nel sito *Bam*HI del vettore plasmidico

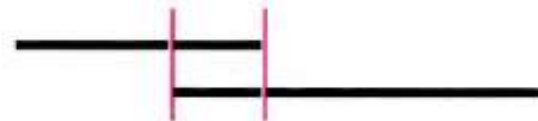


Realizzazione di una banca genomica in vettore plasmidico

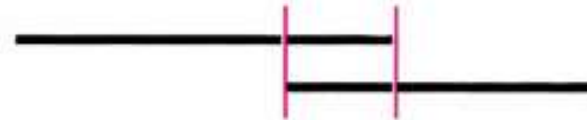
Realizzazione di una *libreria genomica ordinata*



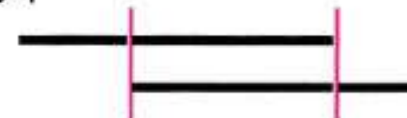
(a) Il clone 1 ibrida al clone 2

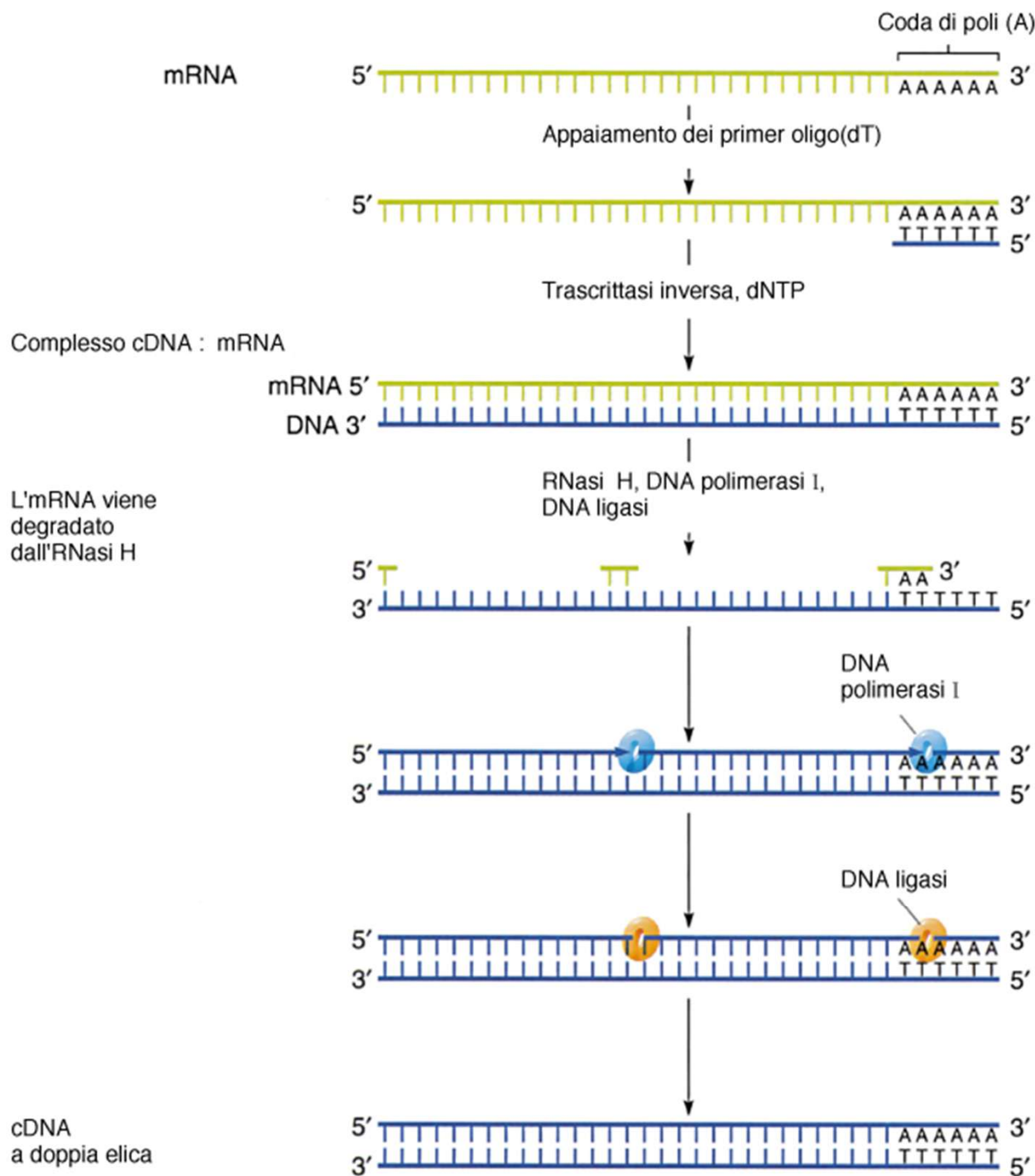


(b) Il clone 2 ibrida al clone 3



(c) Il clone 3 ibrida al clone 4



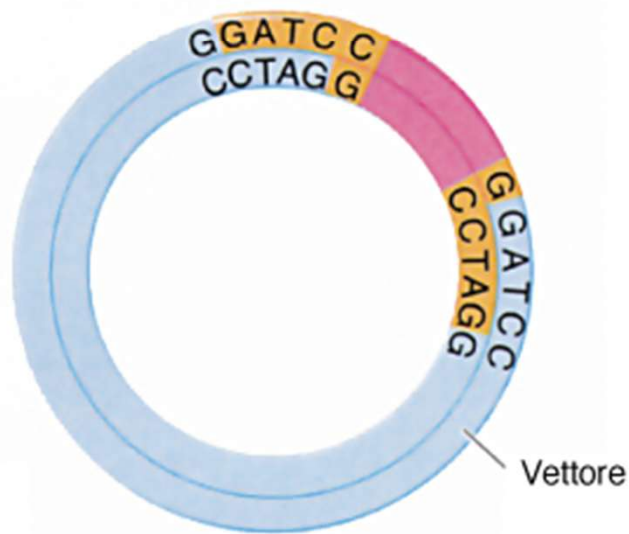
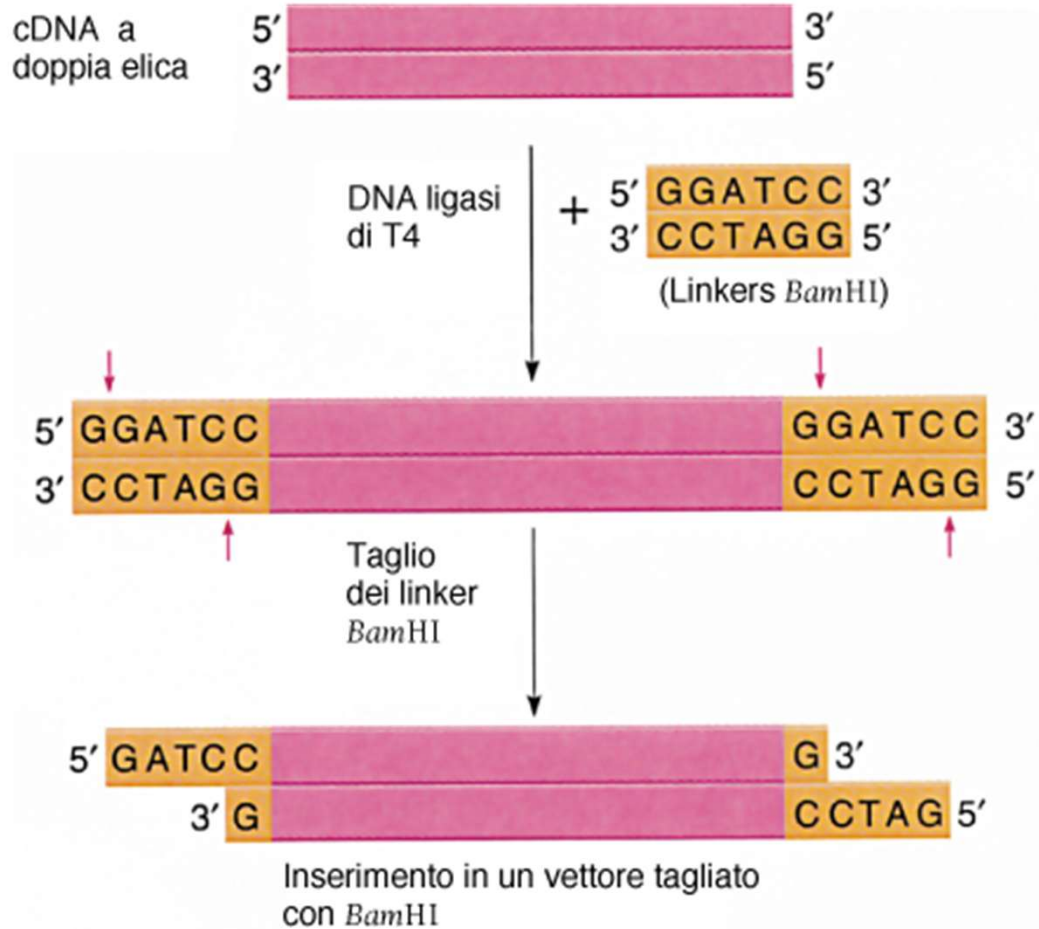


Realizzazione di una banca di cDNA: retrotrascrizione di mRNA

Frammenti di RNA degradato vengono usati come primer per nuova sintesi di DNA

La DNA polimerasi I sintetizza a pezzi una nuova elica di DNA e rimuove gli RNA primer

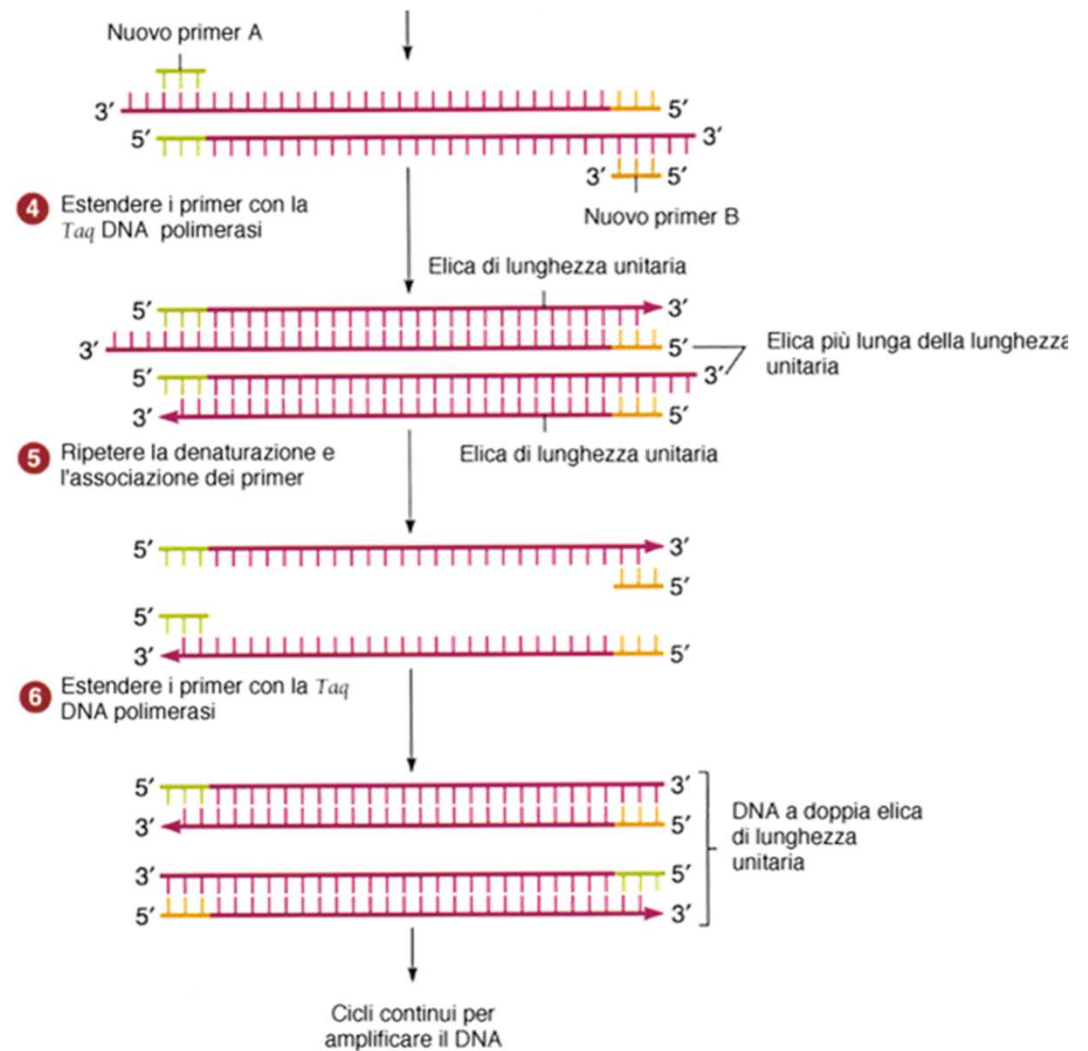
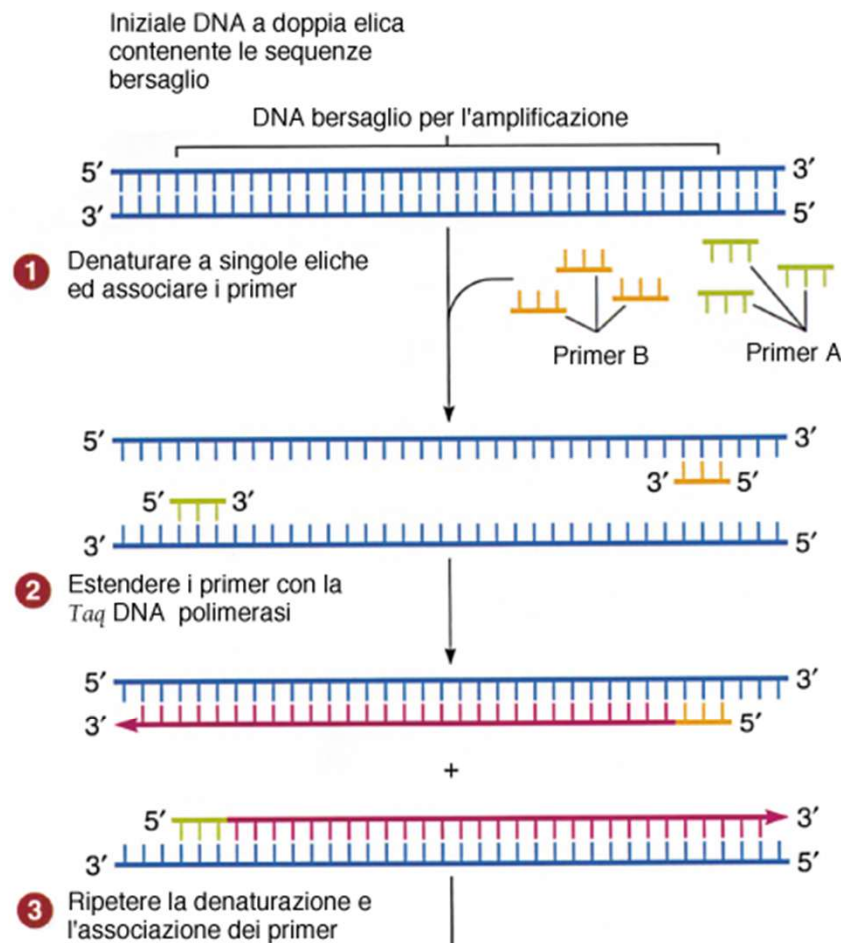
I frammenti di DNA vengono legati dalla DNA ligasi



Realizzazione di una banca di cDNA : clonazione dei cDNA in vettori plasmidici

Reazione a catena della Polimerasi PCR

Mullis- Nobel 1993



La PCR quantitativa. Real Time PCR

La Real-Time PCR è una particolare tecnica che permette di visualizzare una reazione di PCR "in tempo reale", cioè mentre essa avviene.

La Real-Time PCR ci permette di misurare precisamente la quantità di DNA template presente nel nostro campione.

Real-Time PCR è diventata una tecnica fondamentale della biologia molecolare per:

- **L'analisi dell'espressione genica**
- **Diagnosi e gestione delle malattie**
 - Quantizzazione della carica virale
 - Identificazione della malattia minima residua
- **Analisi degli Alimenti**
 - Individuazione di OGM
- **Gestione delle procedure di incrocio nell'industria zootecnica e in agricoltura**

Per capire la Real Time PCR immaginiamo cosa accade in tubo di PCR



Cosa c'è nella provetta al 25° ciclo?

Un mix di nucleotidi, primers, DNA template, enzima e... (per esempio) **1.000.000 di copie di amplificato.**



Cosa c'era nella provetta al 24° ciclo?

500,000 copie dell'amplificato

e al 23°?

250,000 copie

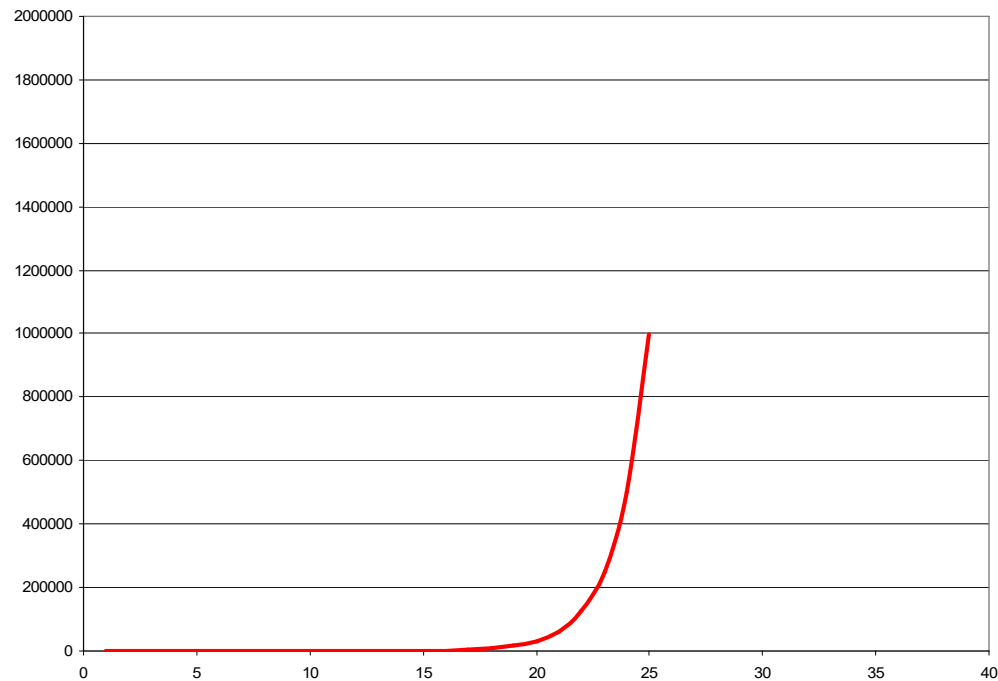
E al 22°?

125,000

Clonazione del DNA in vitro



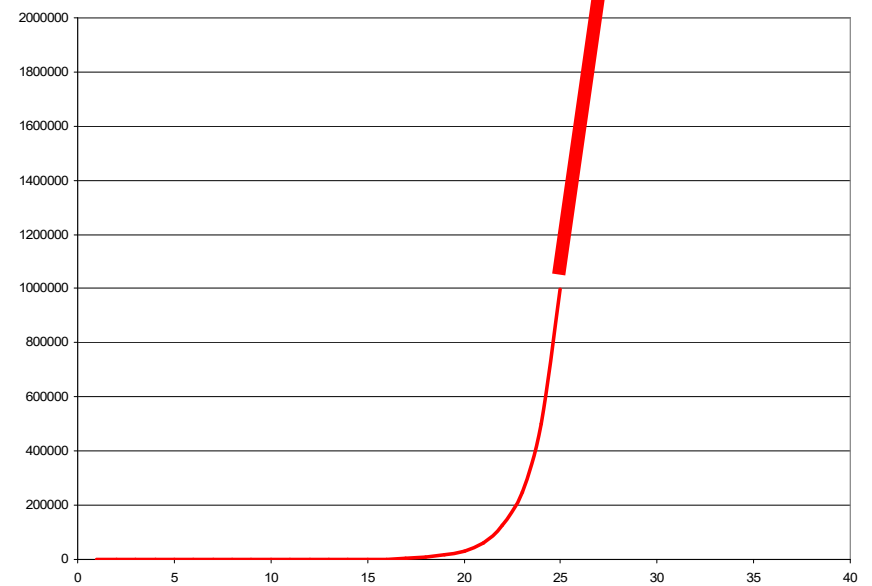
Il grafico relativo alla nostra reazione fino al 25° ciclo potrebbe essere questo



Clonazione del DNA in vitro



Cosa ci aspettiamo che avvenga nei cicli successivi?



Clonazione del DNA in vitro



26° ciclo?

2,000,000 ampliconi.

27° ciclo?

4,000,000 ampliconi.

E al 200° ciclo?

In teoria dovremmo avere

1,000,000,000,000,000,000,000,000,000,000,000,000,000,000,
000,000,000,000,000,000 ampliconi...

Cioè 10^{35} tonnellate di DNA...

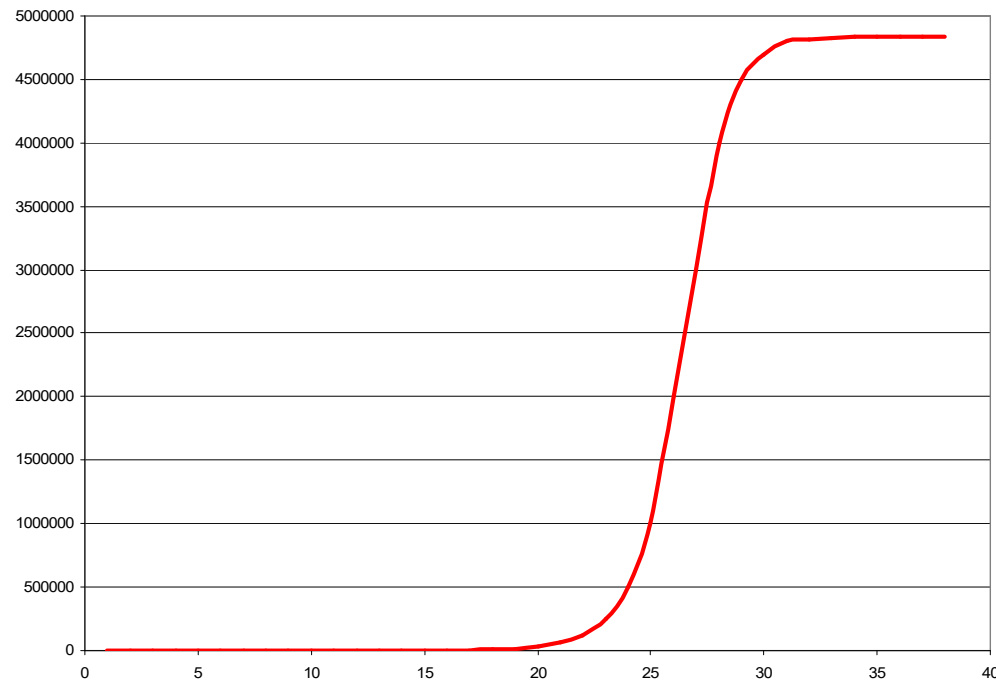
Praticamente il peso di di 10 miliardi di pianeti grandi come la
terra.



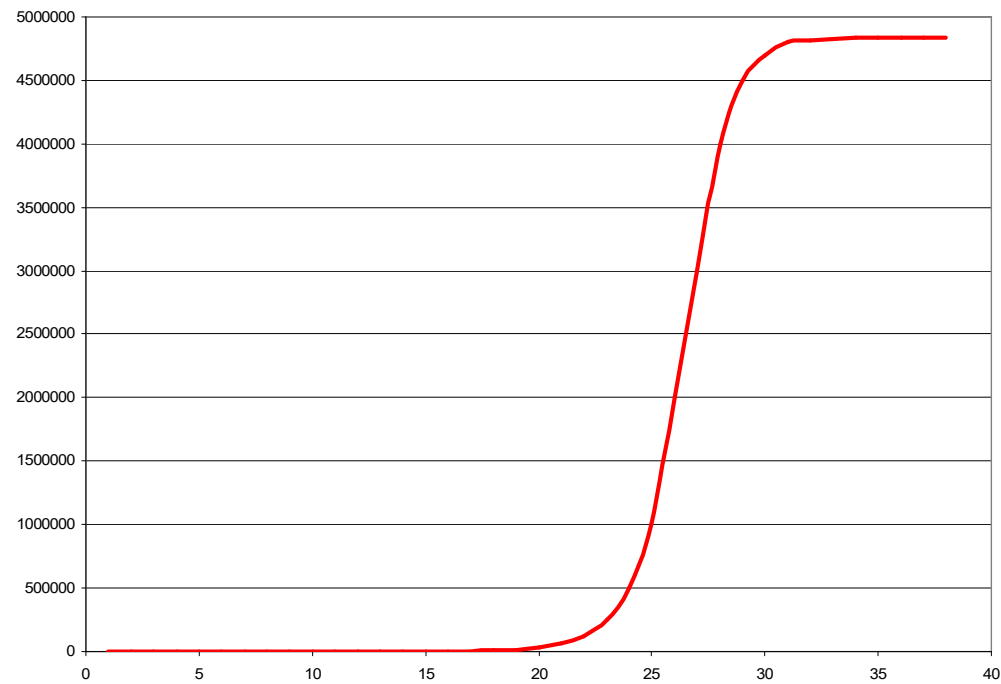
Clonazione del DNA in vitro



Quello che in realtà accade è questo:

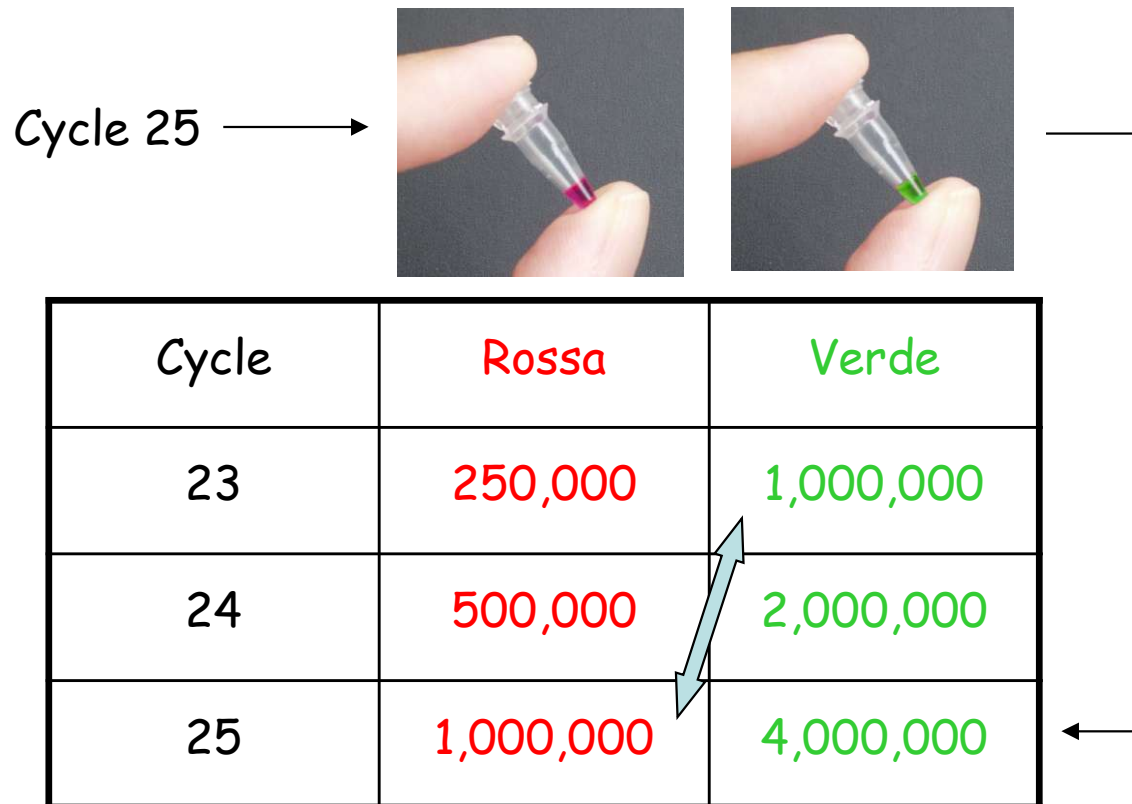


Come possiamo usare tutto questo per misurare il DNA templato?



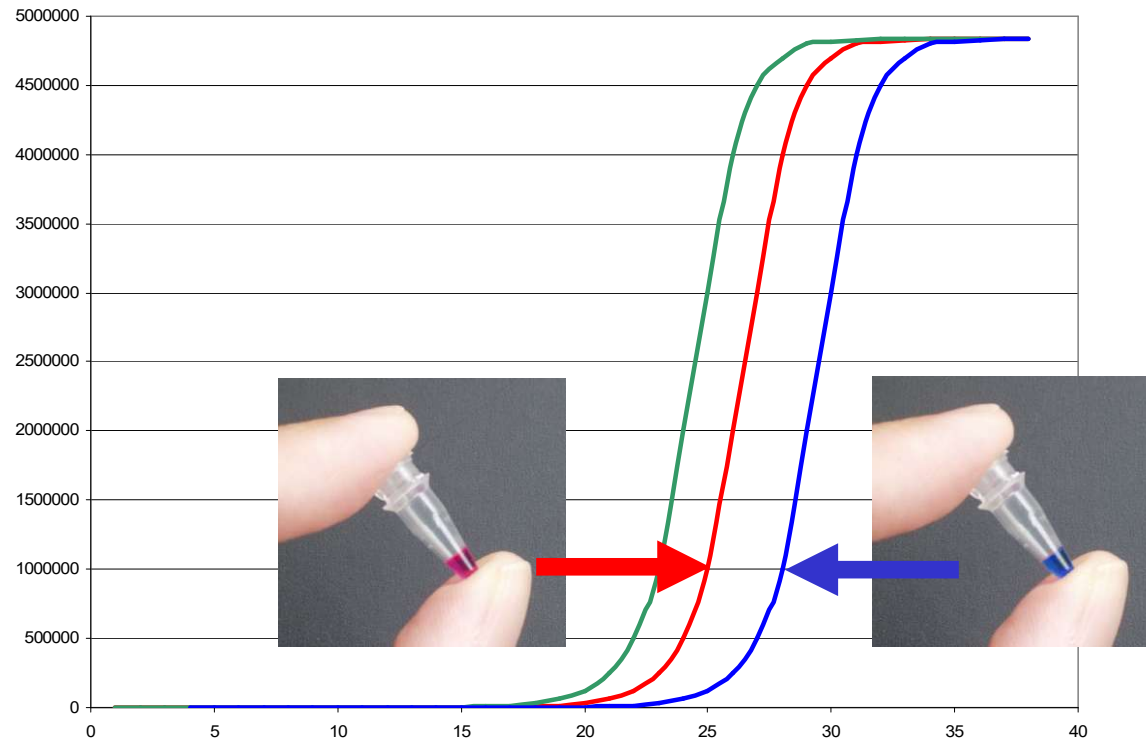
Clonazione del DNA in vitro

Immaginiamo che nella provetta verde ci sia una quantità di DNA template quadruplo rispetto alla rossa



Clonazione del DNA in vitro

Ed ora immaginiamo una provetta blu con una quantità di DNA otto volte inferiore alla verde

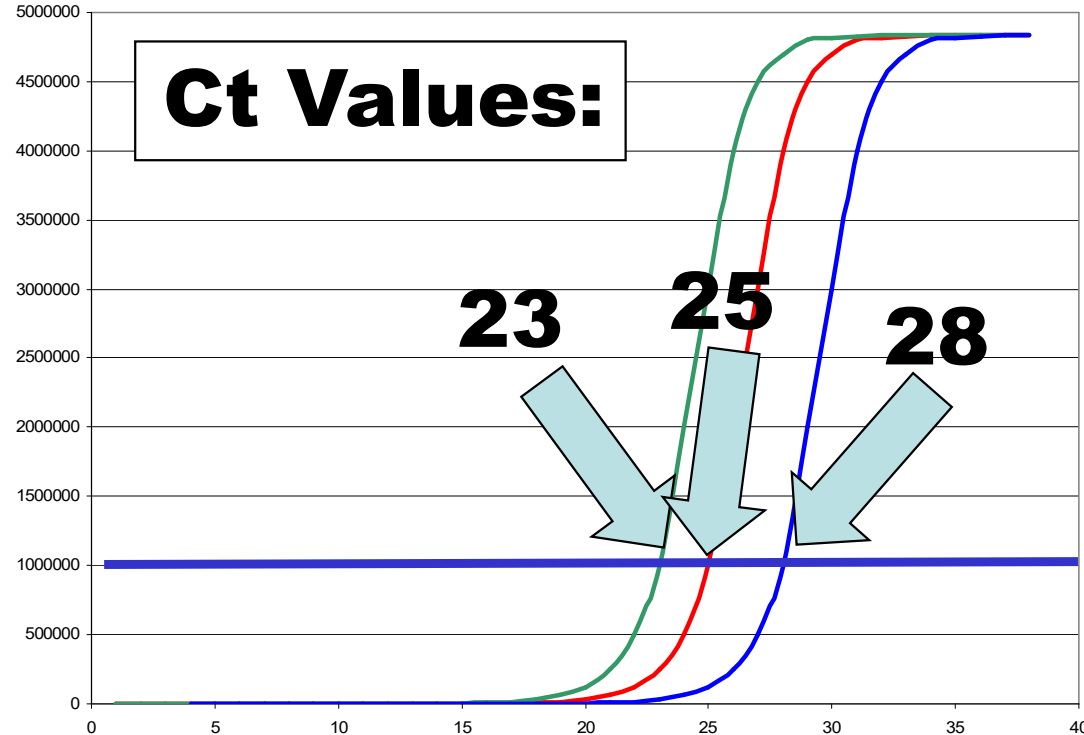


Clonazione del DNA in vitro

Il punto in cui ciascuna linea interseca la soglia che abbiamo arbitrariamente posto a 1.000.000 di copie, rappresenta il **valore Ct (Cycle threshold)**, ossia il numero di cicli serviti a ciascun campione per amplificare 1,000,000 di copie

Il Ct Value è direttamente correlato all'quantità di DNA iniziale.

$$\text{Quantità} = 2^{\text{Ct}}$$



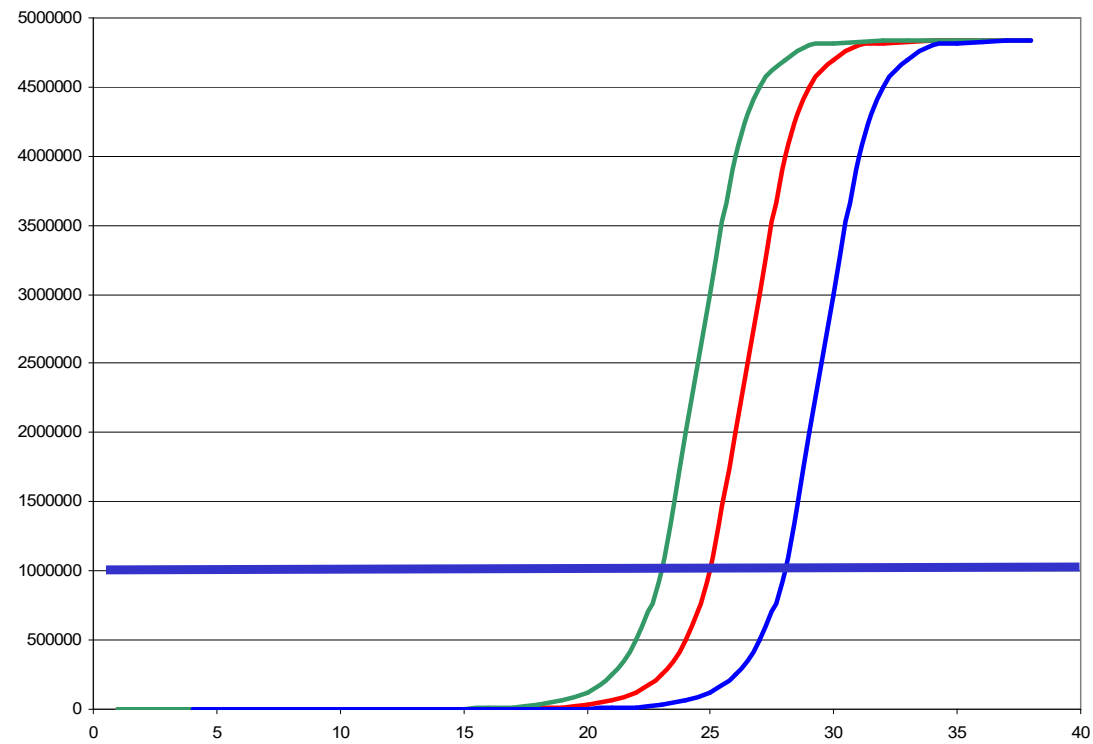
Quindi...



**4 units
Ct=23**

**1 unit
Ct=25**

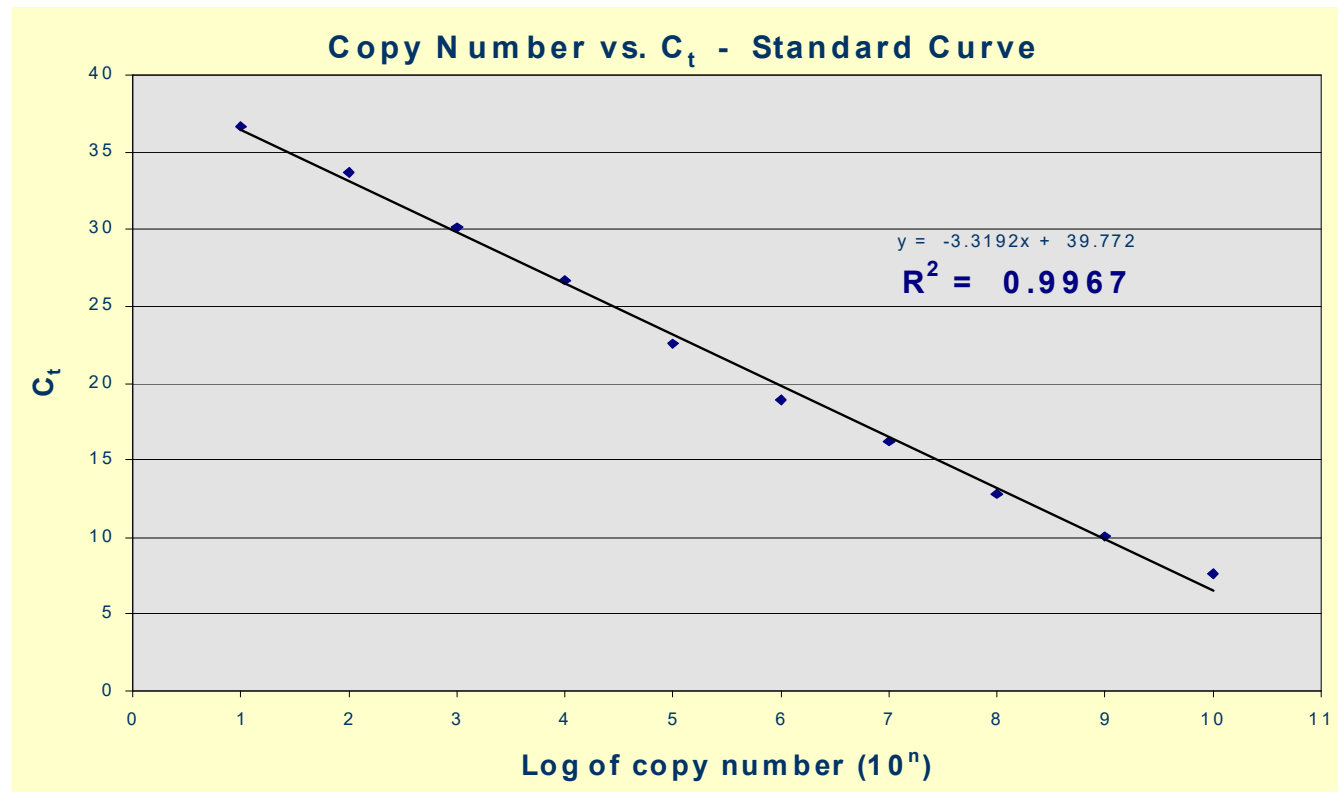
**1/8 unit
Ct=28**



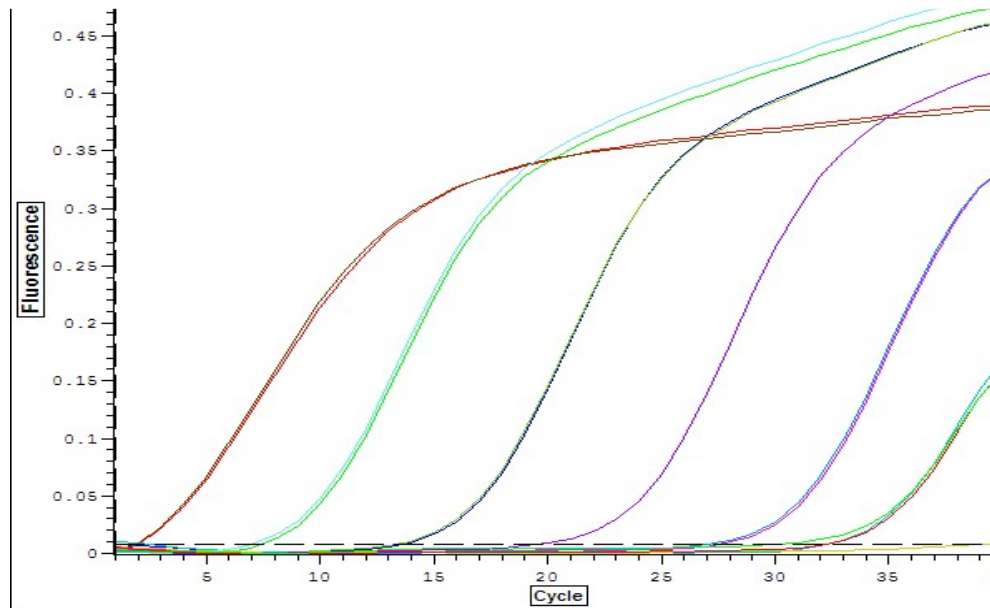
C'è una relazione diretta tra la quantità di DNA iniziale e il numero di cicli che servono a raggiungere un numero arbitrario di copie di DNA (C_t value).

$$\text{Quantità} = 2^{\text{Cycle Number}} = 2^{C_t}$$

Curva standard



Ma in pratica come si misura la quantità di DNA?



Si usano reagenti che emettono fluorescenza in presenza del DNA amplificato

L'**Etidio Bromuro** ed il **Cyber Green** sono due di questi reagenti.

Essi si legano al DNA a doppio filamento ed emettono luce quando colpite da una radiazione ad un certa lunghezza d'onda

Clonazione del DNA in vitro

1 Heat denaturation



2 Primer annealing



3 Extension



La quantità di fluorescenza rilevata dalla macchina aumenta mano a mano che aumenta il DNA amplificato. La quantità di DNA prodotta correla con la quantità di fluorescenza.

Lo strumento della Real-time PCR consiste di TRE component principali:

- 1. Un termociclatore (PCR machine)**
- 2. Un modulo ottico (che raccoglie la fluorescenza direttamente durante la reazione di PCR)**
- 3. Un Computer (che traduce la fluorescenza in valori numerici)**