

**Amplificazione/Clonazione**

**Ibridazione/Sonda**

**Sequenziamento**

# Sonda molecolare a DNA

**Sonde radioattive o "calde"**, marcate con **radioisotopi**, le più sensibili (picogrammo).

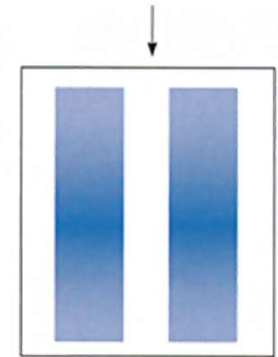
**Le sonde "fredde"** sono marcate con **biotina**, una vitamina idrosolubile (vitamina H) che si lega alle basi e con **digossigenina**, uno steroide vegetale che modifica chimicamente nucleotidi pirimidinici.

La biotina viene riconosciuta da una proteina batterica, la **streptavidina**, con la quale instaura un legame ad affinità talmente elevata da essere considerato uno dei più forti conosciuti in biologia.

La digossigenina incorporata nei nucleotidi pirimidinici viene invece legata da un **anticorpo specifico**.

La visualizzazione dell'interazione sonda-molecola bersaglio avviene però solo se la streptavidina e l'anticorpo anti-digossigenina sono coniugati con **fluoròfori** o **enzimi** (come la fosfatasi alcalina e la perossidasi) che permettano l'emissione di luce o la produzione di un colore in saggi di chemiluminescenza o colorimetrici.

5 I frammenti di DNA si trasferiscono esattamente come sono ordinati nel gel di agoroso



Ibridazione con sonda marcata

6 I frammenti di DNA complementari alla sonda sono visibili per autoradiografia o chemiluminescenza



Le sonde sono usate per identificare (saggi di ibridazione) o isolare (saggi di purificazione) sequenze specifiche in una popolazione eterogenea di DNA.

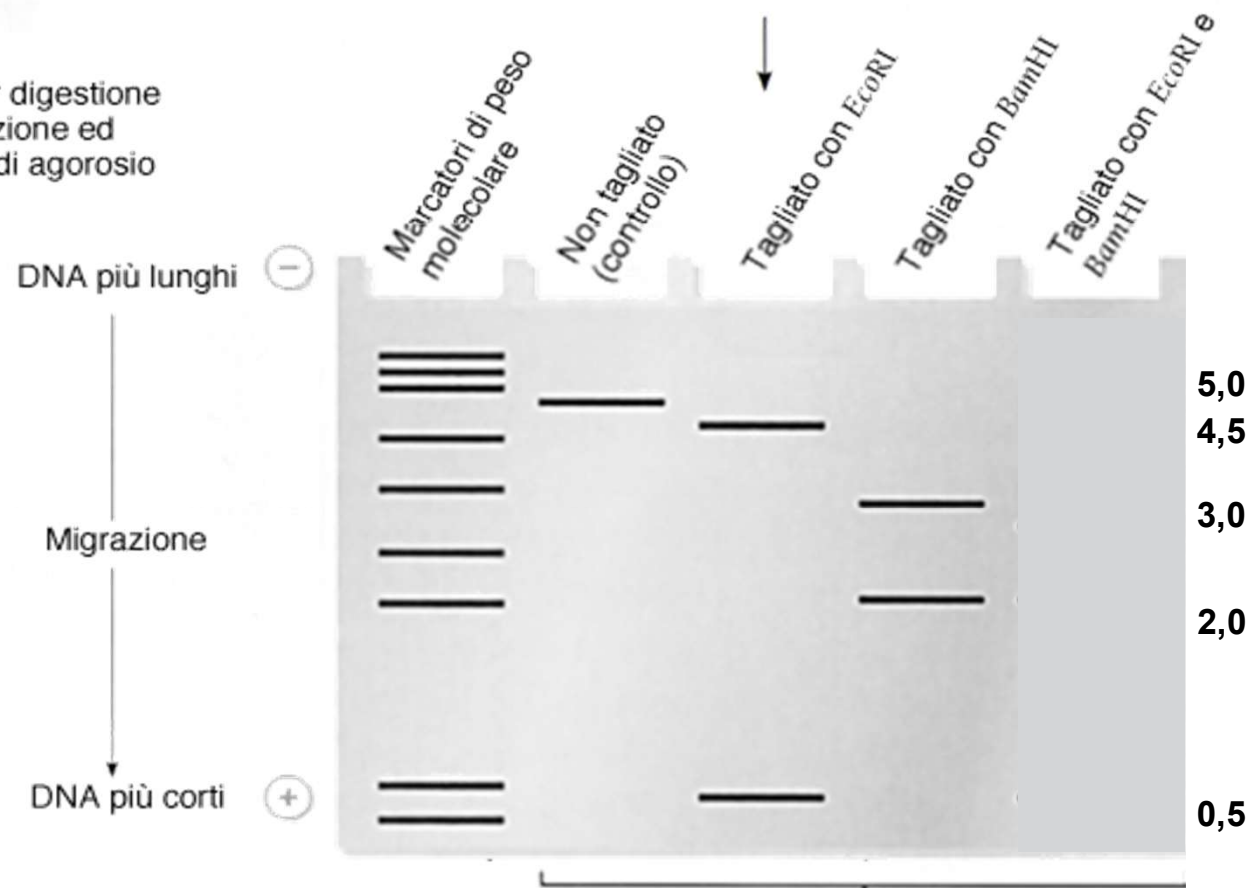


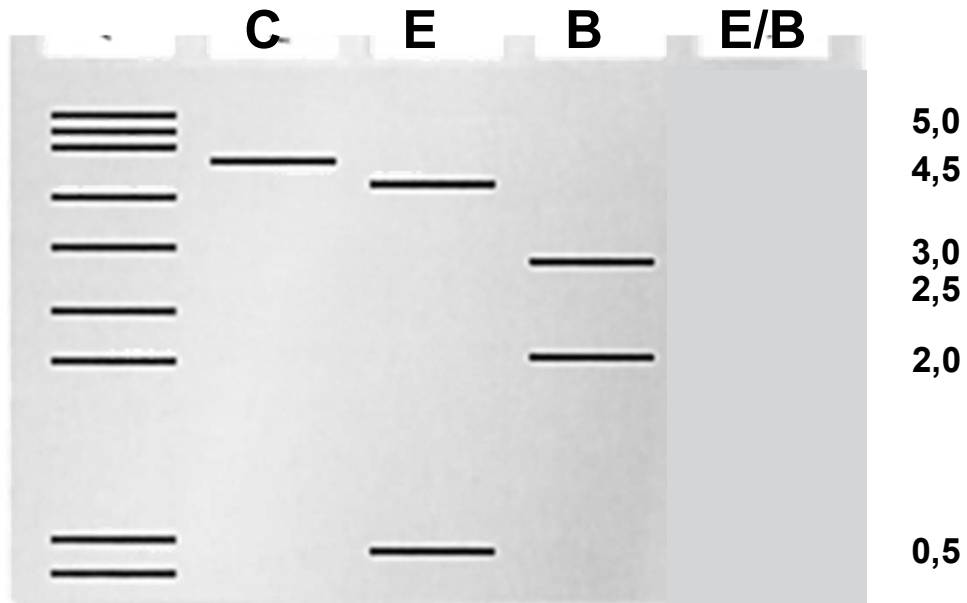
# Costruzione di una mappa di restrizione per EcoRI e BamHI in un frammento di DNA

1 Popolazione di frammenti lineari di DNA di 5,0 kb clonati



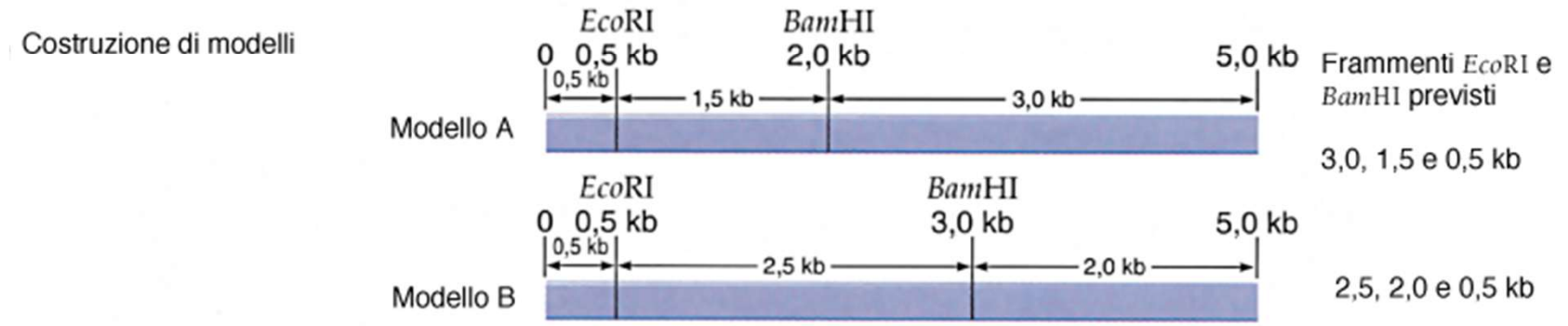
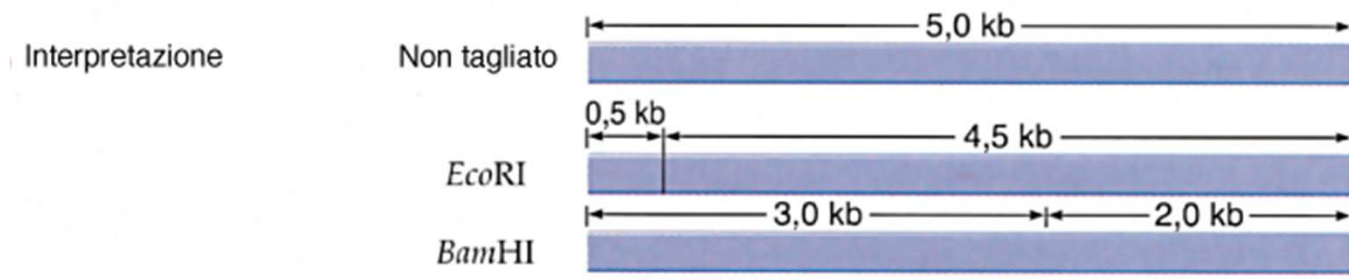
2 Analisi del DNA per digestione con enzimi di restrizione ed elettroforesi su gel di agarosio





Risultati

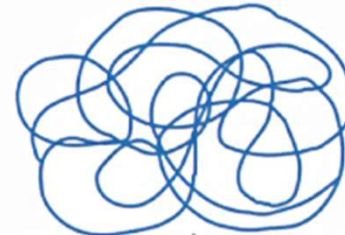
Non tagliato	<i>EcoRI</i>	<i>BamHI</i>	<i>EcoRI</i> + <i>BamHI</i>
5,0 kb	4,5 kb 0,5 kb	3,0 kb 2,0 kb	2,5 kb 2,0 kb 0,5 kb



Si può frammentare con enzimi di restrizione  
tutto il DNA genomico  
e valutarne specifici profili di frammenti di  
restrizione

# SOUTHERN BLOTTING

1 DNA cellulare

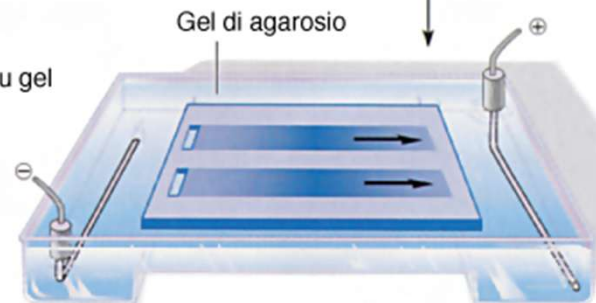


Digestione con enzima di restrizione

2 La lunghezza dei frammenti di restrizione è determinata dalla posizione delle sequenze di riconoscimento per l'enzima di restrizione

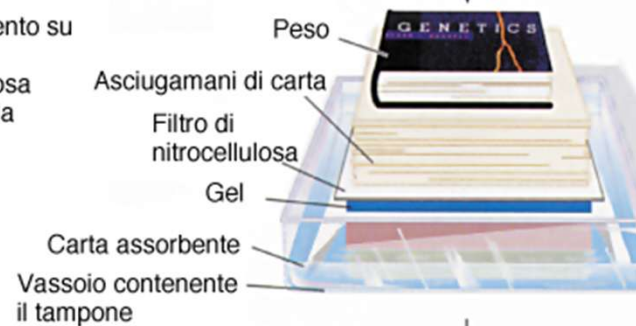


3 Elettroforesi su gel dei frammenti



Dopo colorazione con bromuro di etidio, i frammenti di DNA sono visibili ai raggi UV

4 Trasferimento su filtro di nitrocellulosa mediante la tecnica di Southern



Un sito di restrizione, e quindi il profilo di restrizione di un pezzo di DNA digerito con il relativo enzima di restrizione, può variare per:

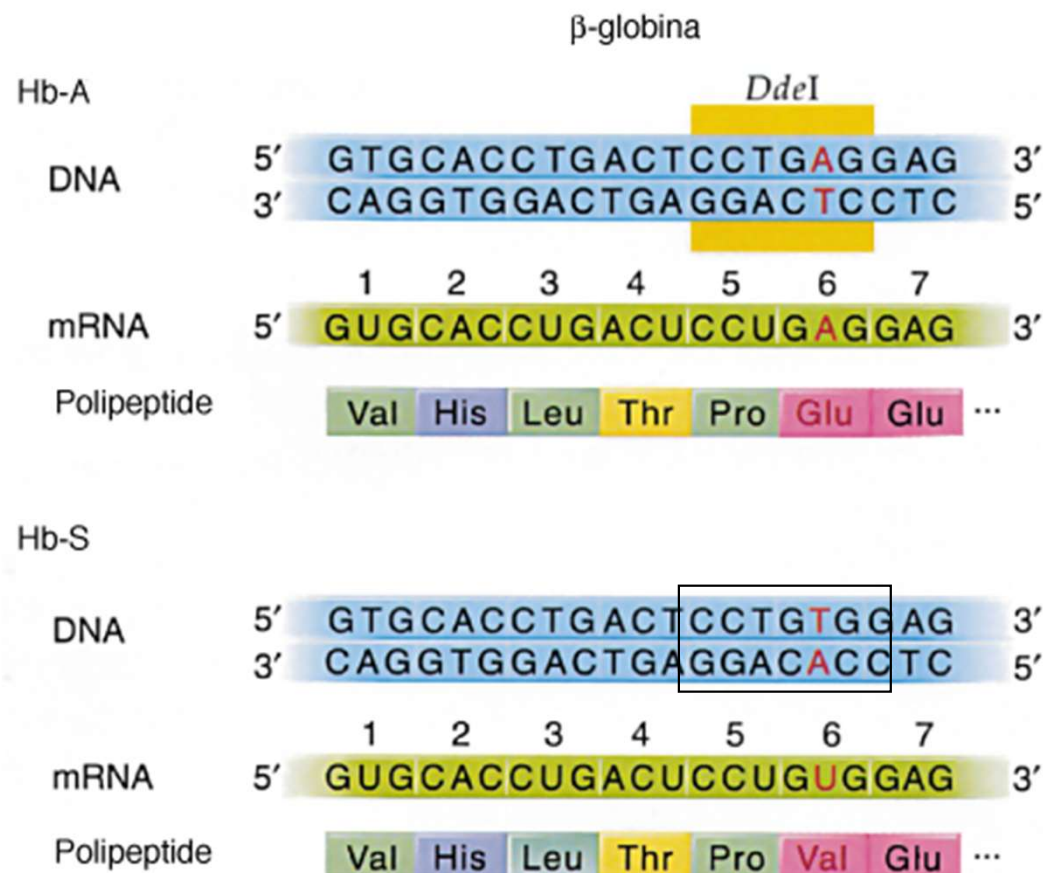
- Mutazioni

- Polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs)

Diagnosi di malattia genetica la cui mutazione patogenetica altera un sito di restrizione:

l'esempio dell'**anemia falciforme**

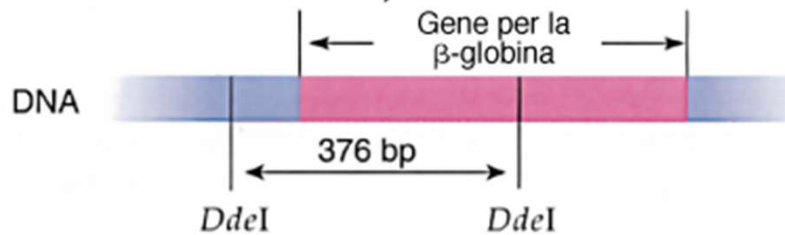
# Gene della globina $\beta$ normale (Hb-A) e della globina $\beta$ mutata dell'anemia falciforme (Hb-S)



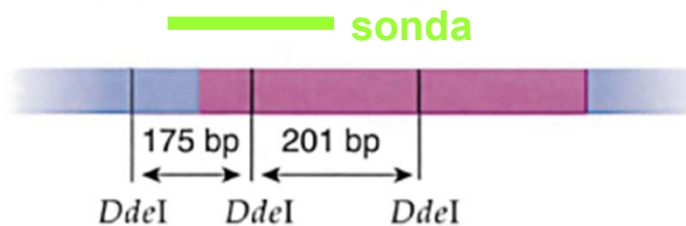
La mutazione (causa della malattia) modifica un sito di restrizione

## a) Siti di restrizione *DdeI*

$\beta^S$  (Allele mutante dell'anemia falciforme)



$\beta^A$  (Allele normale)



Il Southern Blotting  
permette di fare  
diagnosi molecolare di  
malattia

Diagnosi di malattia genetica  
**ASSOCIATA** ad un polimorfismo  
non patogenetico:

l'esempio della **fibrosi cistica**

Quando il gene responsabile della malattia non è noto la diagnosi può servirsi del **Polimorfismo di Lunghezza dei Frammenti di Restrizione (RFLP)**

Alcuni siti di restrizione del genoma sono polimorfici (SNPs).

Un particolare polimorfismo può essere strettamente associato ad un gene patologico (di cui si ignora sequenza e mutazione) e quindi segregare con esso.

Più il sito polimorfico è vicino al gene malattia, più sarà improbabile che un evento di crossing over in meiosi separi e faccia segregare indipendentemente i due caratteri.

L'analisi degli RFLP consiste:

§ nell'analizzare le sequenze non codificanti adiacenti a un gene

§ nel tipizzarle mediante digestione con enzimi di restrizione

§ nel confrontare i risultati della frammentazione nei soggetti appartenenti a un medesimo nucleo familiare.

L'utilizzo di sonde specifiche per le regioni adiacenti il gene contenenti siti di restrizione polimorfici possono evidenziare l'associazione tra uno specifico RFLP e il fenotipo patologico.

Quelle sonde potranno essere utilizzate per la diagnosi.

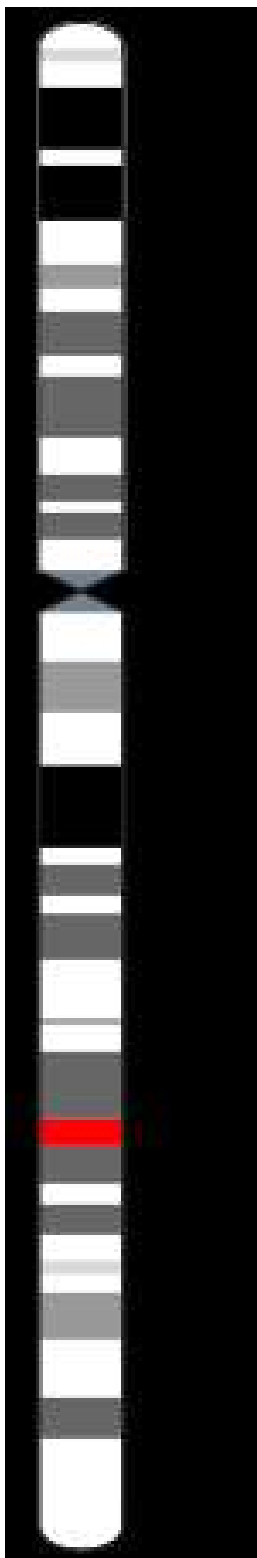
**Gli RFLP possono servire all'identificazione, isolamento e caratterizzazione di un gene malattia**

Intere famiglie con alta incidenza di fibrosi cistica furono studiate per la presenza di polimorfismi di siti di restrizione strettamente associati alla malattia.

Un marcatore RFLP che segregava debolmente con il gene malattia fu utilizzato per individuare il cromosoma su cui è situato il gene CF (cromosoma 7).

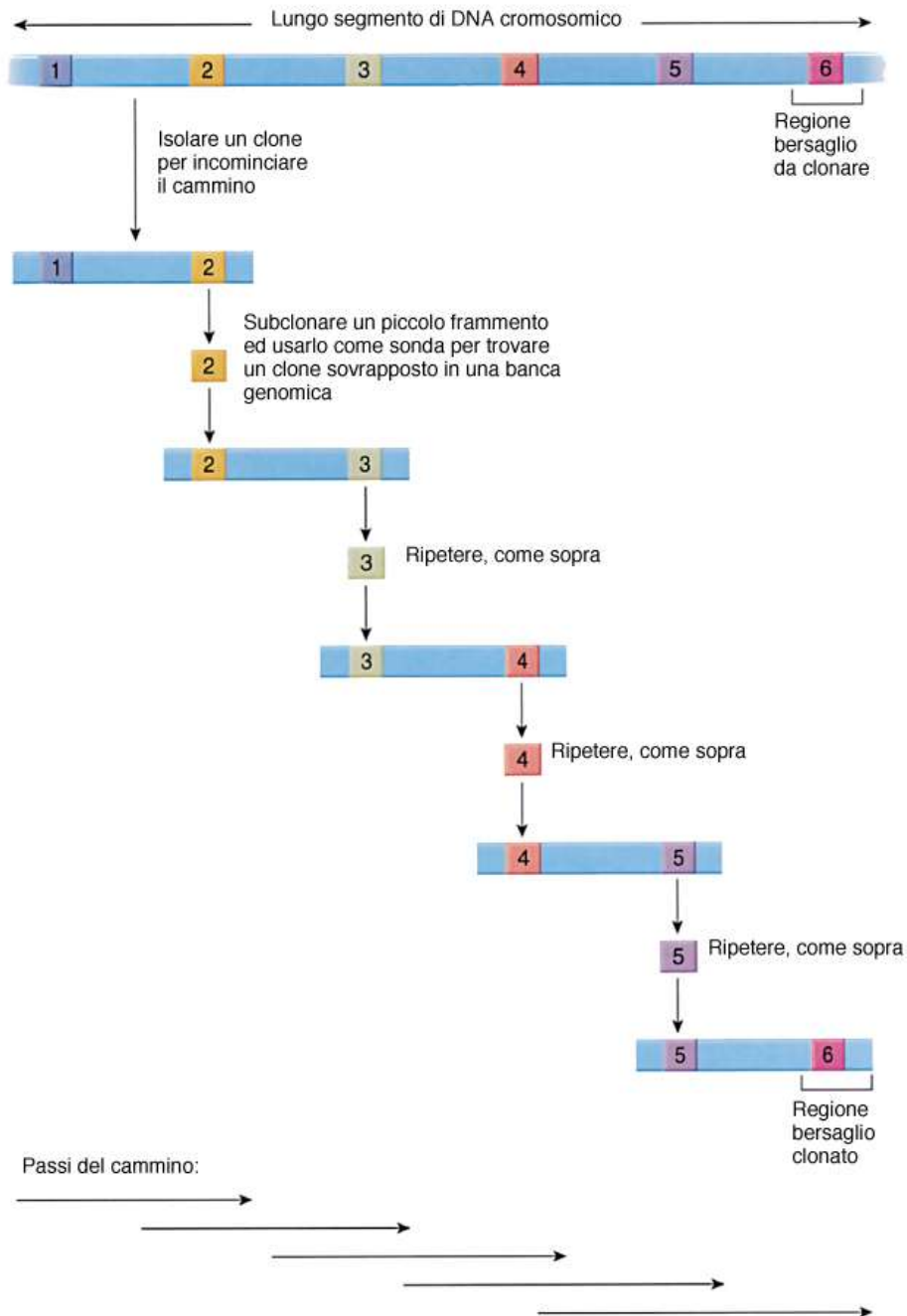
Furono usati quindi RFLP noti del cromosoma 7 tra cui ne furono individuati due strettamente associati al gene malattia (7q31-32).

Cromosoma 7



Gene della fibrosi cistica

# Saggi di ibridazione



**Il gene della Fibrosi Cistica fu identificato tramite "Chromosome Walking", cioè camminando sul cromosoma 7**

Nel 68% dei pazienti la malattia è associata alla delezione di 3 nt successivi con conseguente perdita dell'aminoacido fenilalanina nella proteina.

Nel resto dei pazienti si sono ritrovate più di 60 mutazioni diverse.

La sequenza del gene e della proteina prodotta ha permesso l'elaborazione di un'analisi computerizzata che ha individuato due domini proteici: uno transmembrana e uno di legame all'ATP.

La mutazione più frequente colpisce proprio la parte centrale del dominio transmembrana.

**ALTERAZIONE DI UN CANALE DEL CLORO**  
**CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator)**



**ALTERAZIONI TRASPORTO ELETTROLITICO**

**ALTERAZIONE DELLE SECREZIONI MUCOSE**

**INFEZIONE INFIAMMAZIONE**



**ALTI LIVELLI DI Cl- NEL SUDORE**

**SECREZIONI ESOCRINE MUCOSE DENSE**

Diagnosi di malattia genetica  
tramite analisi di polimorfismo  
non patogenetico:

l'esempio del **Retinoblastoma  
Ereditario**

Esempio di diagnosi prenatale di presenza dell' allele mutato per il Retinoblastoma (RB)

Uomo affetto RB ereditario

Donna sana sottoposta a diagnosi prenatale del 2° figlio

1° Figlio affetto RB

Il gene responsabile del retinoblastoma è localizzato a livello della banda 1.4 del braccio lungo del cromosoma 13 (13q14)

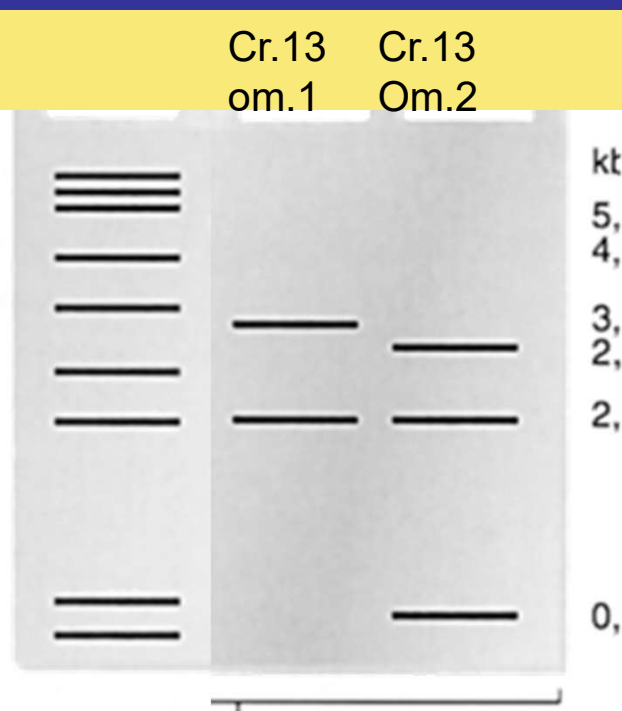
## Procedura diagnostica:

1- prelevare e isolare i due cromosomi omologhi 13 del padre, della madre, del figlio affetto e del probando (prelievo villi coriali).

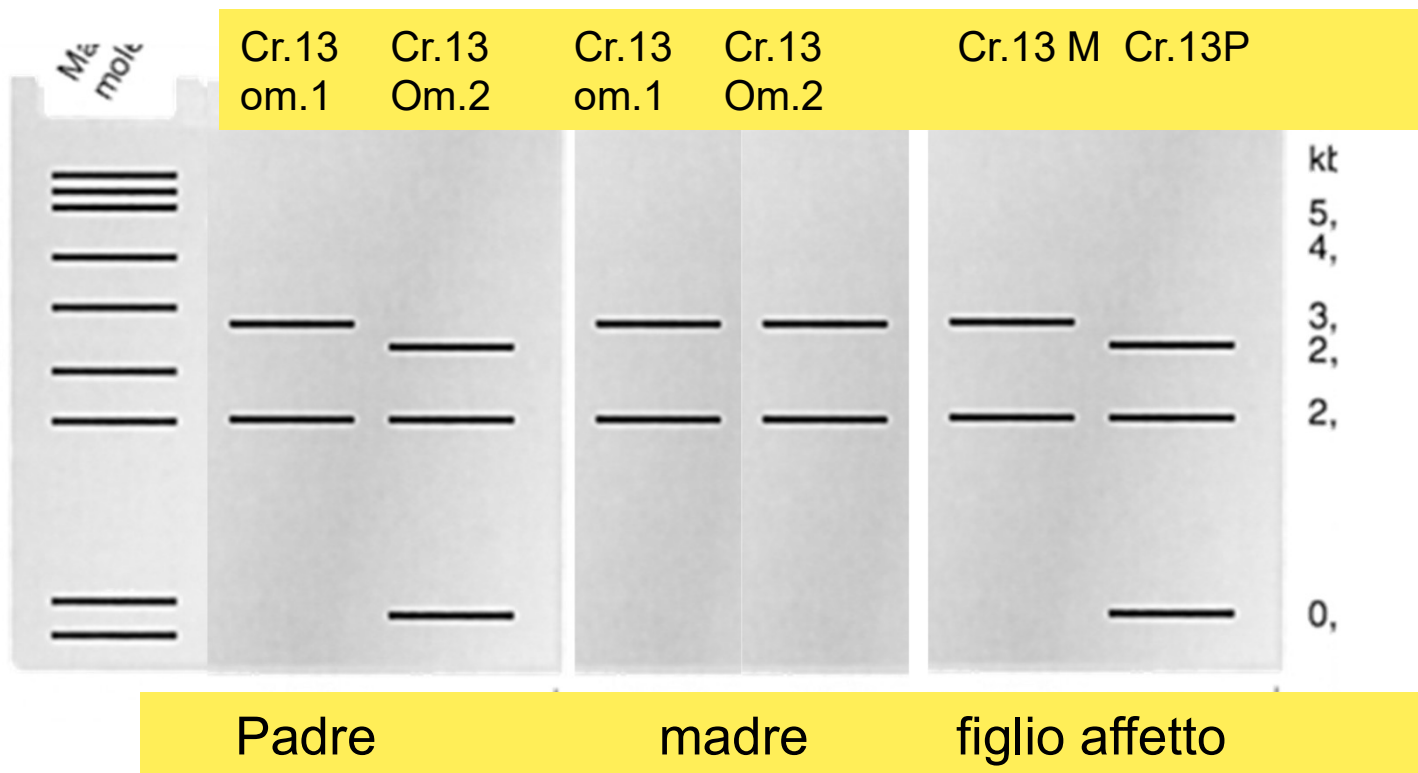
2-digestione con un enzima di restrizione.

3- analisi del pannello di restrizione.

**Nel caso fortunato in cui si verifichi una condizione di eterozigosi per un RFLP nel genitore affetto, i due cromosomi genereranno un numero diverso di frammenti.**



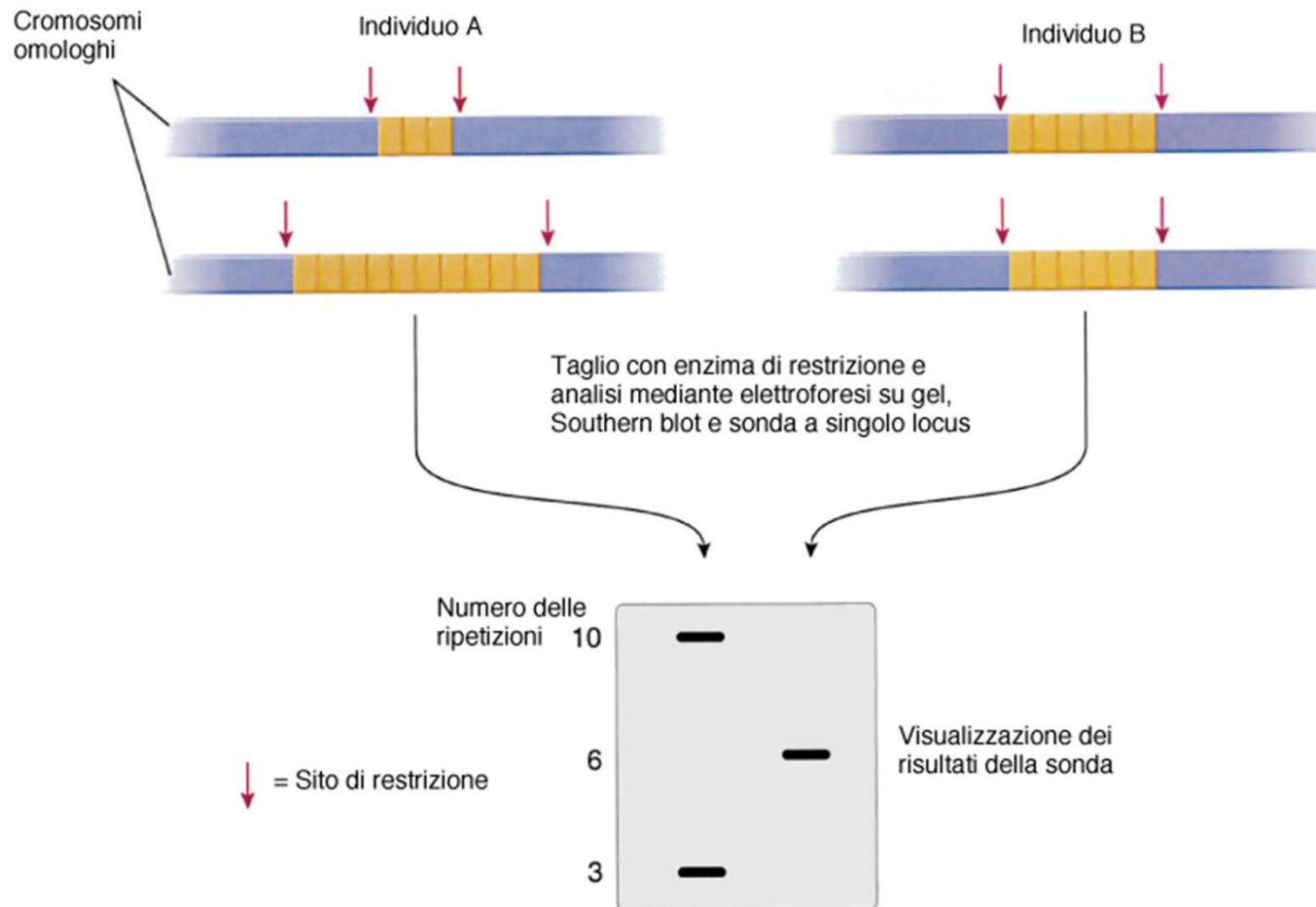
Per conoscere quale dei due cromosomi sia portatore del gene per il retinoblastoma si sottopone il materiale genetico della madre e del figlio affetto all'azione del medesimo enzima e si confrontano i risultati con quelli paterni.



Utilizzo di RFLP per tipizzazione del DNA:

Gli esempi dell' **Attribuzione di paternità e dell'Identificazione dell'autore di un delitto**

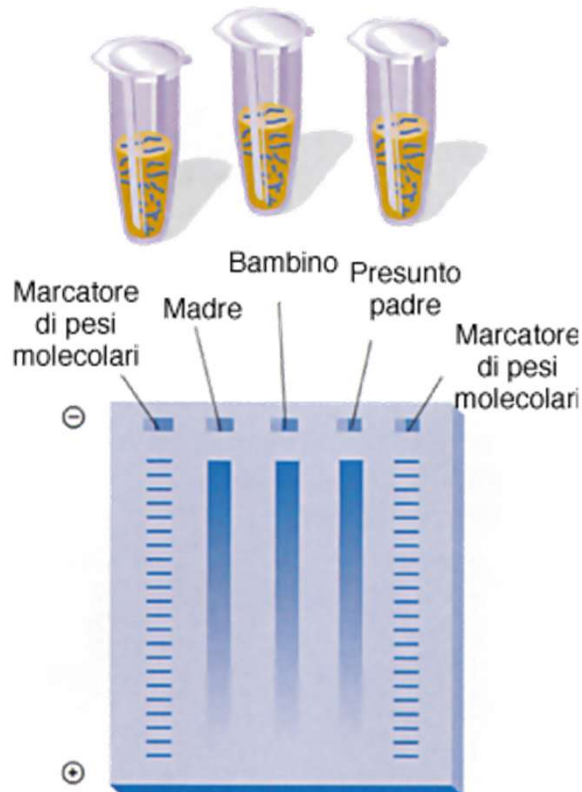
## Impronte di DNA (DNA fingerprinting): I satelliti



# Tipizzazione del DNA per attribuzione di paternità

## Saggi di ibridazione

- 1 Il DNA è prelevato dalla madre, dal bambino e dal presunto padre. In analisi separate, il DNA è tagliato in frammenti con l'enzima di restrizione



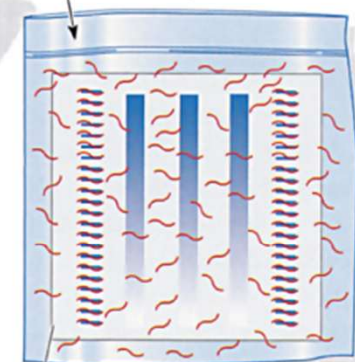
- 2 Elettroforesi su gel del DNA di ciascun campione e dei marcatori di pesi molecolari

- 3 Preparato Southern blot dal gel



Soluzione sonda

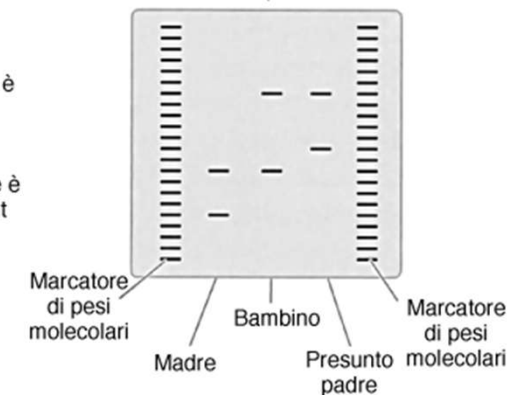
- 4 Il filtro viene incubato con una sonda di DNA radioattivo. La sonda di DNA si lega a specifiche sequenze del DNA sul filtro



- 5 L'eccesso di sonda è lavato via, lasciando la sonda radioattiva ibridata al filtro

Filtro con DNA legato

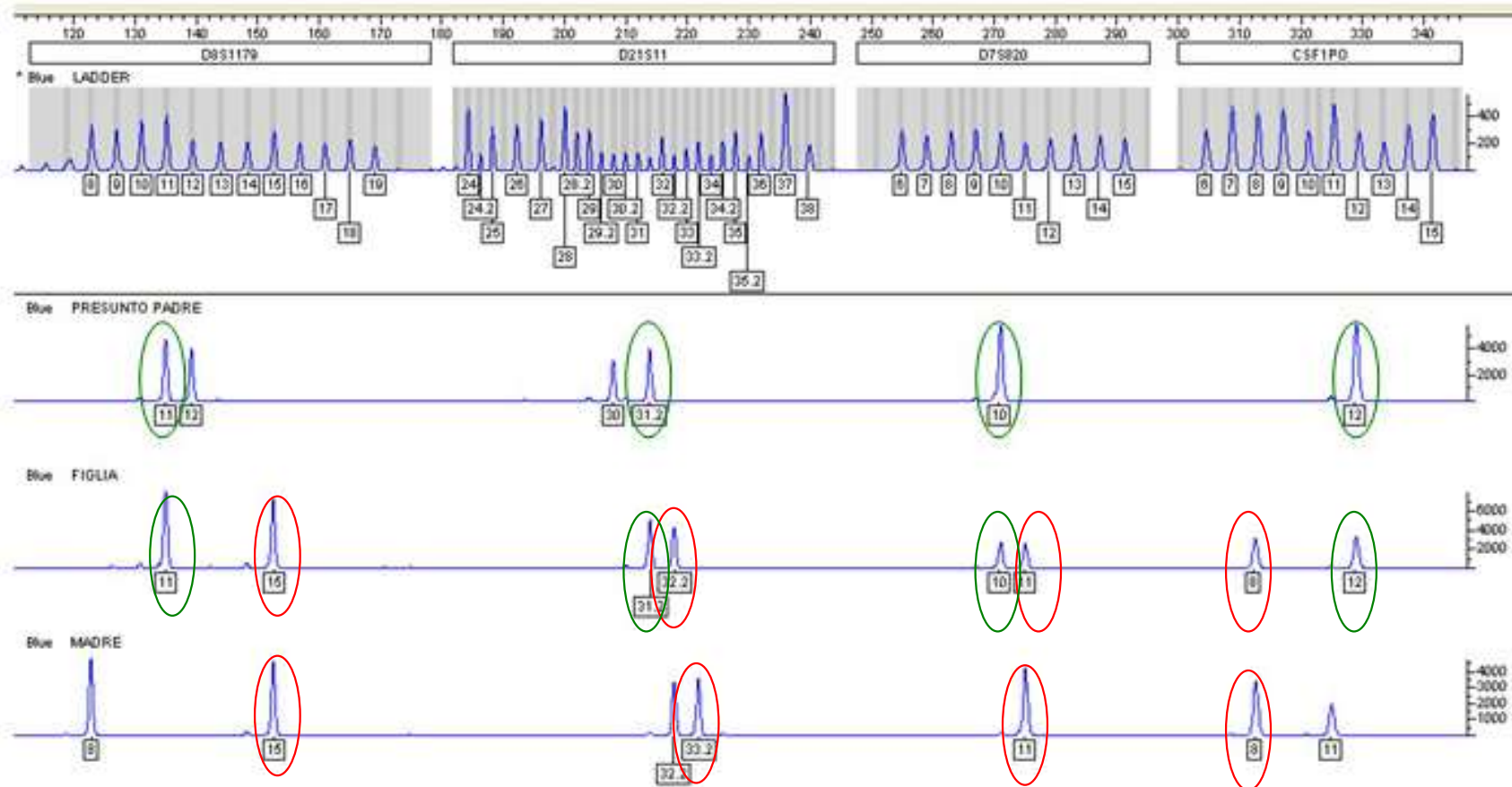
- 6 L'autoradiografia è preparata. La distribuzione delle bande per ciascun campione è un DNA fingerprint



# Tipizzazione del DNA per attribuzione di paternità

Amplificazione tramite PCR di STRs e analisi delle dimensioni

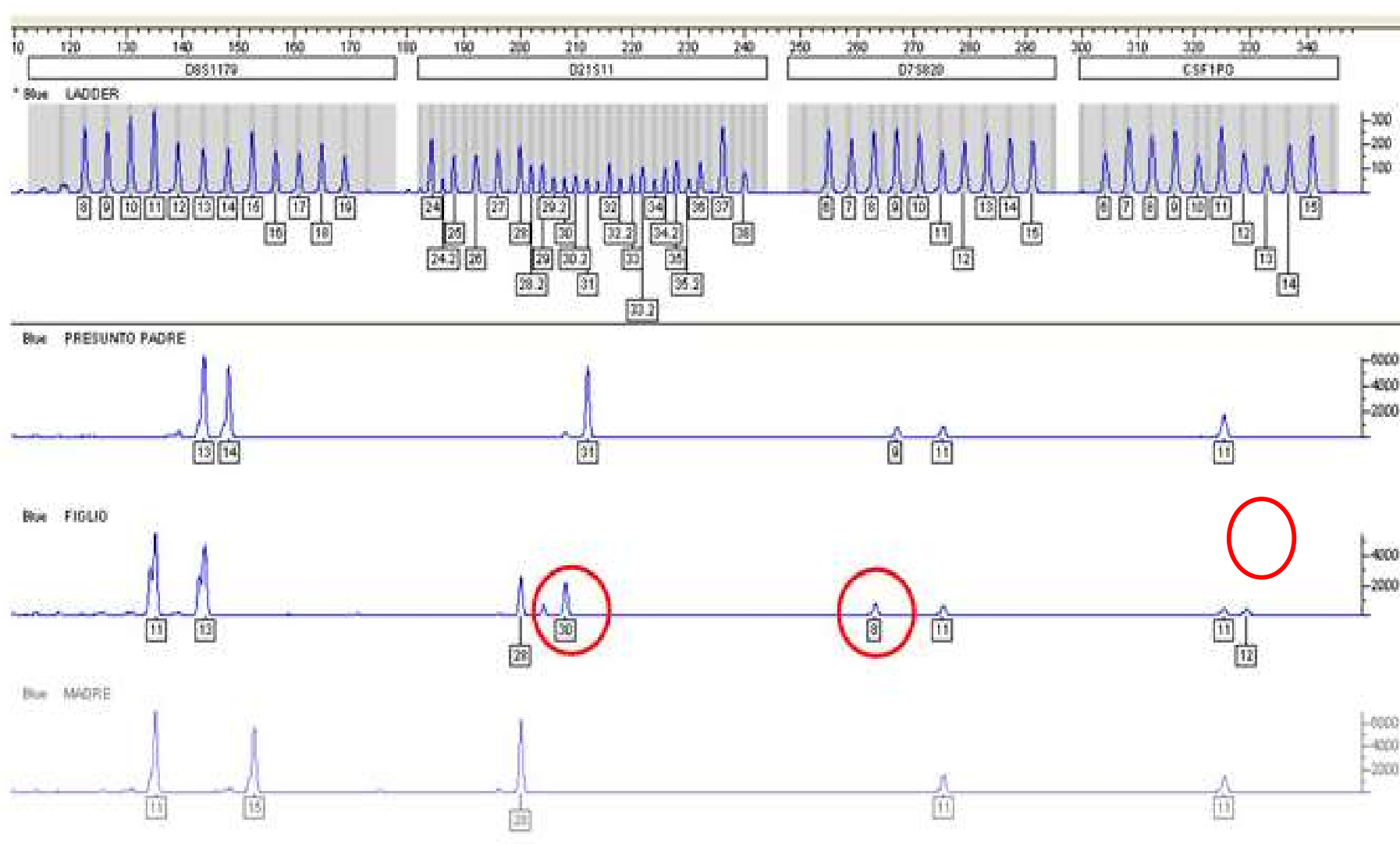
### Attribuzione di paternità



# Tipizzazione del DNA per attribuzione di paternità

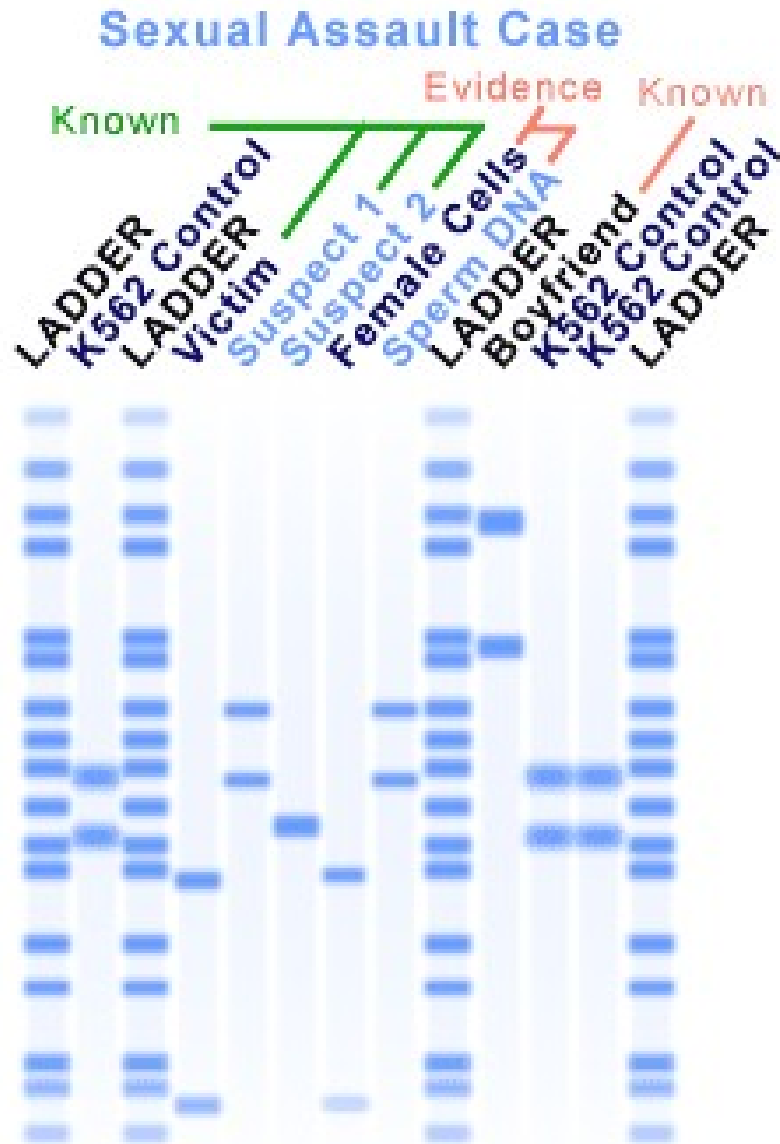
## PCR di STR

### Esclusione di paternità

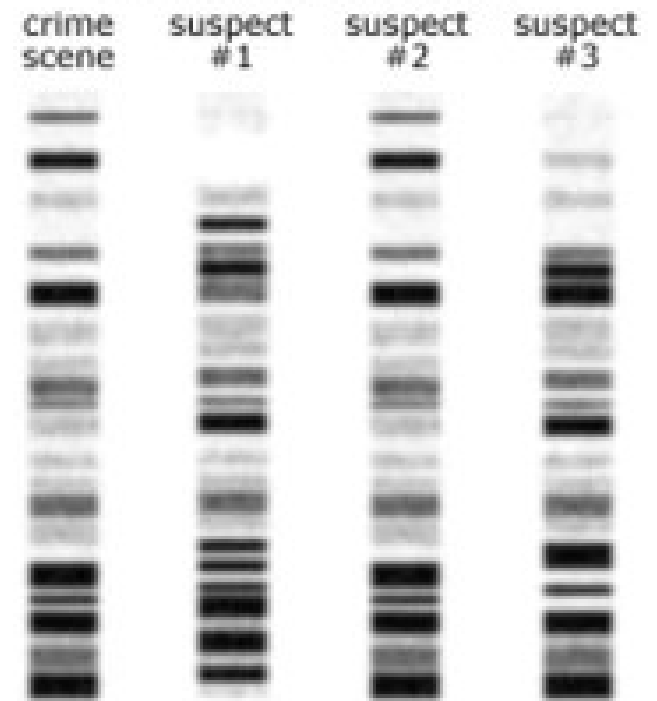


# Tipizzazione del DNA per identificazione autore di delitto

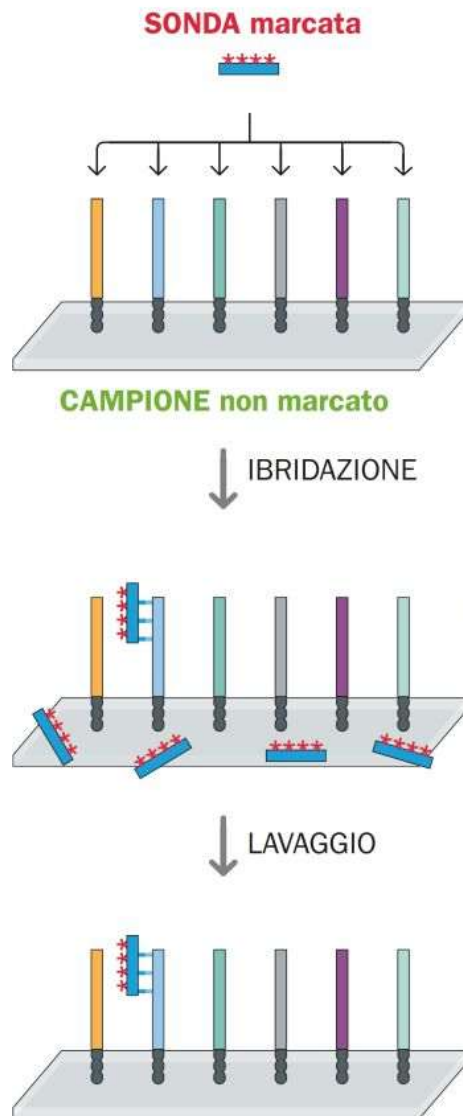
## Saggi di ibridazione



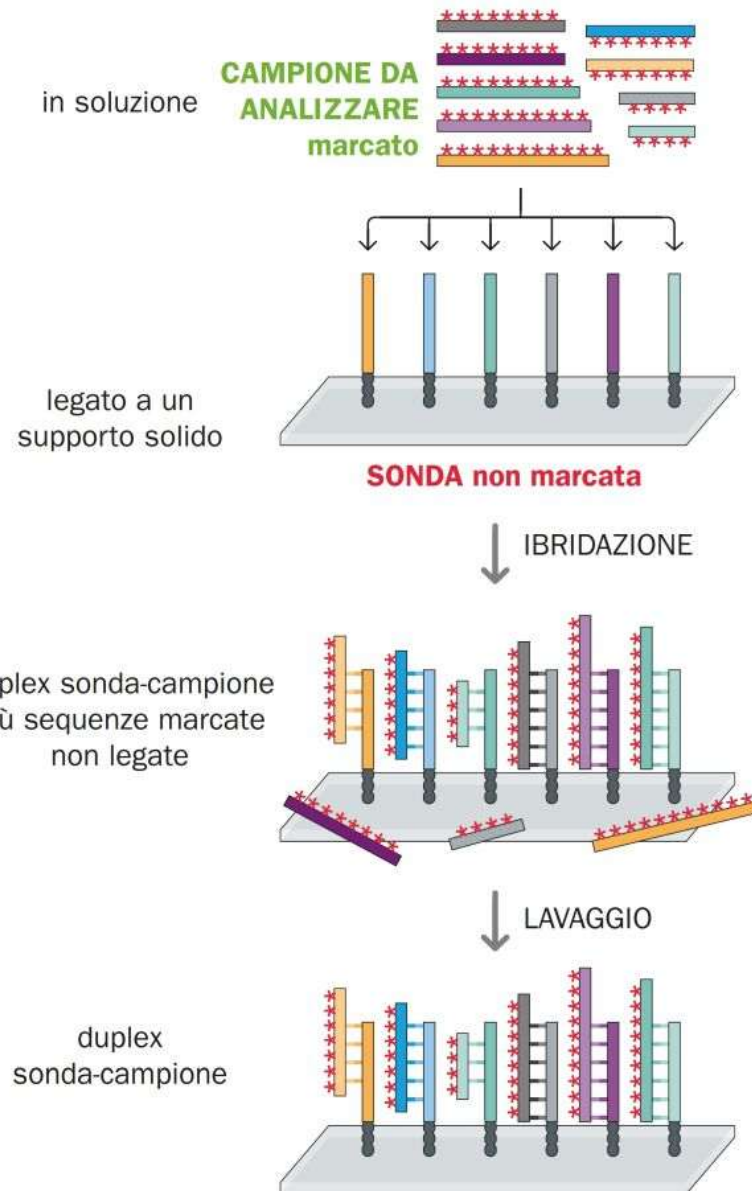
**DNA samples from:**



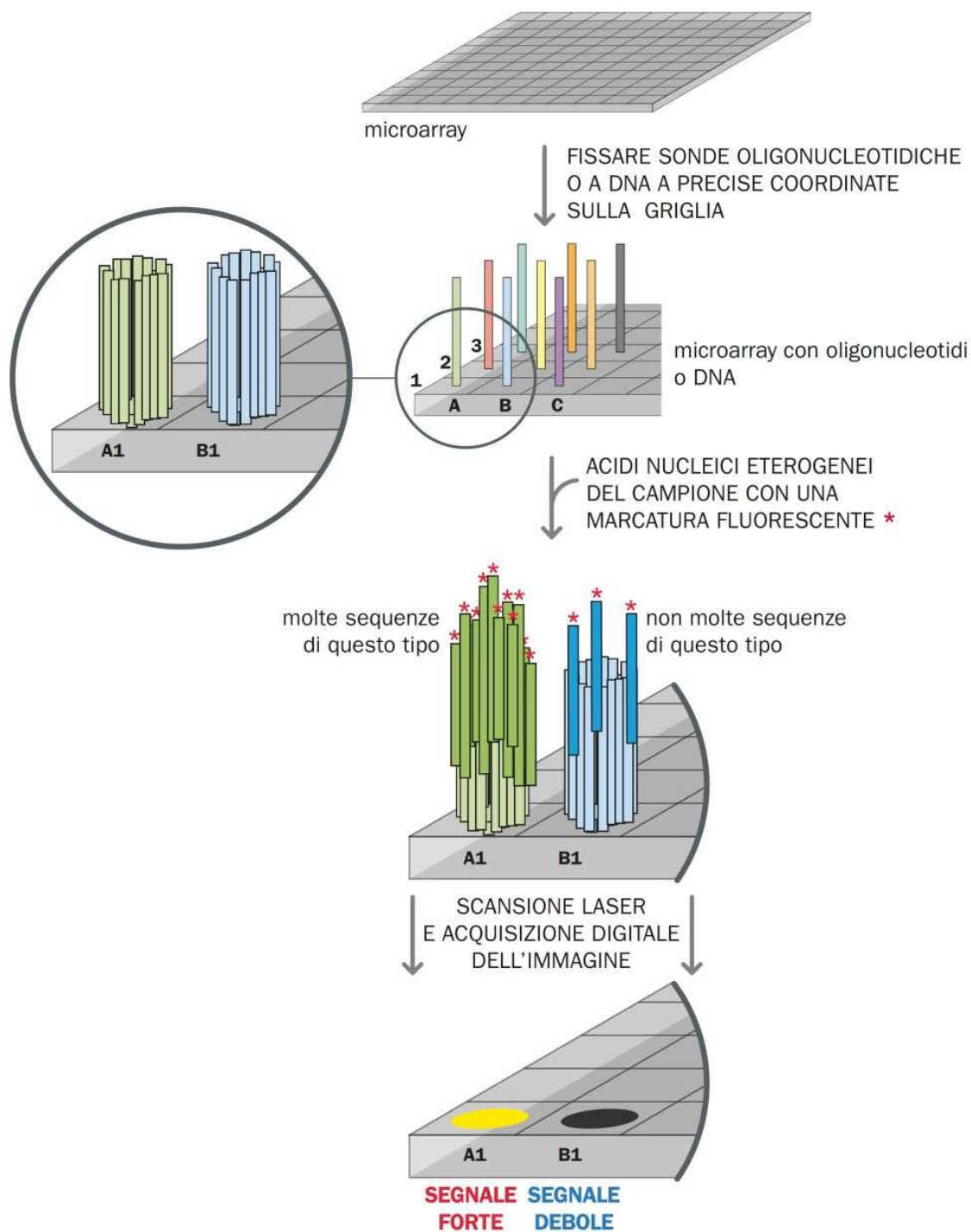
## SAGGIO STANDARD

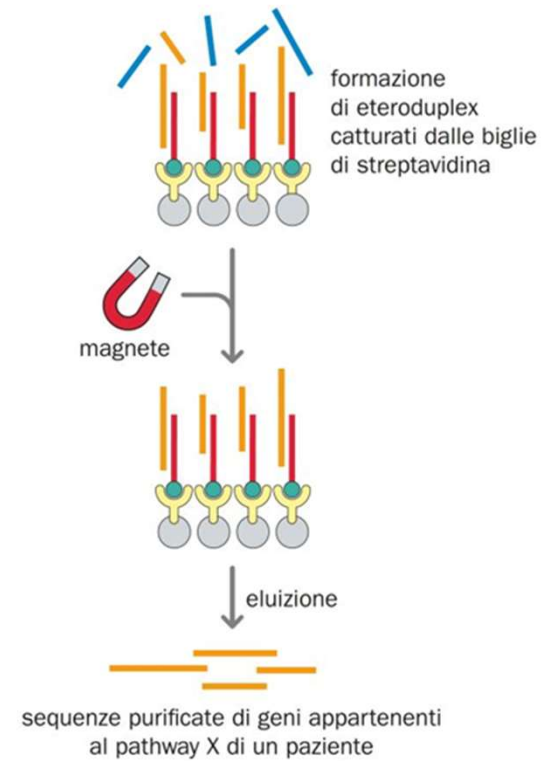
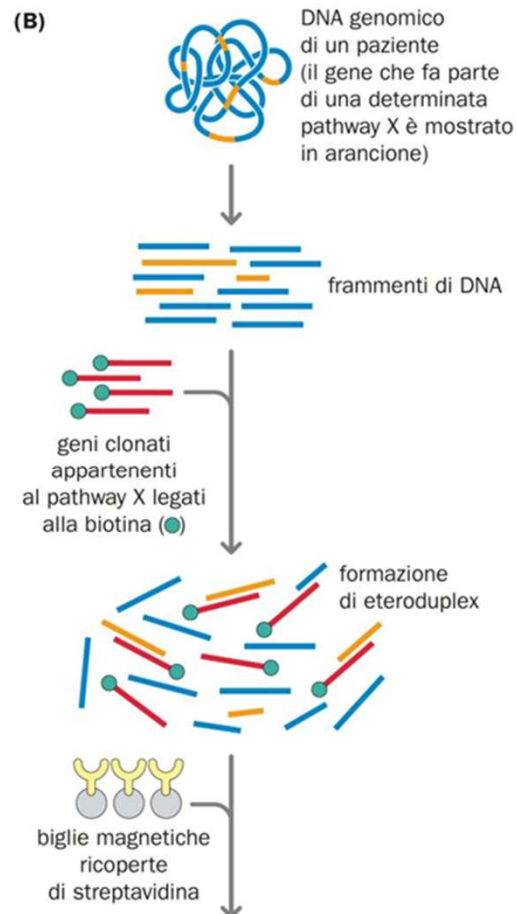
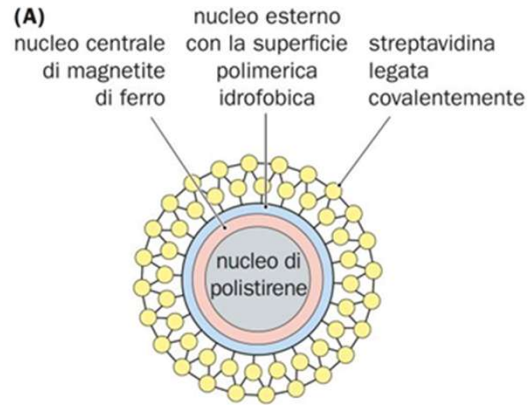


## SAGGIO REVERSE



## I microarray



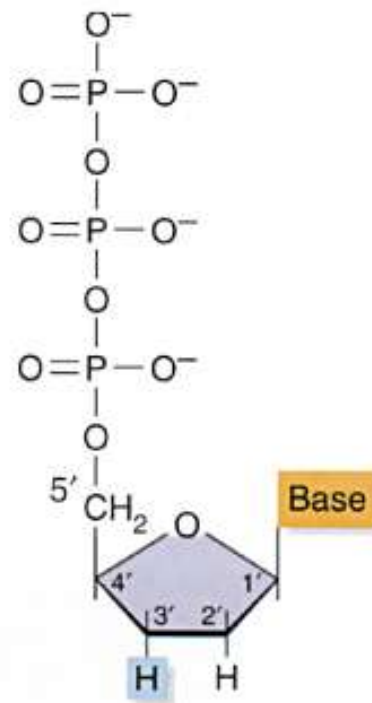


**Amplificazione/Clonazione**

**Ibridazione/Sonda**

**Sequenziamento**

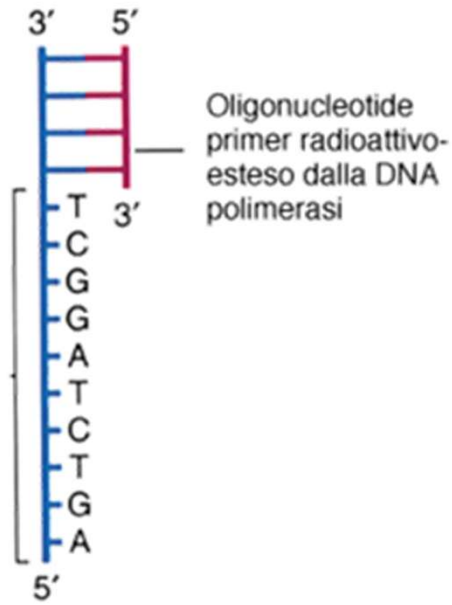
# SEQUENZIAMENTO DEL DNA metodo dei didesossinucleotidi



Didesossinucleoside  
trifosfato

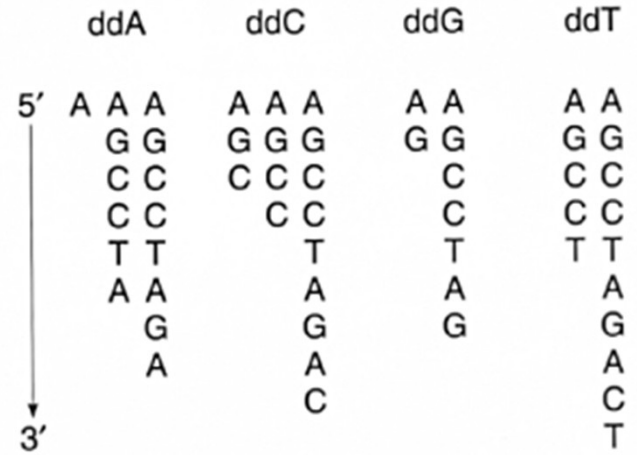
(il normale precursore del  
DNA ha OH in posizione 3')

Sequenza clonata da analizzare

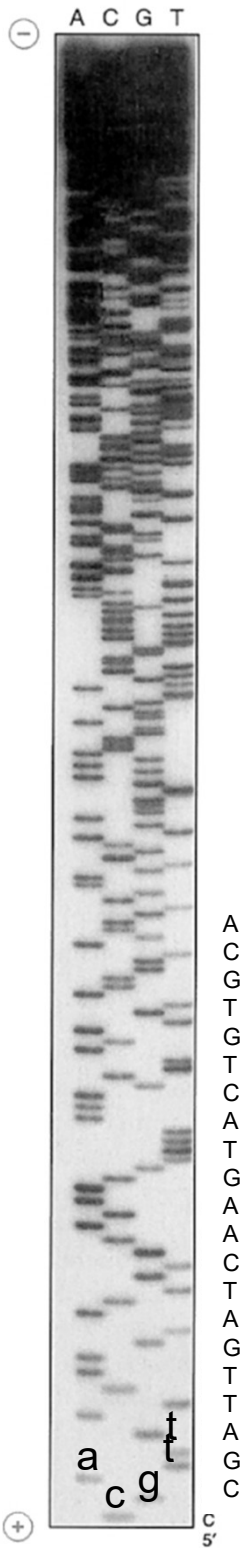


Reazione:

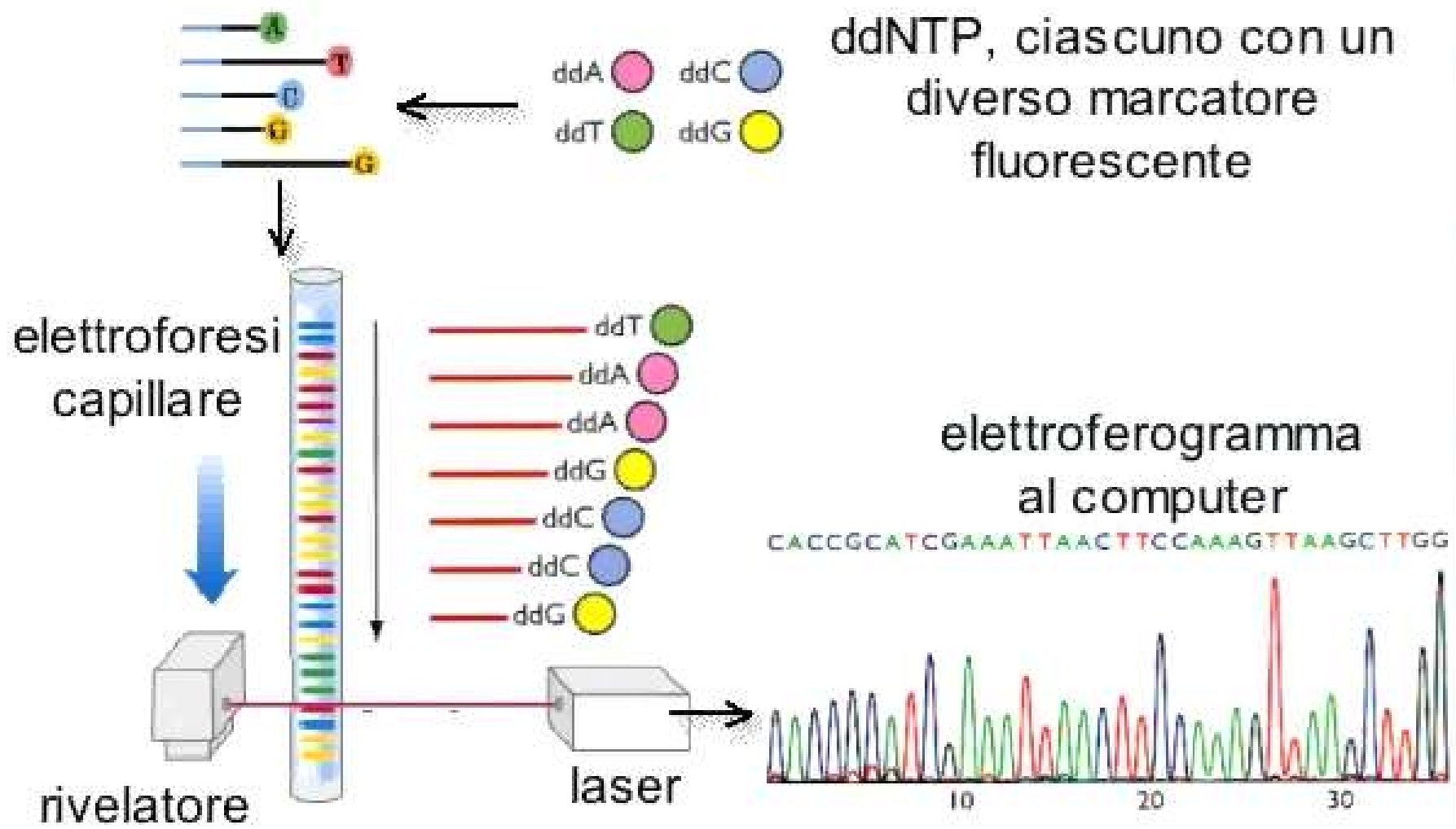
Prodotti di DNA:



# Sequenziamento



# Sequenziatori a fluorescenza





# Next Generation Sequencing (NGS)

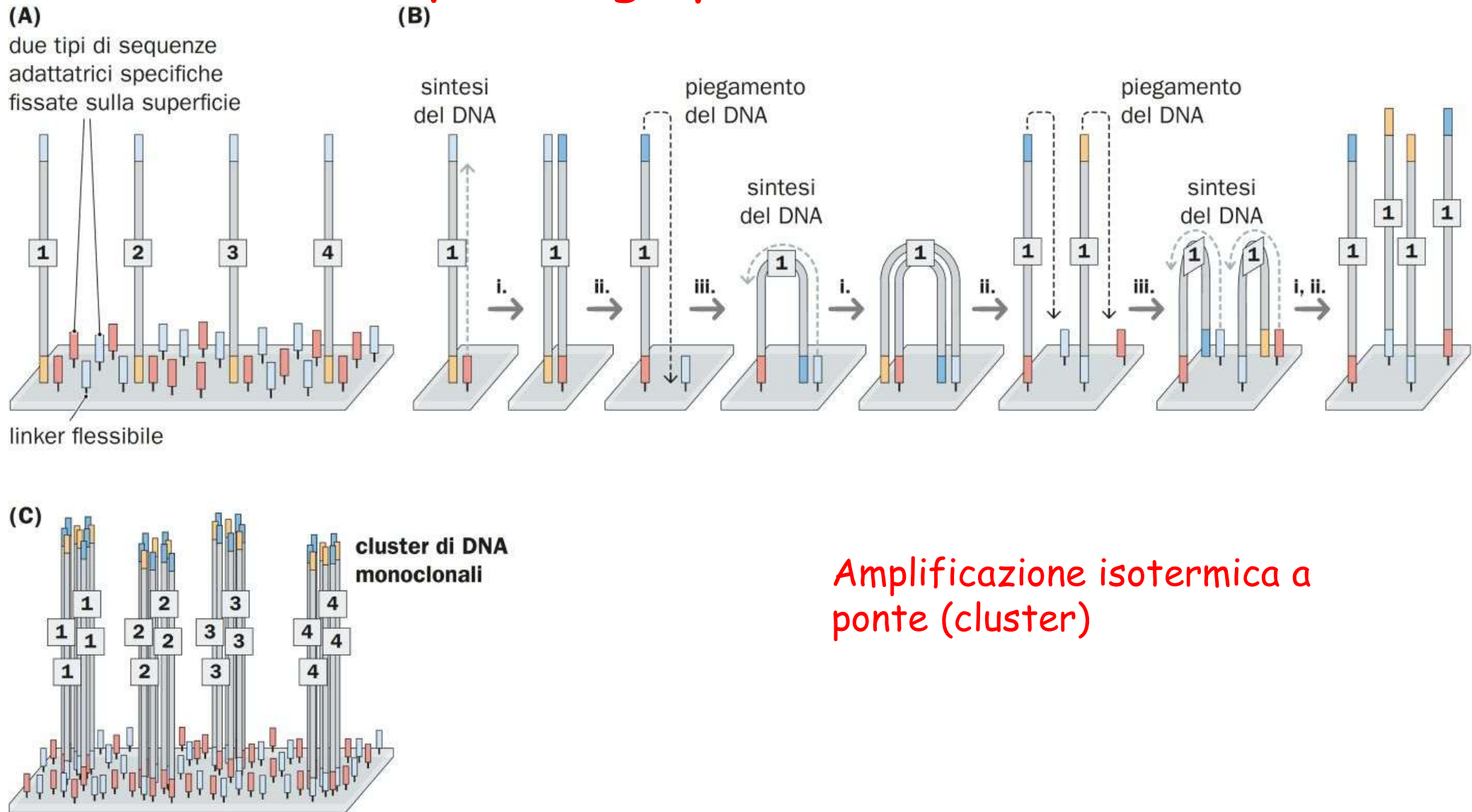
Sequenziamento contemporaneo di un grande numero di frammenti di DNA diversi.

Possibilità di sequenziare velocemente interi genomi e interi trascrittomi.

Possibilità di sequenziare e quindi identificare tutte le porzioni del genoma occupate da specifici fattori trascrizionali o da specifiche modifiche epigenetiche (ChIPseq)

# Next Generation Sequencing (NGS)

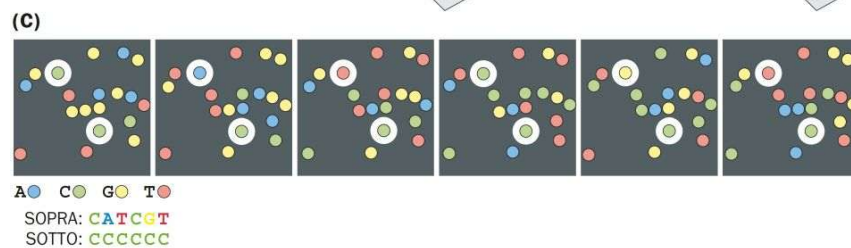
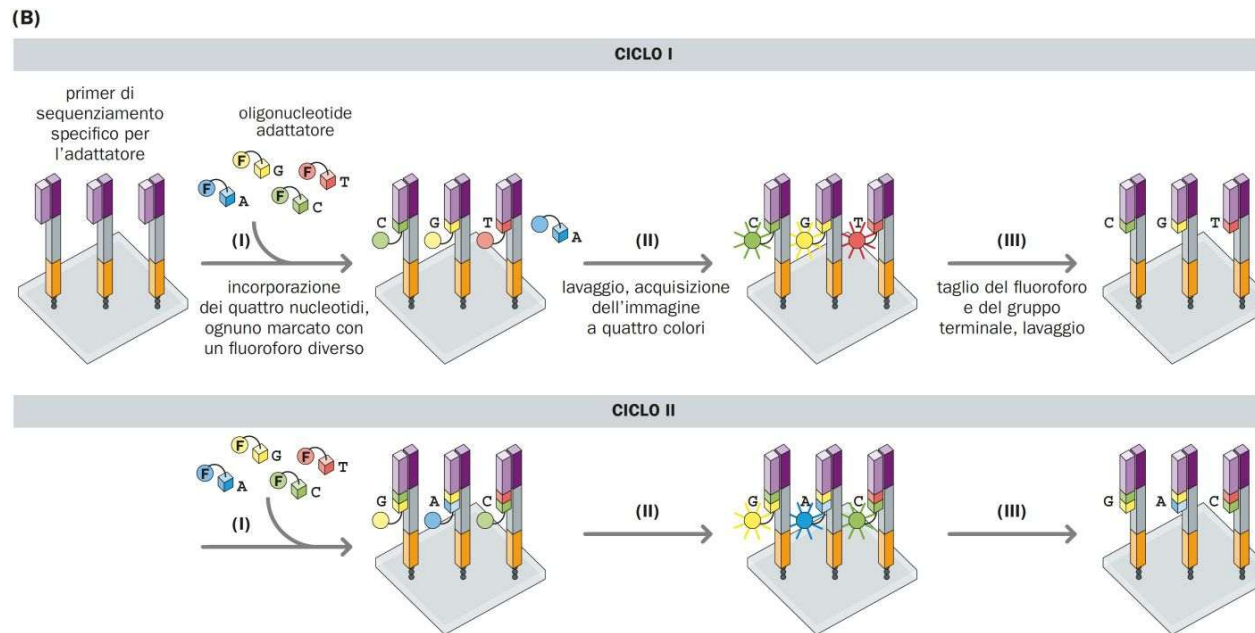
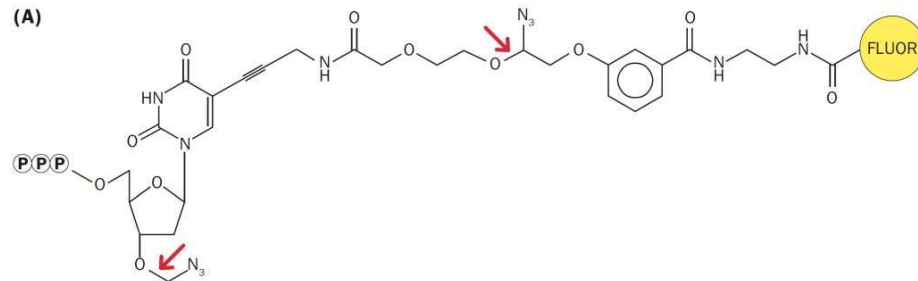
## Illumina sequencing system



Amplificazione isoterma a ponte (cluster)

# Next Generation Sequencing (NGS)

## Illumina sequencing system



# Next Generation Sequencing (NGS)

## Illumina sequencing system

# Studio dell'espressione genica

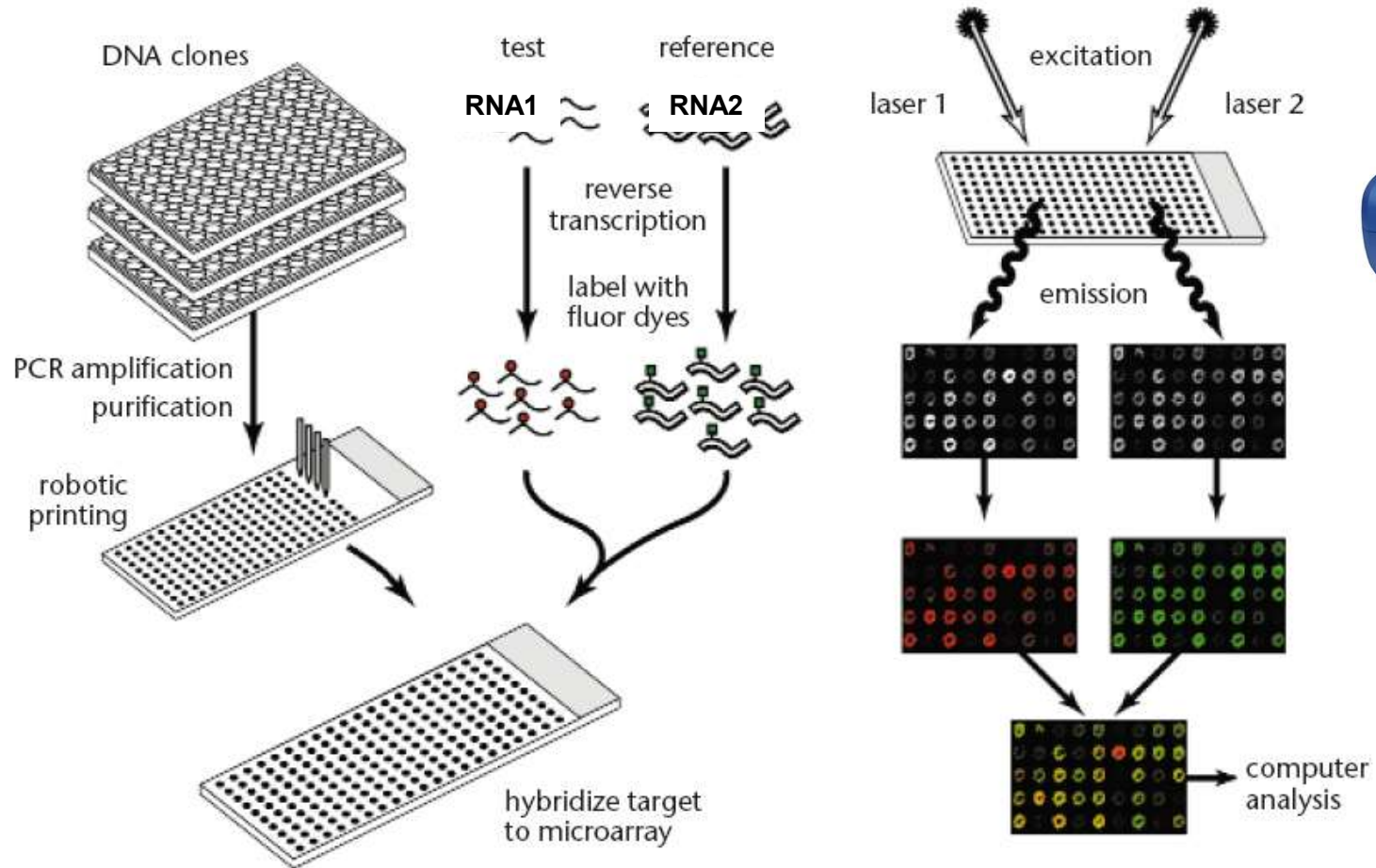
-Northern Blotting

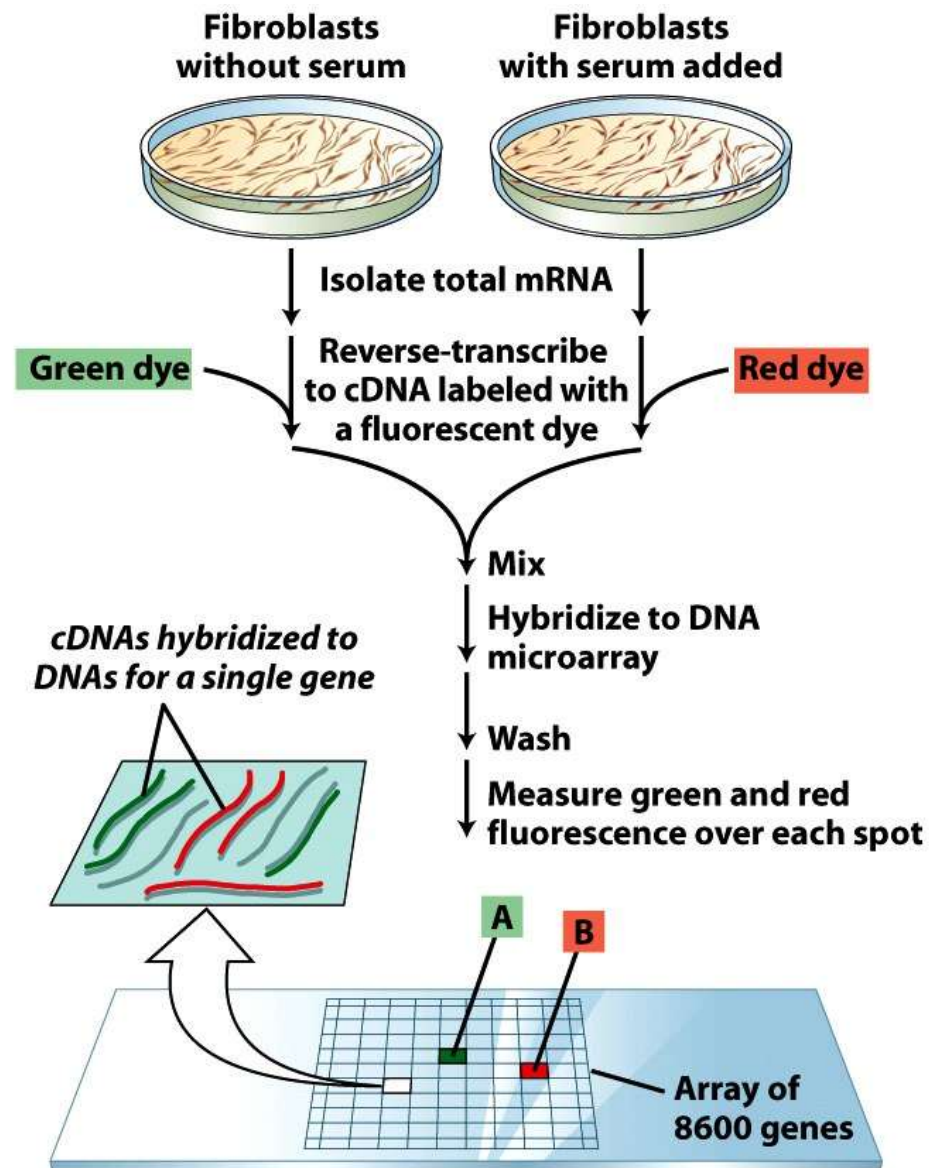
-Reverse Transcriptase-PCR

-Western blotting

-MicroArray trascrizionale

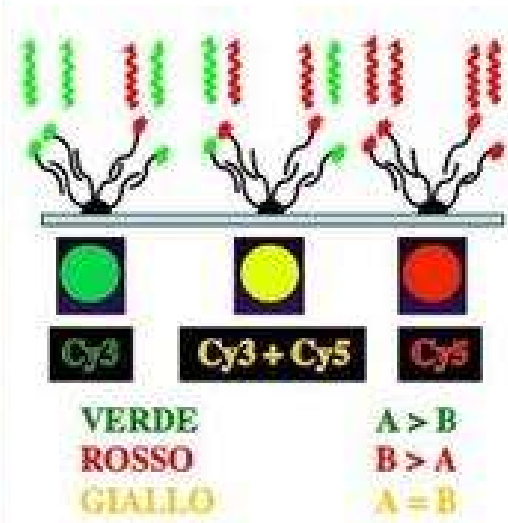
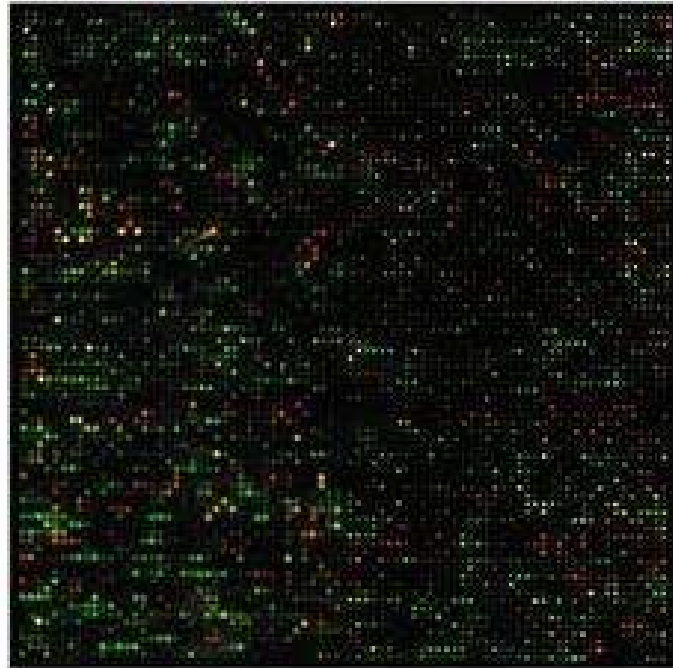
# Microarray

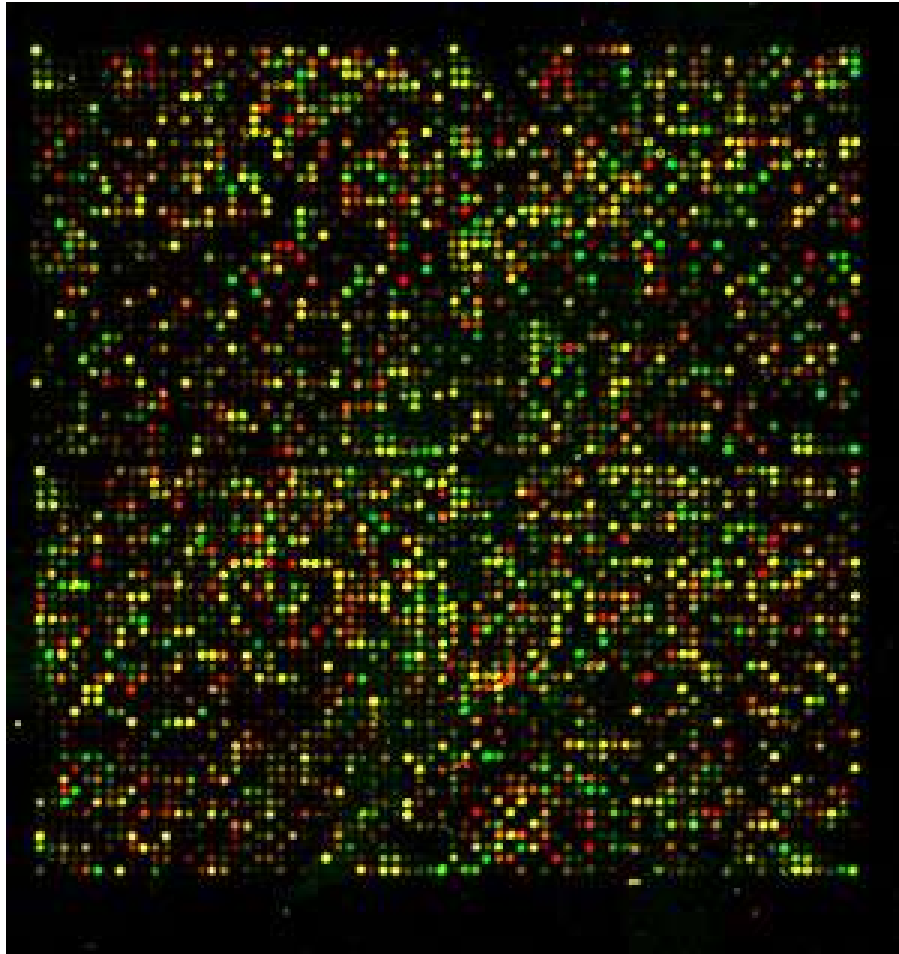




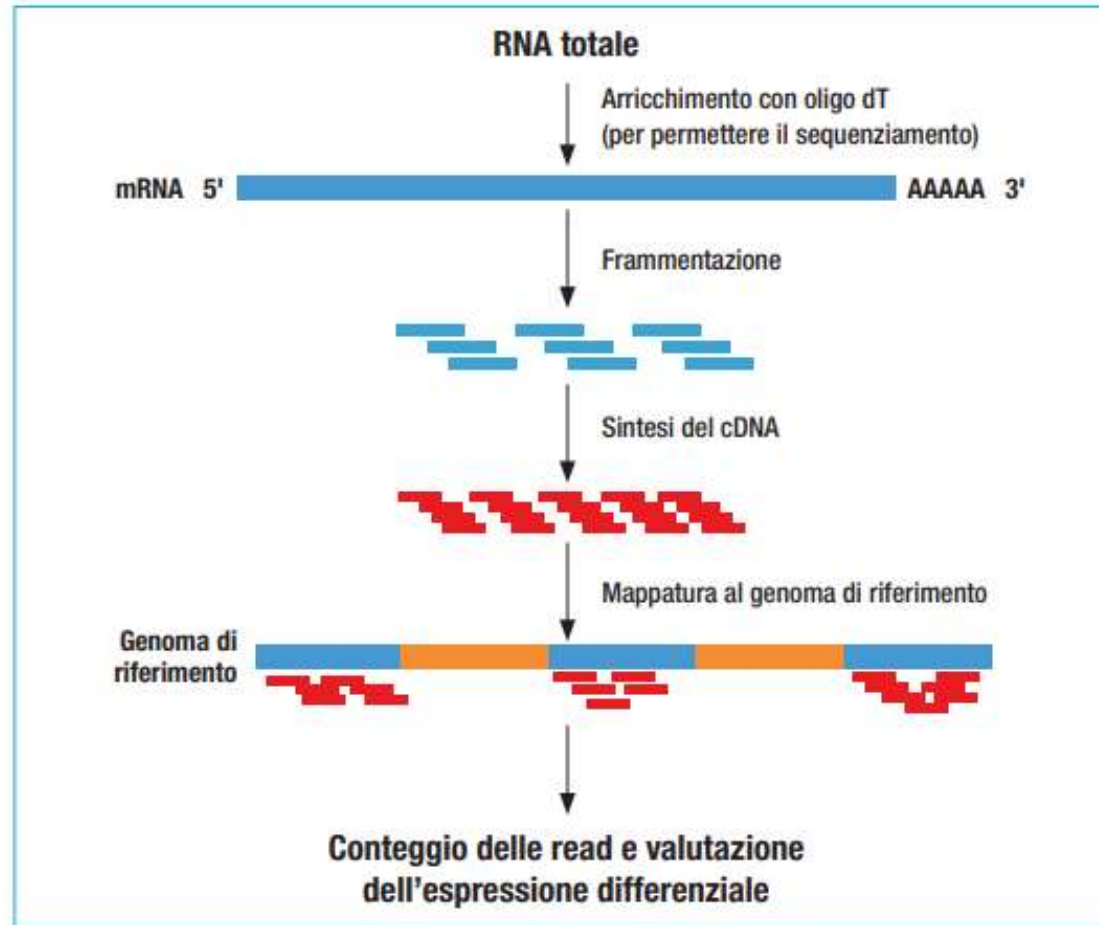
- A** If a spot is green, expression of that gene decreases in cells after serum addition
- B** If a spot is red, expression of that gene increases in cells after serum addition

Figure 5-29a  
*Molecular Cell Biology, Sixth Edition*  
 © 2008 W.H. Freeman and Company





# RNAseq

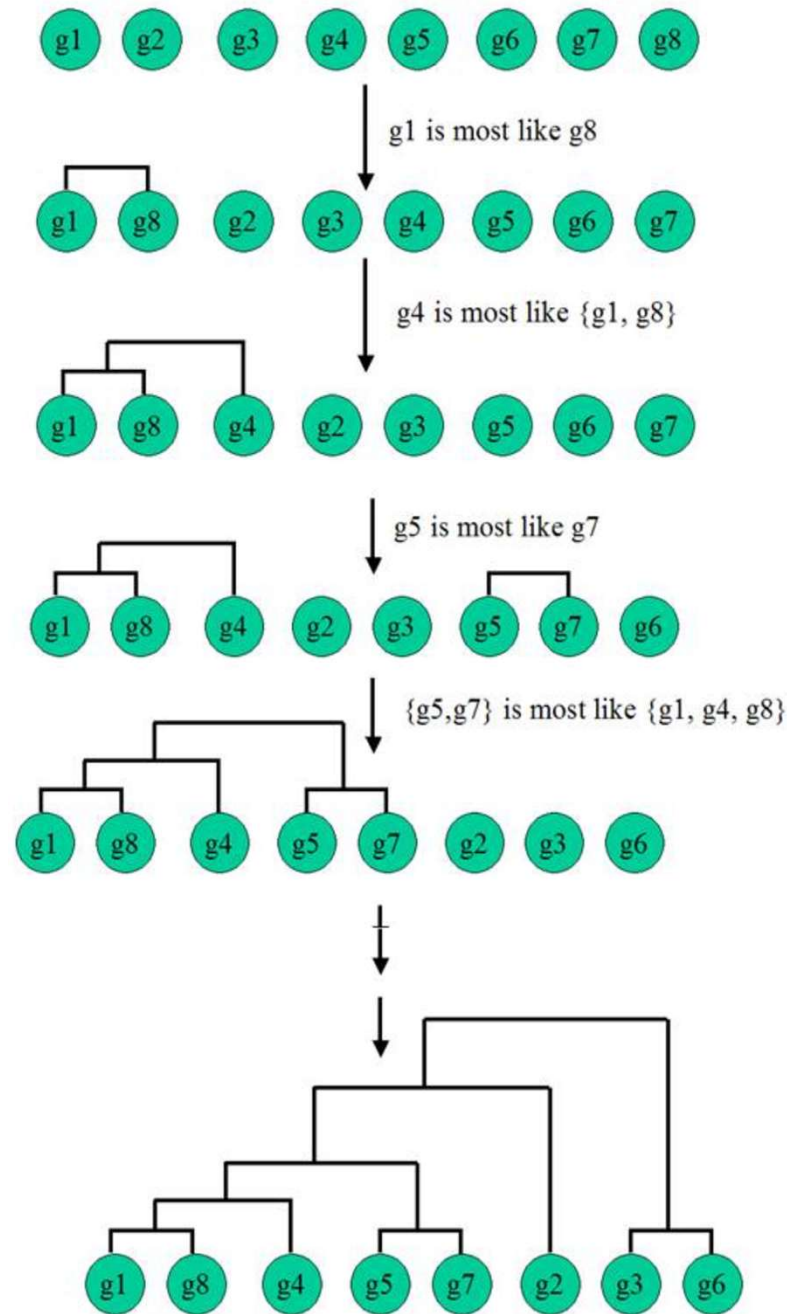


L'RNA-Seq è una tecnica per l'analisi del trascrittoma e la sua quantificazione basata sulle tecnologie di Next-Generation Sequencing. I sequenziatori forniscono una valutazione dell'espressione genica attraverso le **READS**, ovvero le sequenze che identificano l'ordine in cui si susseguono le basi azotate che compongono il gene; il numero di read per ciascun gene (mappato su genoma o trascrittoma di riferimento) viene detto **COUNT** e costituisce una misura dell'espressione genica. Nella figura le read vengono visualizzate come frammenti rossi allineati al genoma di riferimento.

# Clustering Analysis

Raggruppamento di geni che hanno un livello di espressione simile

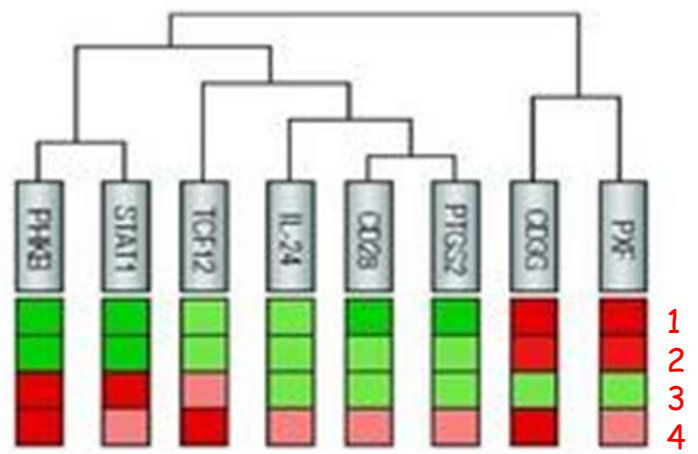
## Hierarchical Clustering



Il **clustering gerarchico** utilizza la matrice delle distanze per costruire **clusters** (gruppi di geni con profili di espressione simili)



**Raggruppamento di geni con profili di espressione simili (valutati in quattro diverse linee cellulari)**

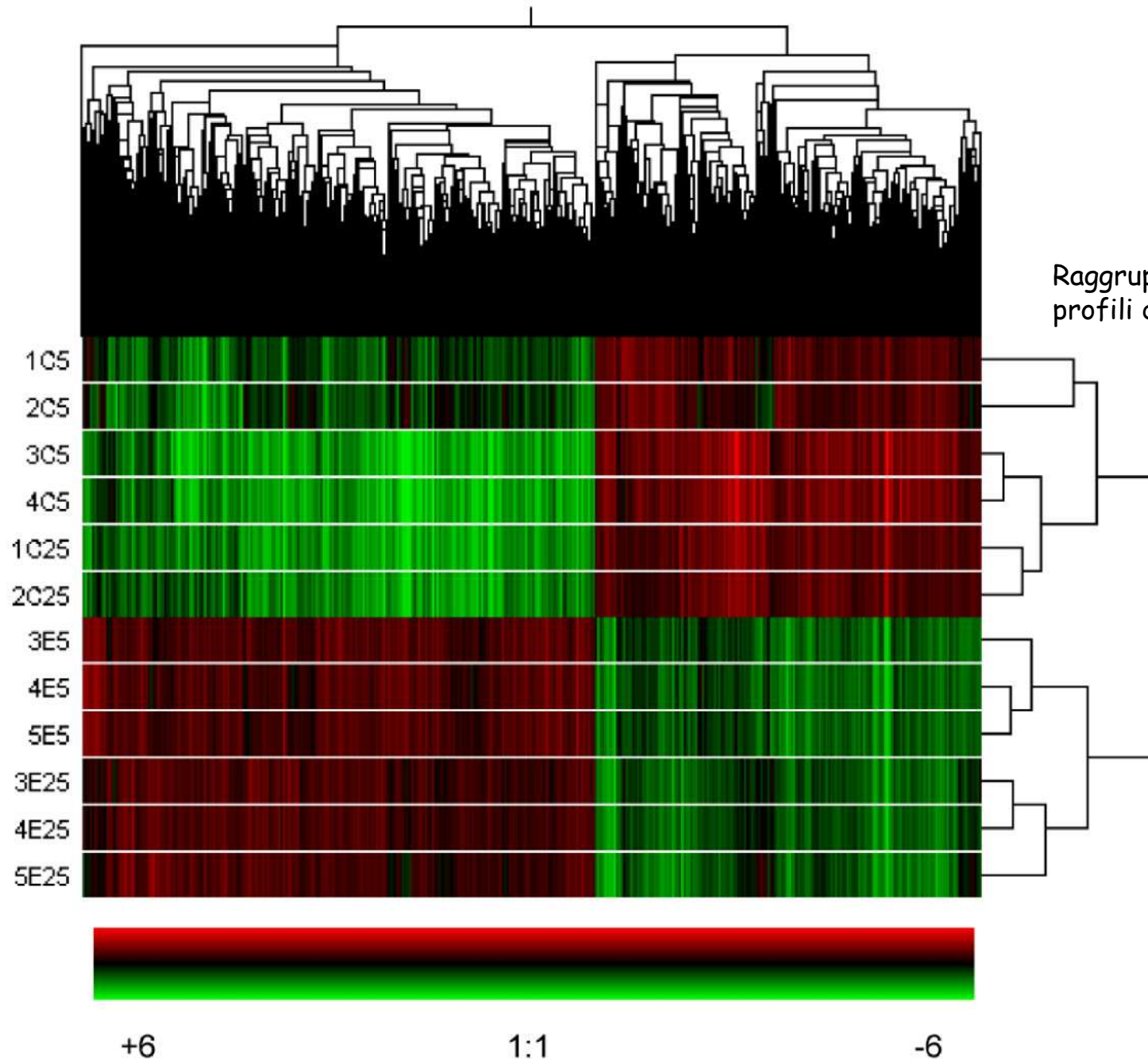


Linee cellulari

# Clustering Analysis

Raggruppamento di geni con livelli di espressione simili

Raggruppamento di linee cellulari con profili di espressione genica simili

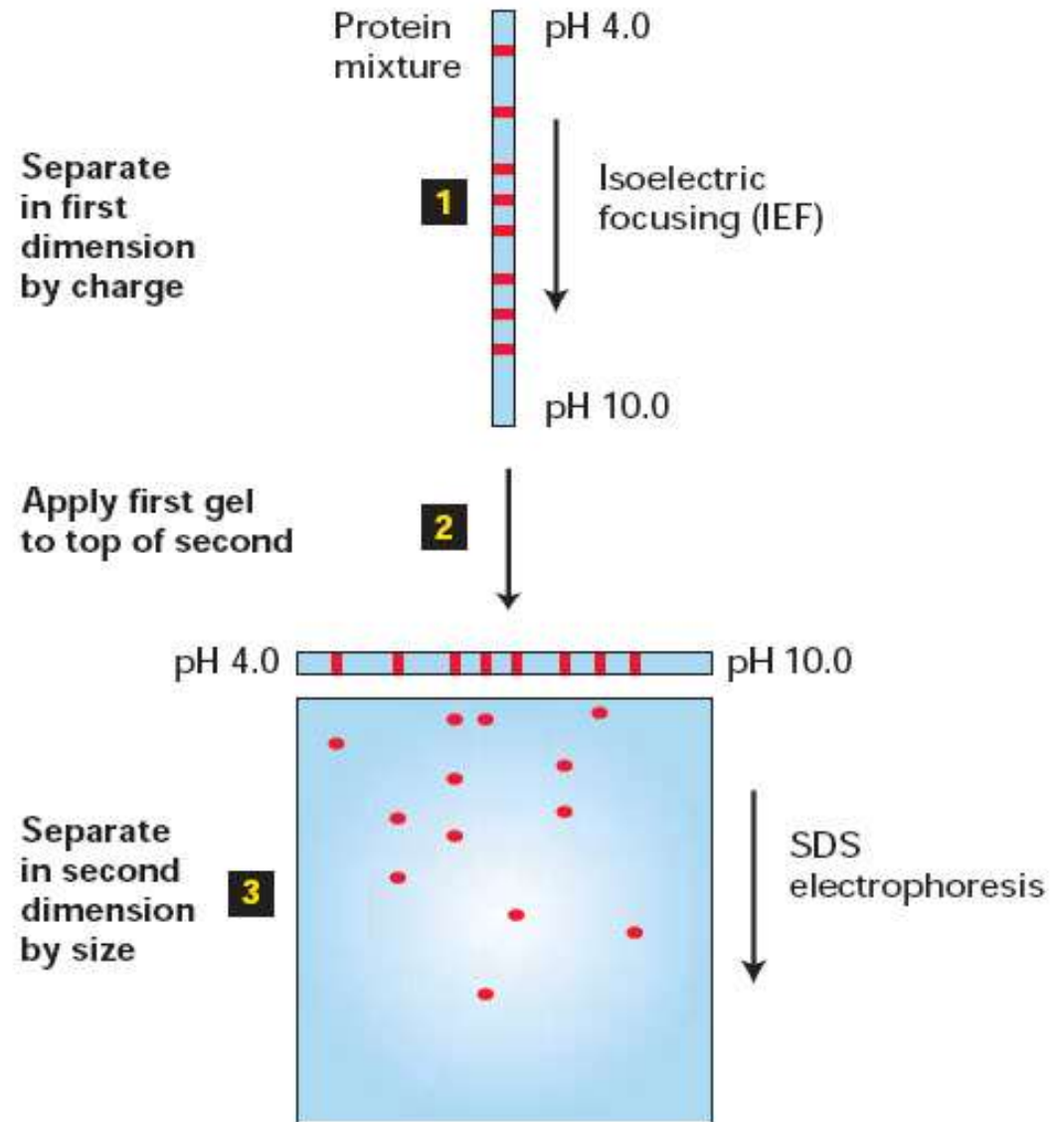


**Proteomica**

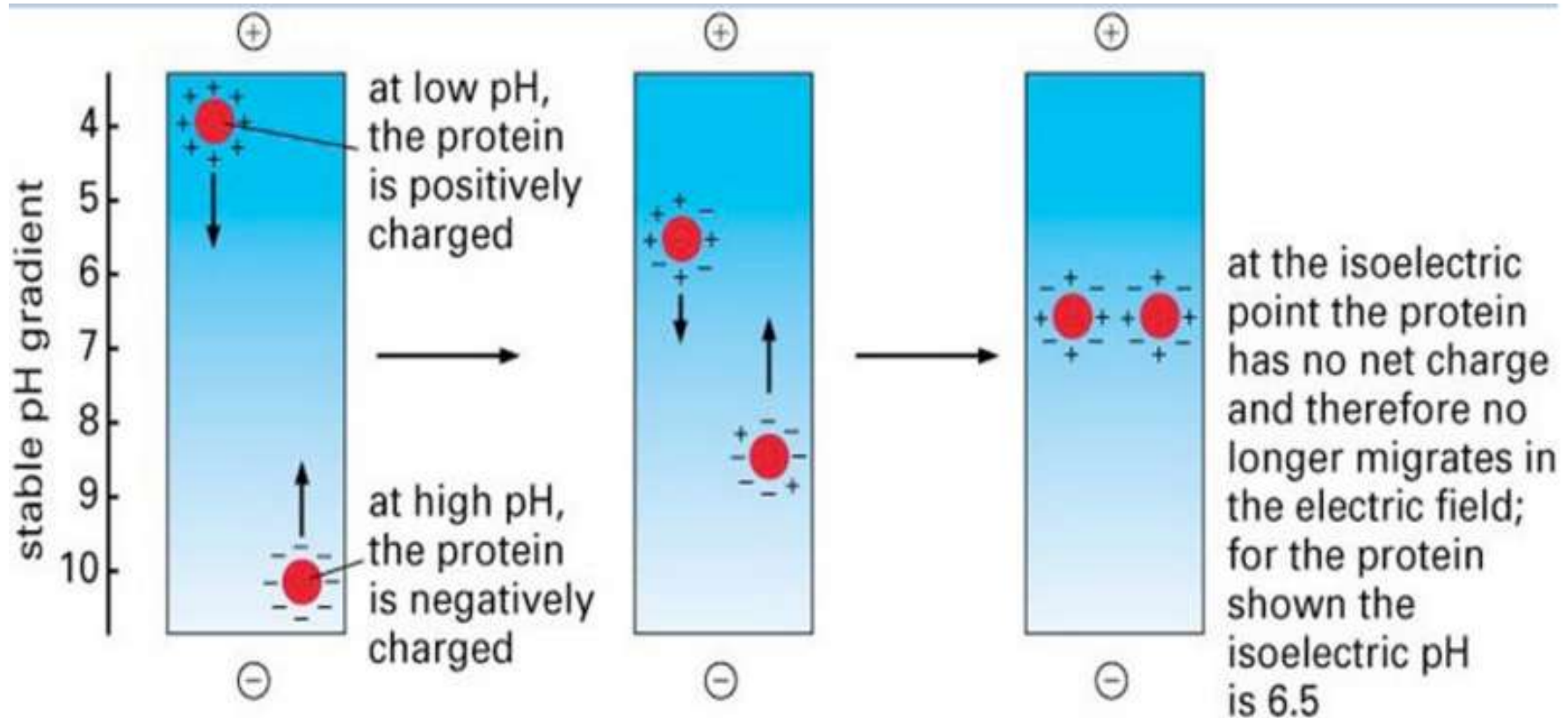
**Elettroforesi bidimensionale-Spettrometria di massa**

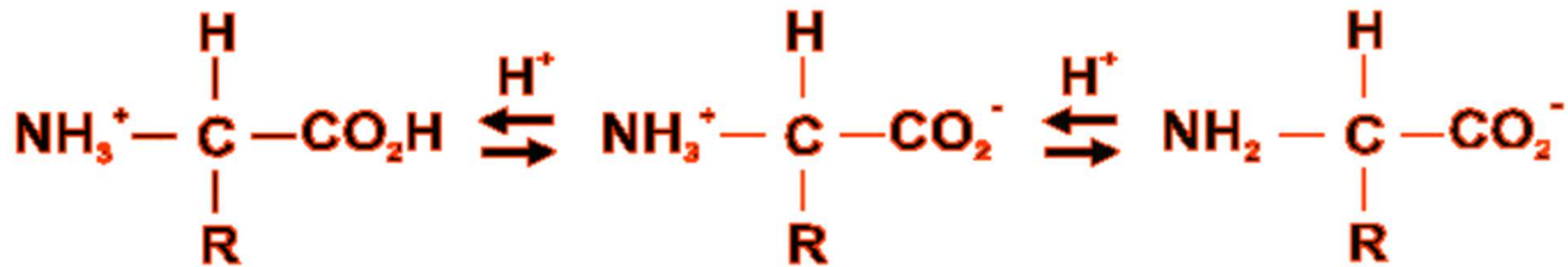
# Elettroforesi Bidimensionale

Le proteine sono separate per carica (gradiente di pH) e per grandezza.



# Isoelettrofocalizzazione





Carica positiva

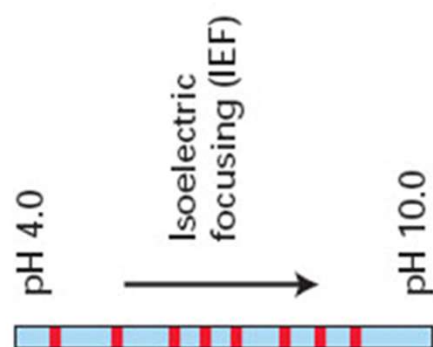
pH acido  
alta  $[\text{H}^+]$

Carica nulla

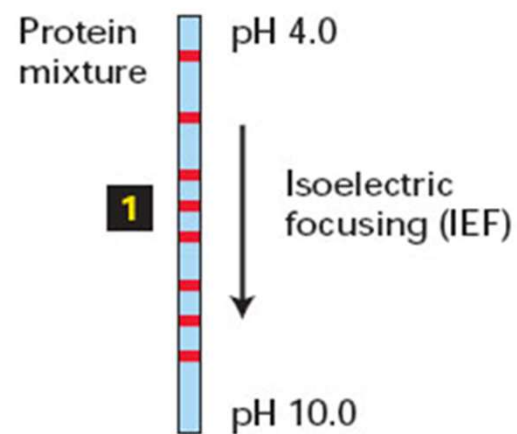
pI

Carica negativa

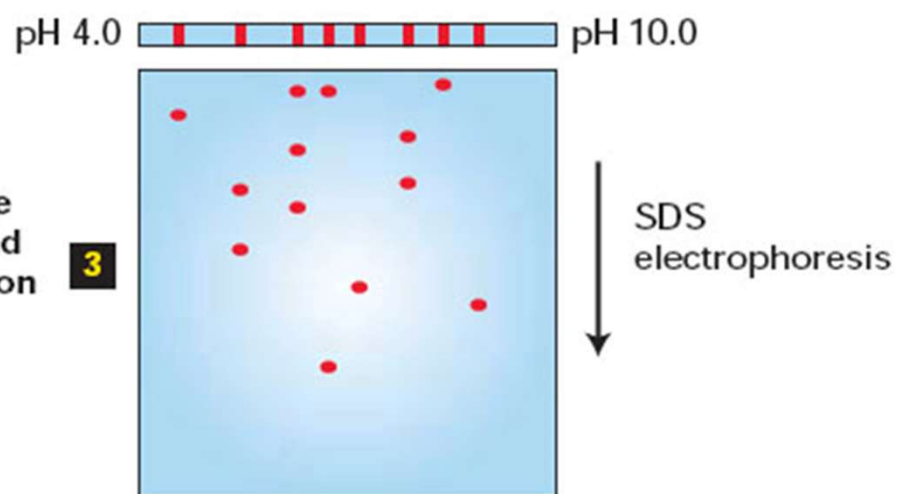
pH basico  
bassa  $[\text{H}^+]$



Separate  
in first  
dimension  
by charge

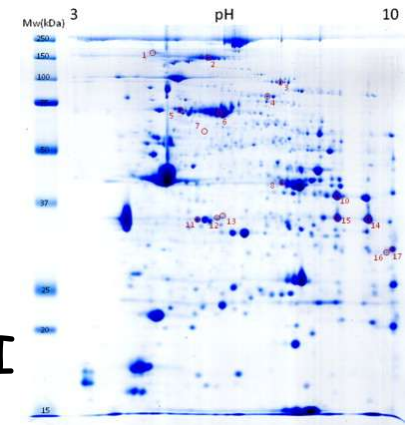


Separate  
in second  
dimension  
by size

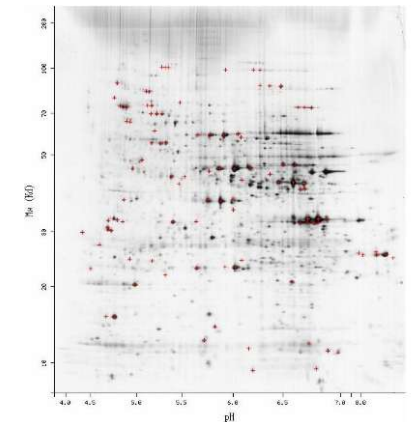


# Colorazione del gel elettroforetico

1. **Coomassie staining** da 50- a 100-volte meno sensibile della colorazione argento ma relativamente semplice e più quantitativo. Il blu di Coomassie è migliore per la spettrometria di massa perché la colorazione argentea è incompatibile.



2. **Silver staining** è il metodo non-radioattivo più sensibile (sotto 1 ng). Si tratta però di un processo multi-step complesso che ha alcuni passaggi critici.

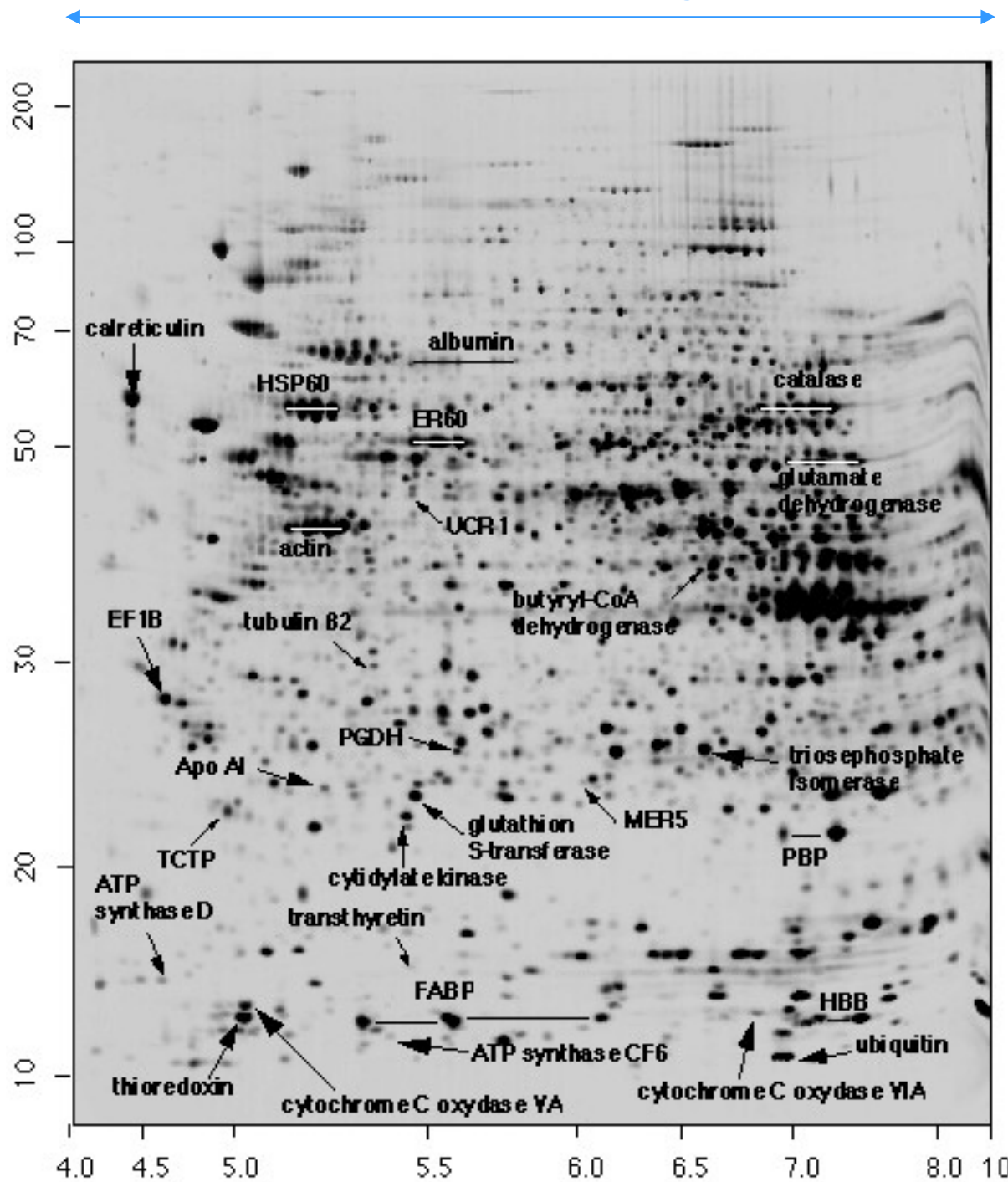


3. **Fluorescent staining SYPRO™** ha una sensibilità intermedia fra le due colorazioni precedenti. Richiede l'utilizzo di uno scanner per fluorescenza ed è compatibile con la spettrometria di massa.

Ogni macchia corrisponde ad una proteina

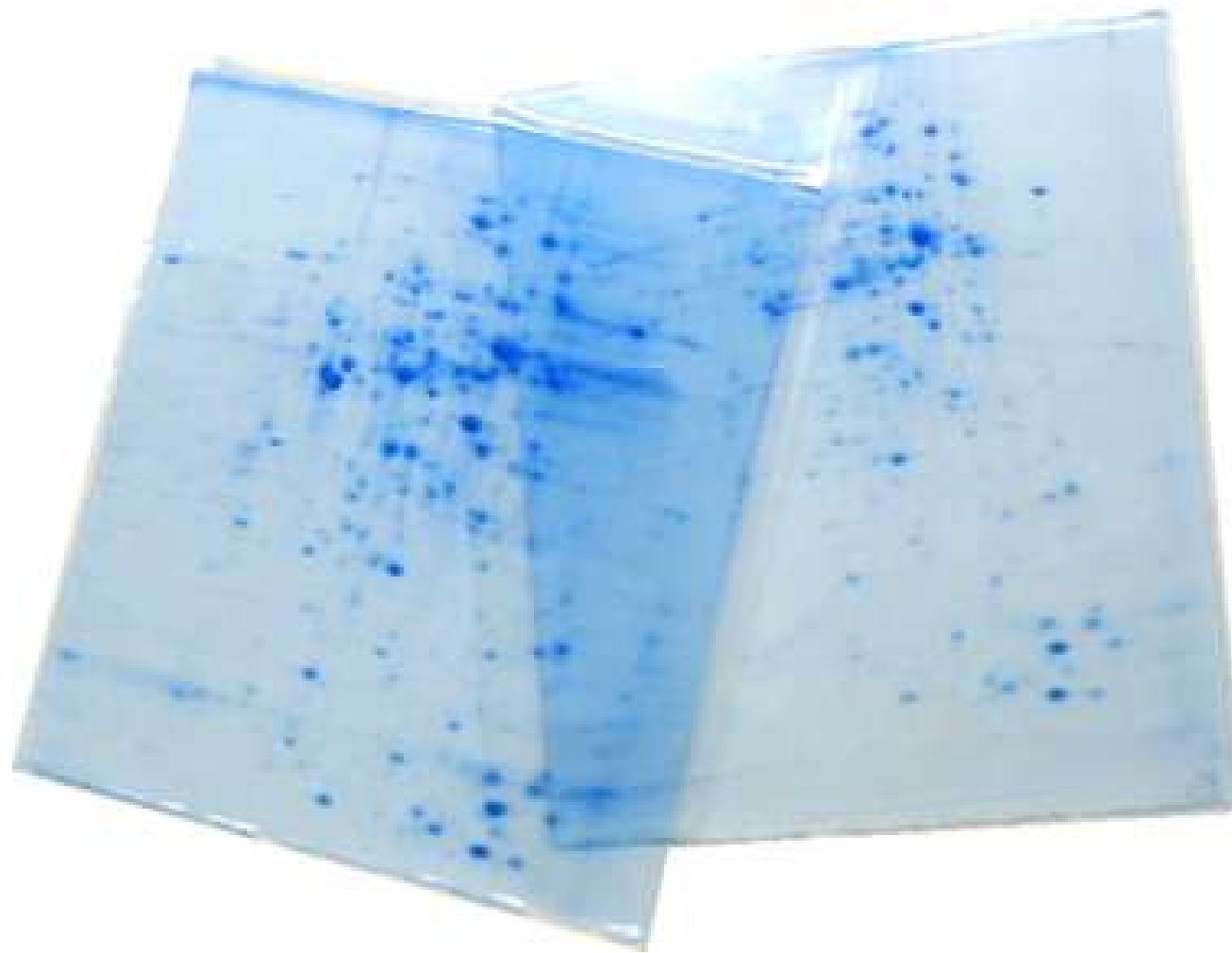


# Isoelectric focusing



Proteoma di  
fegato adulto

## Analisi comparativa di estratti proteici



# Identificazione di una proteina tramite spettrometria di massa

Metodo:

matrix-assisted laser desorption ionization time of flight  
**(MALDI-TOF)**

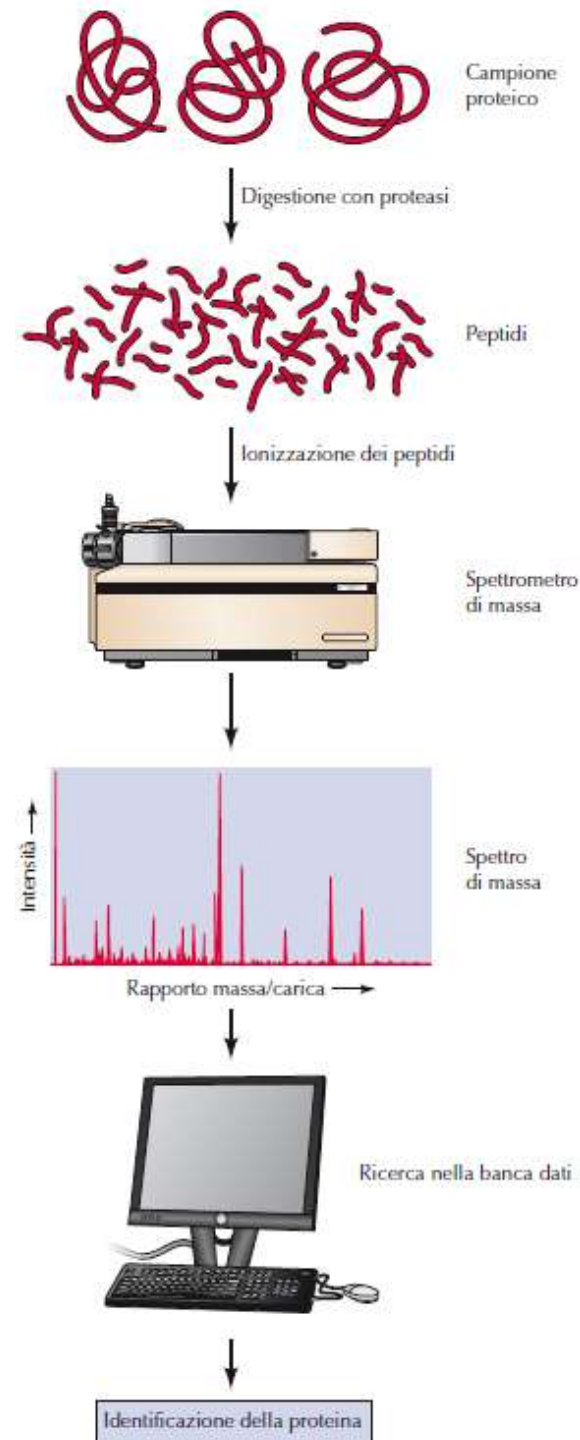
-Una macchia ritagliata dal gel è digerita da una proteasi in piccoli peptidi.

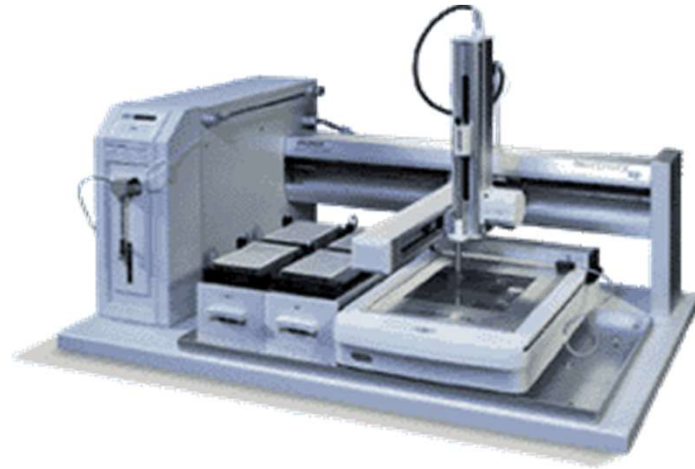
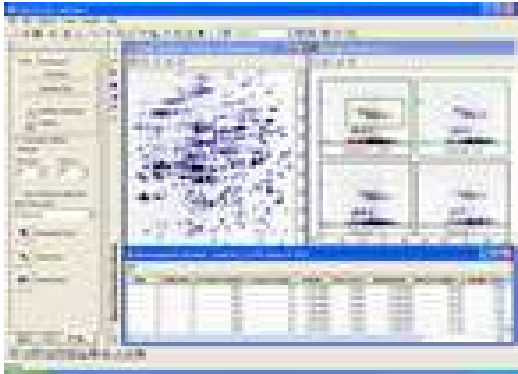
-I peptidi vengono sottoposti ad una alta carica che li ionizza e li rende volatili.

- La proteina ridotta a peptidi e ionizzata viene accelerata da un campo elettrico (20.000V) e lanciata in un tubo di volo (TOF).

-La velocità di volo dipende dalla massa e caratterizza ogni peptide.

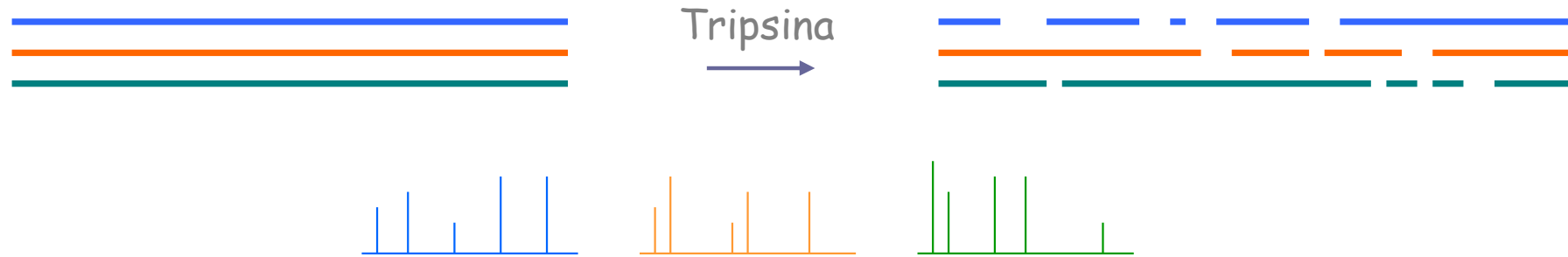
-Uno spettro di massa sarà confrontato con spettri teorici di un data base e la proteina potrà essere identificata.





# Digestione proteolitica "in gel" della proteina

Massa (peso molecolare)= identita' della proteina? No!



## Peptide mass fingerprint

*Proteolytic enzymes*

*Cleavage specificity*

Chymotrypsin

Phe and Try

Trypsin

Arg and Lys

Lys-C protease

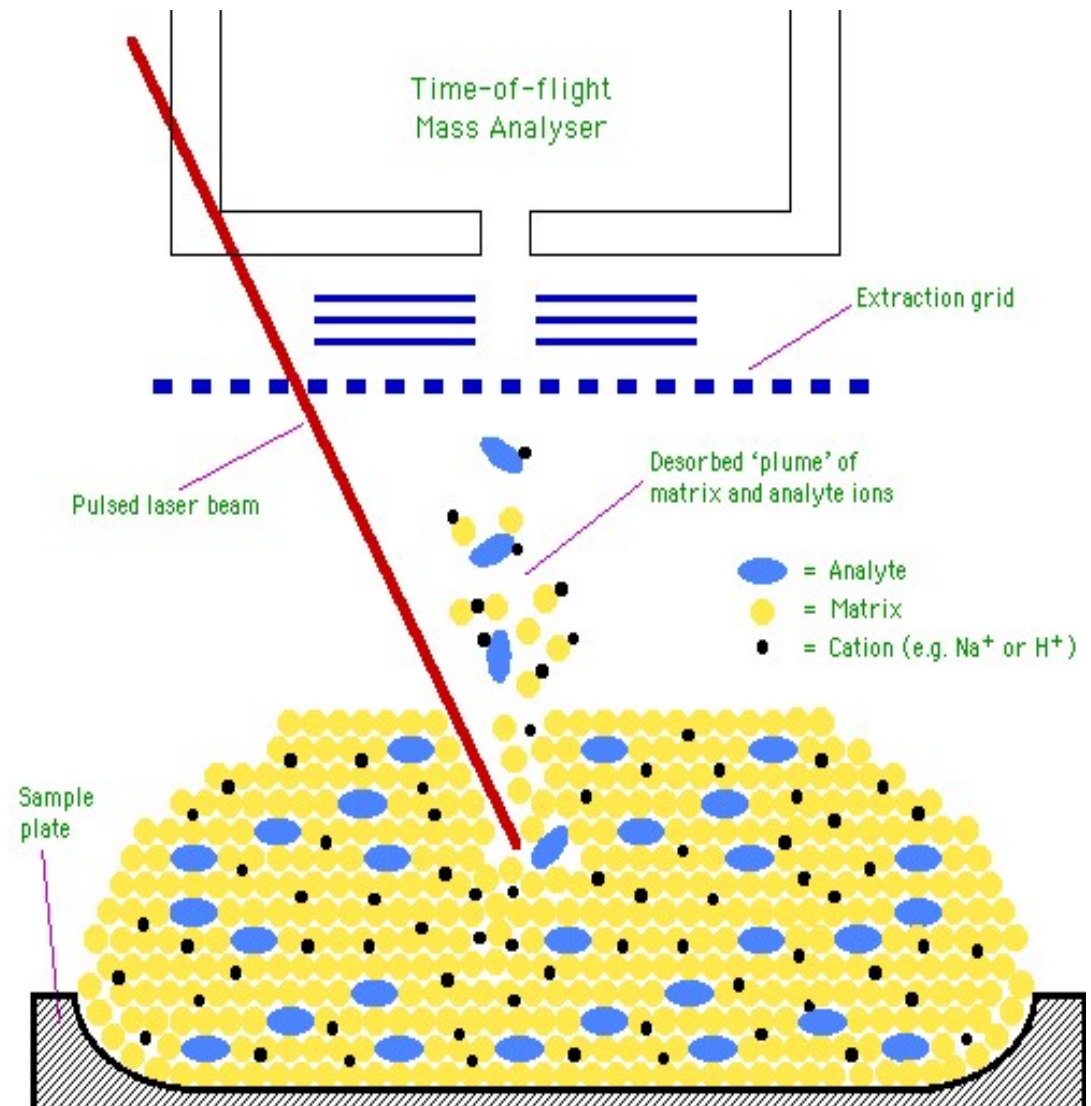
Lys

Arg-C protease

Arg

L'energia del laser colpendo la matrice ne provoca la rapida eccitazione con conseguente passaggio degli ioni della matrice e dell' analita in fase gassosa.

La proteina ionizzata viene accelerata da un campo elettrostatico (20.000V) e espulsa in un tubo di volo (TOF)



# Time-of-Flight Mass Analyzer

Ion Source

Flight Tube

+20 kV

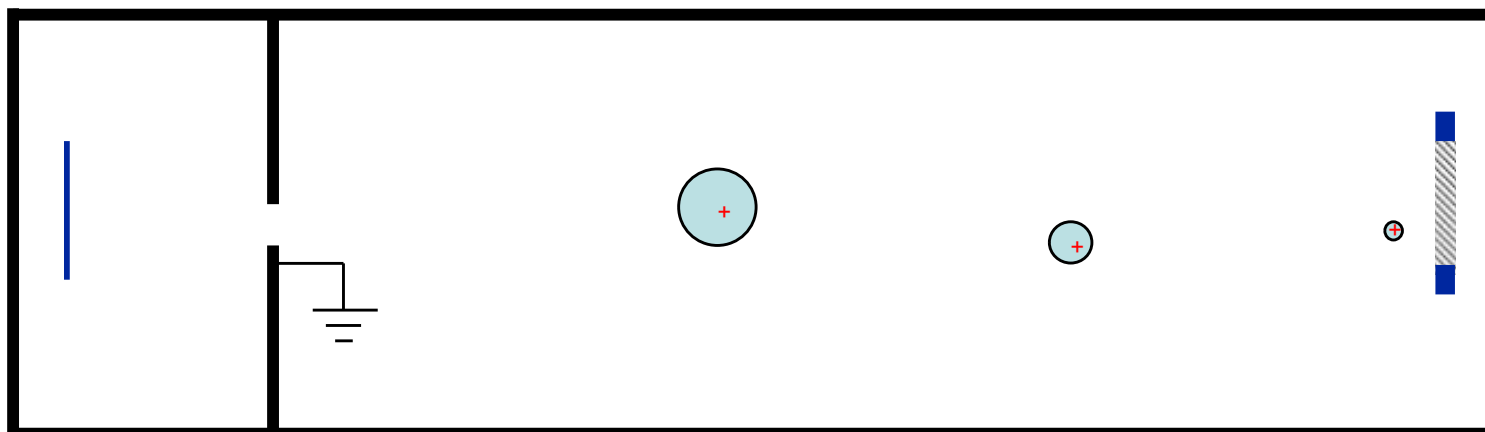


Detector

# Time-of-Flight Mass Analyzer

Ion Source

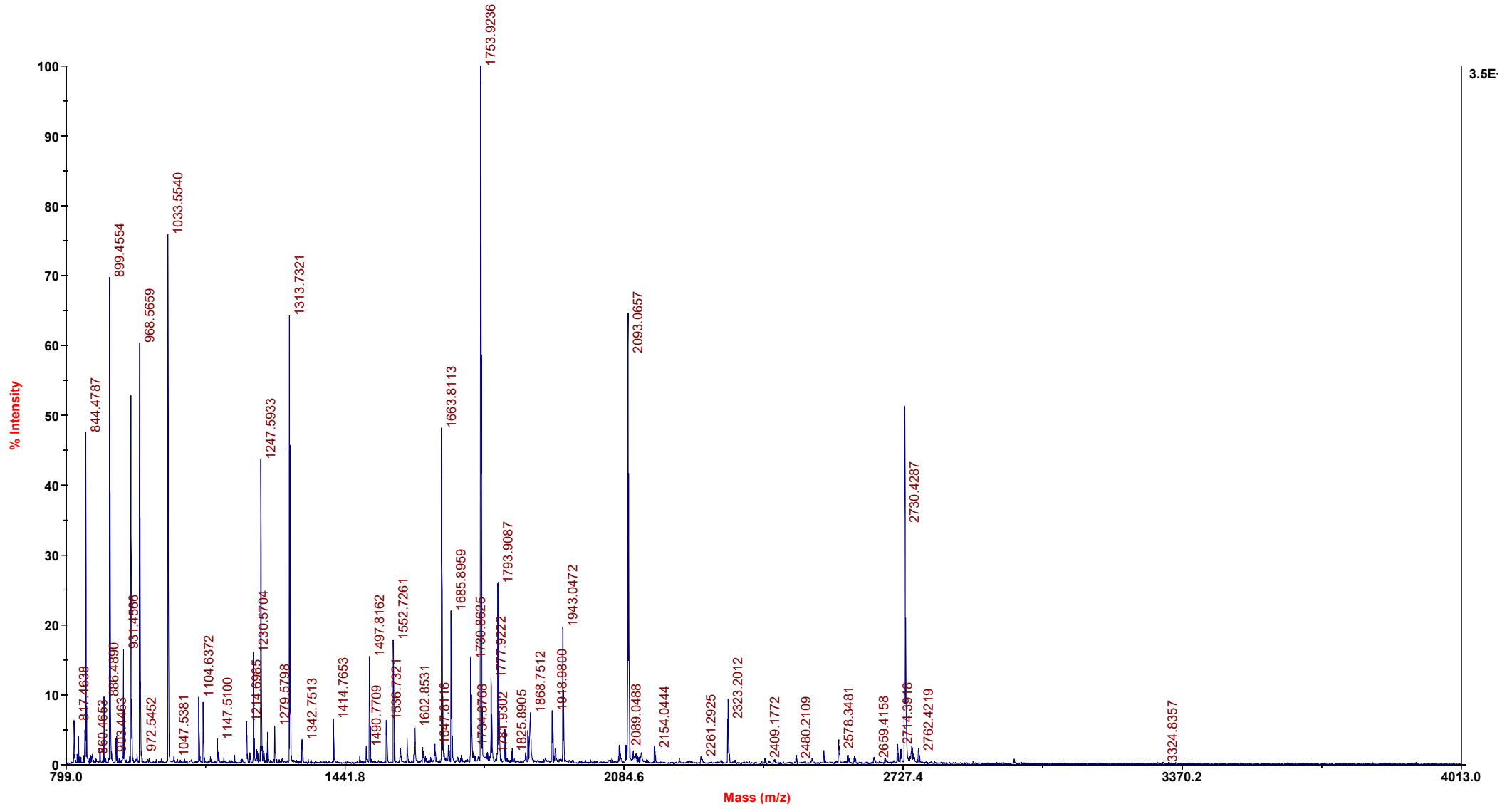
Flight Tube



Detector

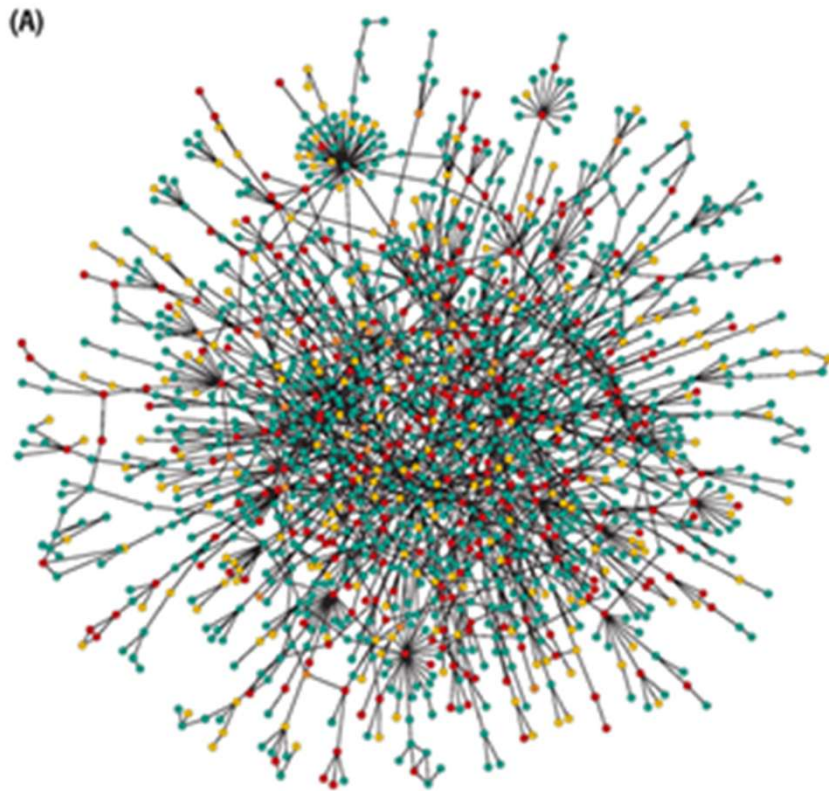
Il TOF e' un cronometro!

4700 Reflector Spec #1[BP = 1753.9, 34594]



# Oltre il proteoma

## L'Interattoma



Relativamente poche proteine generano **nodi** da cui partono molte interazioni. La maggior parte delle proteine contrae poche interazioni.

Le mutazioni inattivanti le proteine dei nodi possono essere letali (ridondanza).

Alcune proteine stanno in nodi da cui partono interazioni simultanee che sottostanno ad una funzione cellulare (nodi party).

Alcune proteine sono al centro di nodi che collegano tra di loro le reti di interazione delle singole funzioni cellulari (nodi date). Queste ultime sono il vero fulcro del proteoma e le loro mutazioni sono gravissime.

## A Proteome-Scale Map of the Human Interactome Network

Thomas Rolland,<sup>1,2,19</sup> Murat Taşan,<sup>1,3,4,5,19</sup> Benoit Charletoeux,<sup>1,2,19</sup> Samuel J. Pevzner,<sup>1,2,6,7,19</sup> Quan Zhong,<sup>1,2,8,19</sup> Nidhi Sahni,<sup>1,2,19</sup> Song Yi,<sup>1,2,19</sup> Irma Lemmens,<sup>9</sup> Celia Fontanillo,<sup>10</sup> Roberto Mosca,<sup>11</sup> Atanas Kamburov,<sup>1,2</sup> Susan D. Ghiassian,<sup>1,12</sup> Xiping Yang,<sup>1,2</sup> Lila Ghamsari,<sup>1,2</sup> Dawit Balcha,<sup>1,2</sup> Bridget E. Begg,<sup>1,2</sup> Pascal Braun,<sup>1,2</sup> Marc Brehme,<sup>1,2</sup> Martin P. Broly,<sup>1,2</sup> Anne-Ruxandra Carvunis,<sup>1,2</sup> Dan Convery-Zupan,<sup>1,2</sup> Roser Corominas,<sup>13</sup> Jasmin Coulombe-Huntington,<sup>1,14</sup> Elizabeth Dann,<sup>1,2</sup> Matija Dreze,<sup>1,2</sup> Amélie Dricot,<sup>1,2</sup> Changyu Fan,<sup>1,2</sup> Eric Franzosa,<sup>1,14</sup> Fana Gebreab,<sup>1,2</sup> Bryan J. Gutierrez,<sup>1,2</sup> Madeleine F. Hardy,<sup>1,2</sup> Mike Jin,<sup>1,2</sup> Shuli Kang,<sup>13</sup> Ruth Kirov,<sup>1,2</sup> Guan Ning Lin,<sup>13</sup> Katja Luck,<sup>1,2</sup> Andrew MacWilliams,<sup>1,2</sup> Jörg Menche,<sup>1,12</sup> Ryan R. Murray,<sup>1,2</sup> Alexandre Palagi,<sup>1,2</sup> Matthew M. Poulin,<sup>1,2</sup> Xavier Rambout,<sup>1,2,15</sup> John Rasla,<sup>1,2</sup> Patrick Reichert,<sup>1,2</sup> Viviana Romero,<sup>1,2</sup> Elien Ruysinck,<sup>9</sup> Julie M. Sahalie,<sup>1,2</sup> Annemarie Scholz,<sup>1,2</sup> Akash A. Shah,<sup>1,2</sup> Amitabh Sharma,<sup>1,12</sup> Yun Shen,<sup>1,2</sup> Kerstin Spirohn,<sup>1,2</sup> Stanley Tam,<sup>1,2</sup> Alexander O. Tejada,<sup>1,2</sup> Shelly A. Trigg,<sup>1,2</sup> Jean-Claude Twizere,<sup>1,2,15</sup> Kerwin Vega,<sup>1,2</sup> Jennifer Walsh,<sup>1,2</sup> Michael E. Cusick,<sup>1,2</sup> Yu Xia,<sup>1,14</sup> Albert-László Barabási,<sup>1,12,16</sup> Lilia M. Iakoucheva,<sup>13</sup> Patrick Aloy,<sup>11,17</sup> Javier De Las Rivas,<sup>10</sup> Jan Tavernier,<sup>9</sup> Michael A. Calderwood,<sup>1,2,20</sup> David E. Hill,<sup>1,2,20</sup> Tong Hao,<sup>1,2,20</sup> Frederick P. Roth,<sup>1,3,4,5,18,\*</sup> and Marc Vidal<sup>1,2,\*</sup>

ANSA.it TORNA SU ANSA.it

# Scienza&Tecnica

NEWS DOSSIER GALLERIA FOTOGRAFICA VIDEO **ragazzi**

Spazio & Astronomia | Biotech | Tecnologie | Fisica & Matematica | Energia | Terra & Poli | Ricerca e Istituzioni | Libri | Ricerca nel Sud | Seguici su

ANSA > Scienza&Tecnica > Biotech > Ricostruito il social network delle proteine umane

## Ricostruito il social network delle proteine umane

**Aiuta a scoprire i geni che causano i tumori**

21 novembre, 10:35 G+ Tweet Consiglia 5

◊ Indietro Stampa Invia Scrivi alla redazione Suggestisci () A A A

1 di 1



PUBBLICITÀ

## Amicizie 'pericolose'

"Una volta scoperto che le proteine associate alla stessa malattia hanno una maggiore probabilità di essere interconnesse fra loro - spiega Roth - è possibile usare questo network di interazioni come strumento predittivo per trovare nuove proteine del cancro e i geni che le producono".

Grazie a questa metodica, i ricercatori hanno verificato che ben 60 dei geni che avevano identificato come possibili cause di tumori rientrano realmente in quei circuiti molecolari che 'accendono' la malattia.

# Citometro a flusso e Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS)



# Funzioni del FACS

Fluidica



Le cellule in sospensione viaggiano in un flusso laminare in fila indiana

Ottica



La singola cellula disperde/devia (scatter) la luce di un raggio laser (ed emette fluorescenza)

Elettronica



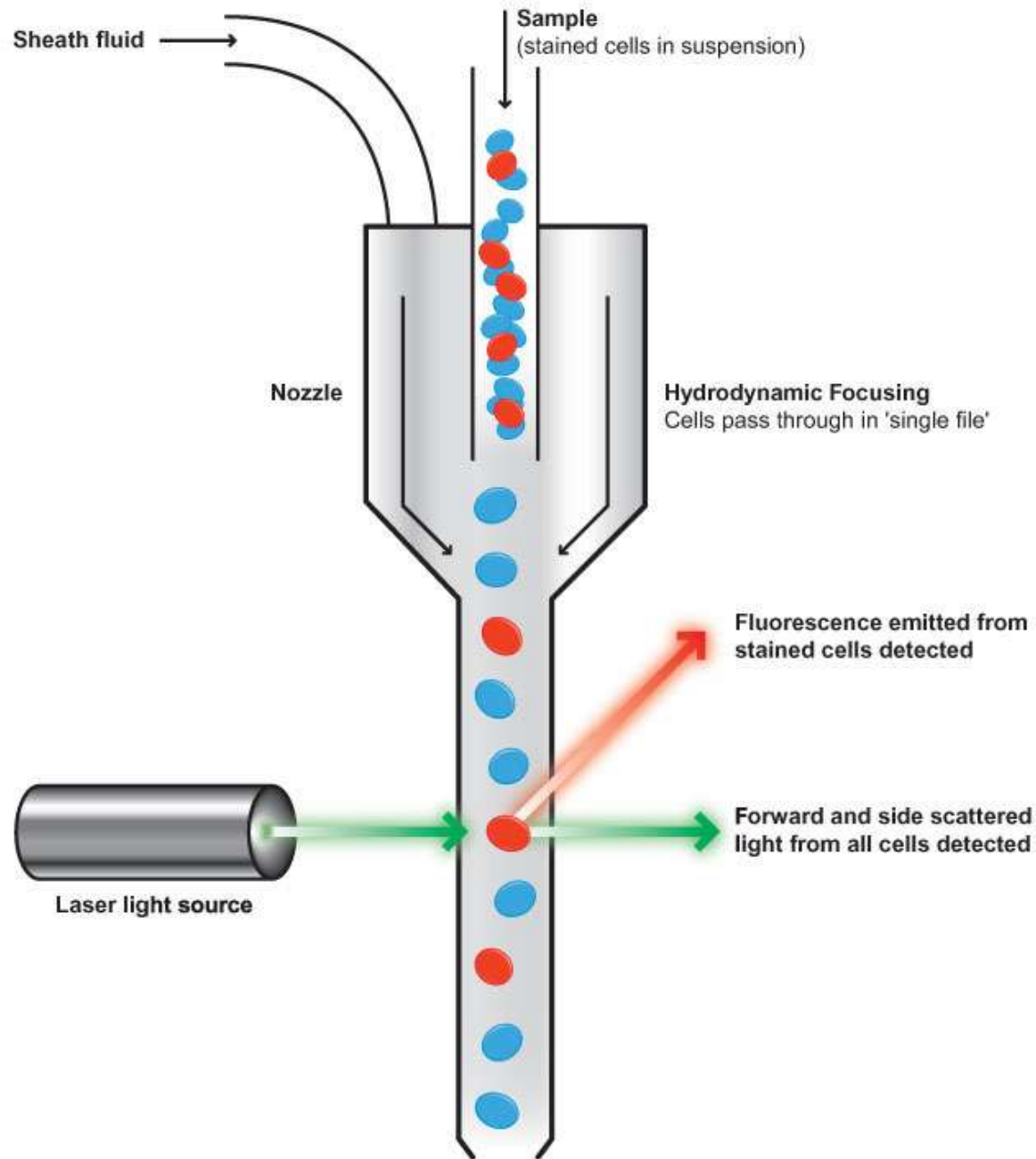
I raggi della luce deviata e della fluorescenza emessa sono raccolti, filtrati e convertiti in valori digitali che sono salvati in un computer

Sorter

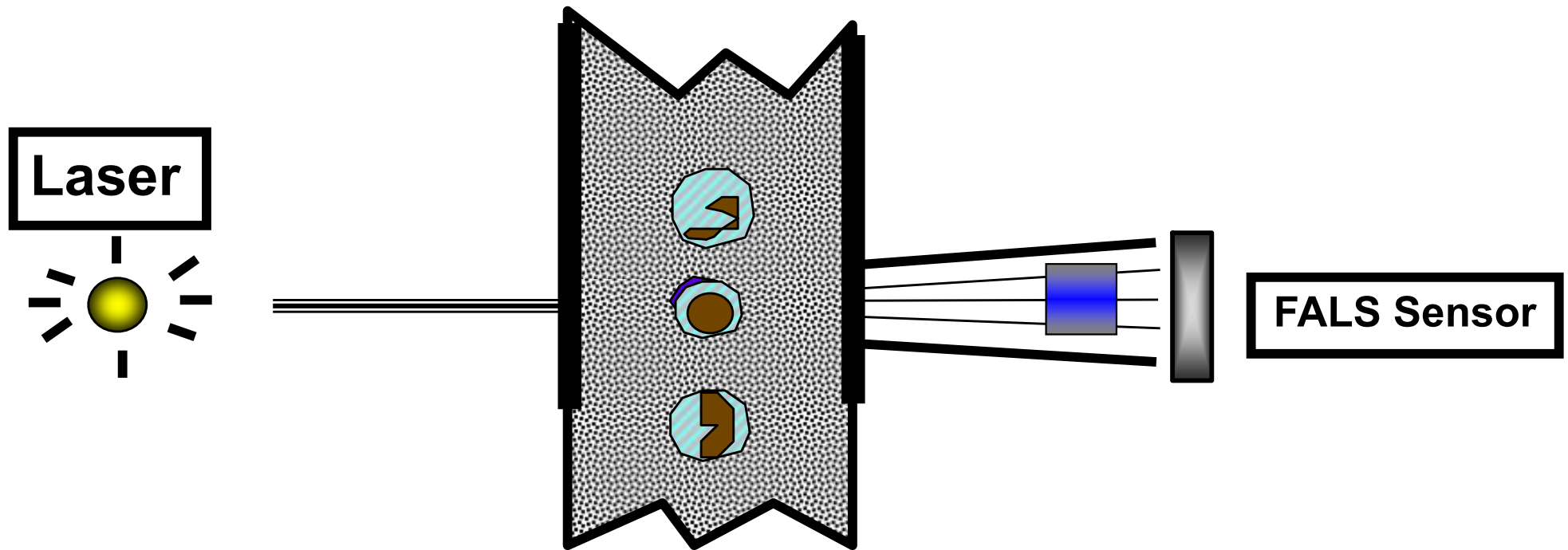


Le cellule con le caratteristiche richieste vengono separate dal resto della popolazione

# Funzione fluidica



Forward Scatter (FSC)

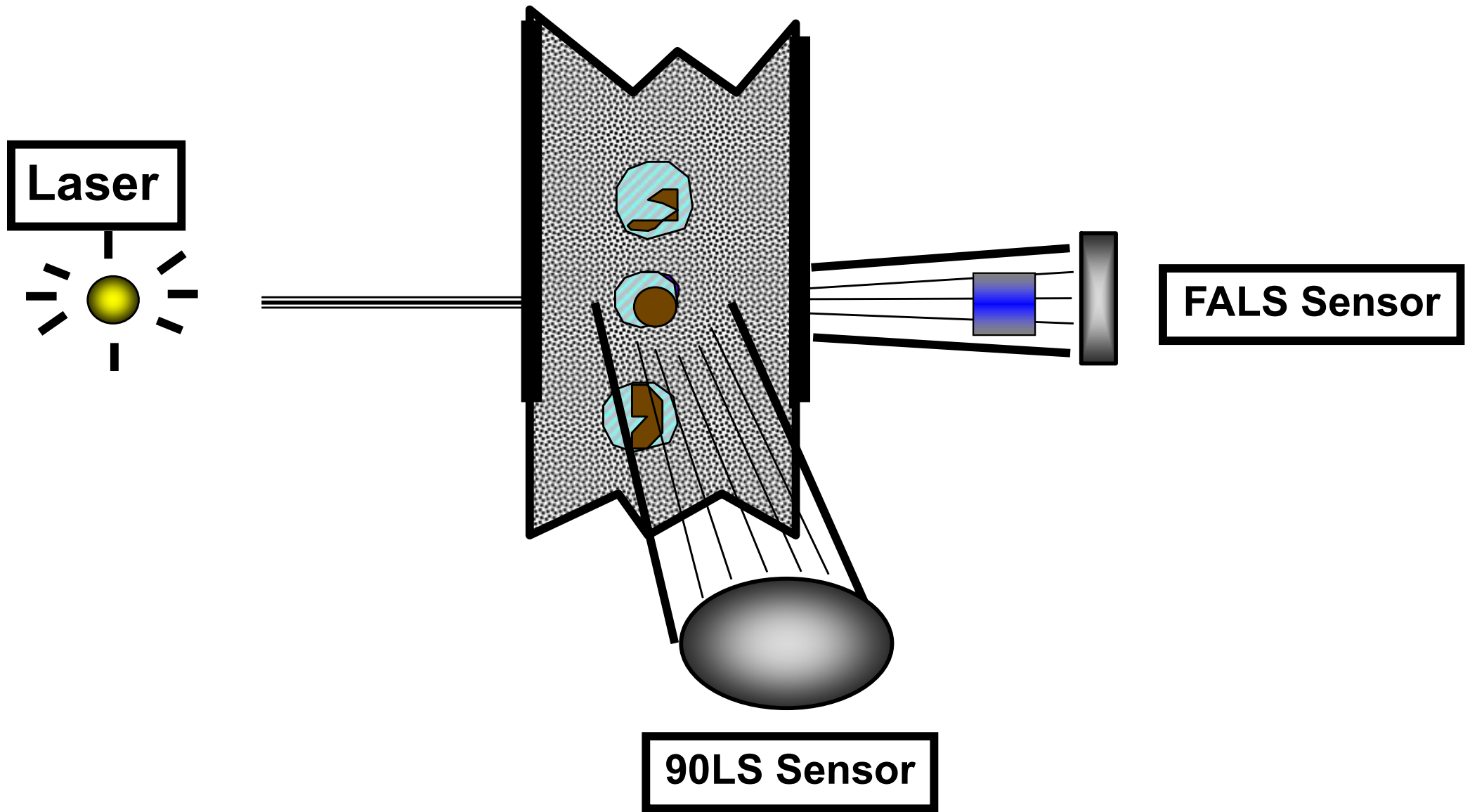


Forward angle light scatter

Quando viene usata una sorgente laser, la quantità di luce *scattered* nella direzione frontale (lungo lo stesso asse della luce) viene rilevata nel canale del **forward scatter**, o **scatter frontale**, o **180° scatter**.

L'intensità del forward scatter è correlata alla **dimensione**, alla **forma** ed all'omogeneità della cellula

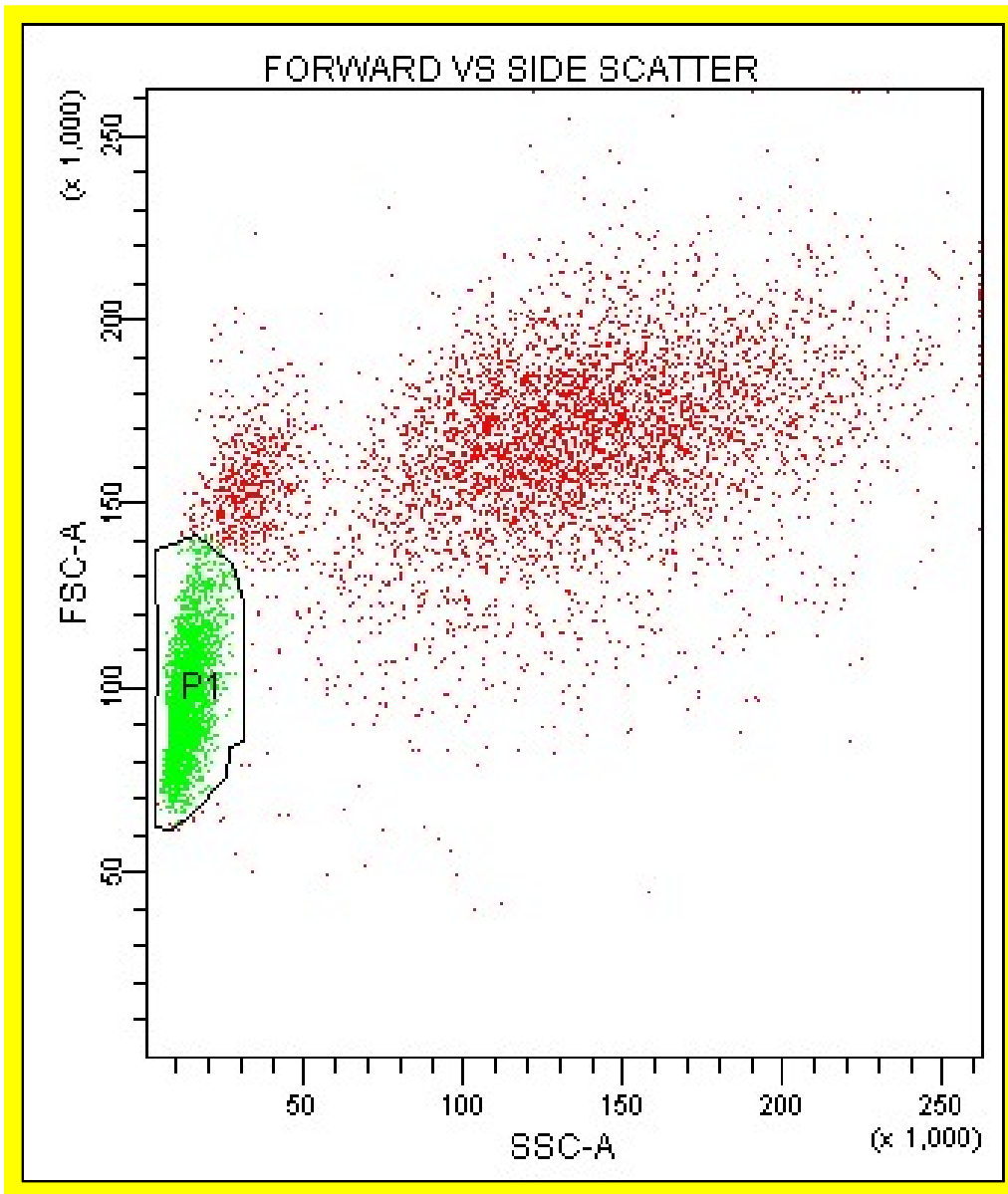
# Side Scatter (o 90 gradi light scatter) (SSC)



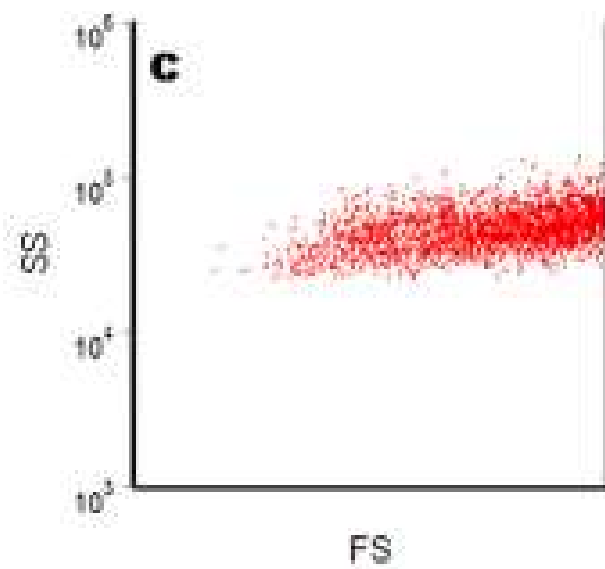
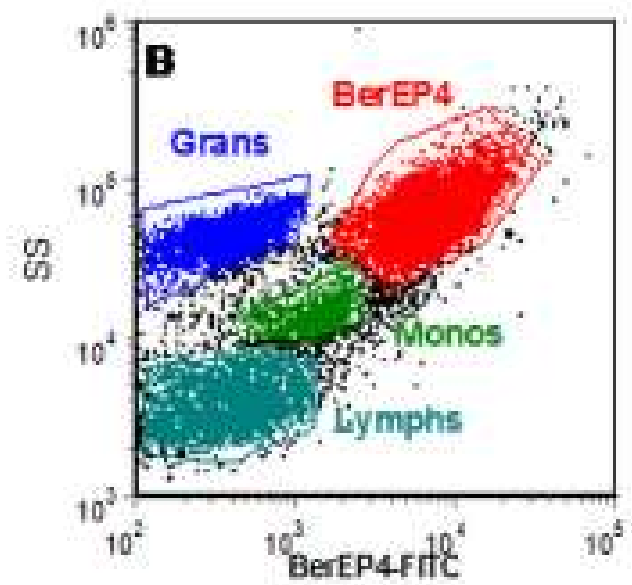
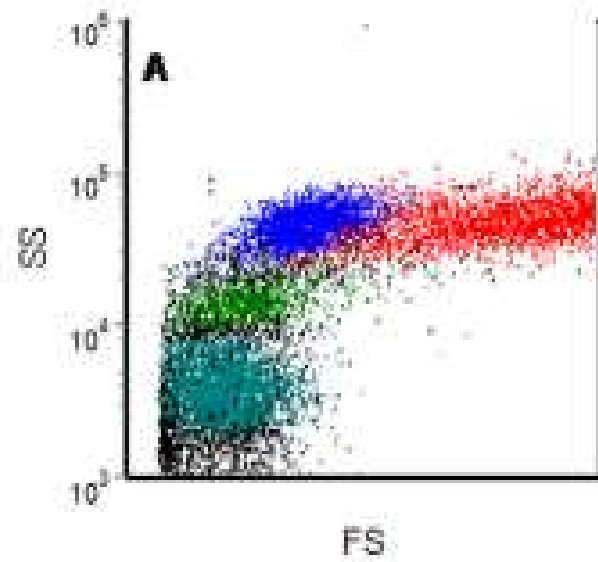
Quando viene usata una sorgente laser, la quantità di luce *scattered* di lato (perpendicolare all'asse del laser) è rilevata nel **canale del side o 90 gradi scatter, o right scatter, o scatter laterale.**

L'intensità del side scatter è correlata alla **complessità ottica** (granulosità) delle cellule: rugosità della superficie e numero di organuli citoplasmatici.

La dimensione, la forma e la complessità delle cellule sono considerati parametri intrinseci dal momento che possono essere ottenuti senza sottoporre il campione a particolari procedure di marcatura



Descrizione bi-parametrica  
Citogramma



### Marcatura del campione con fluorocromi

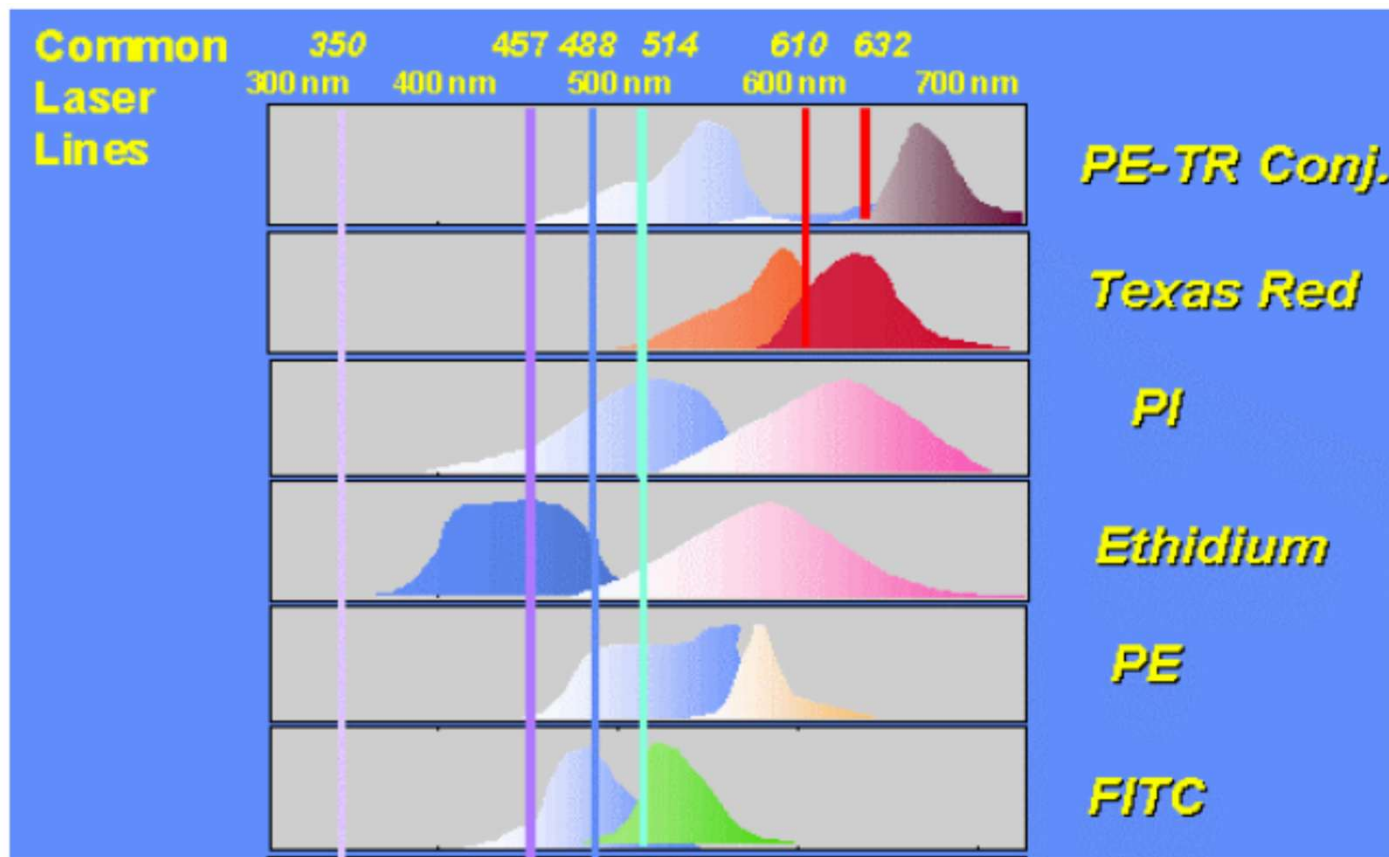
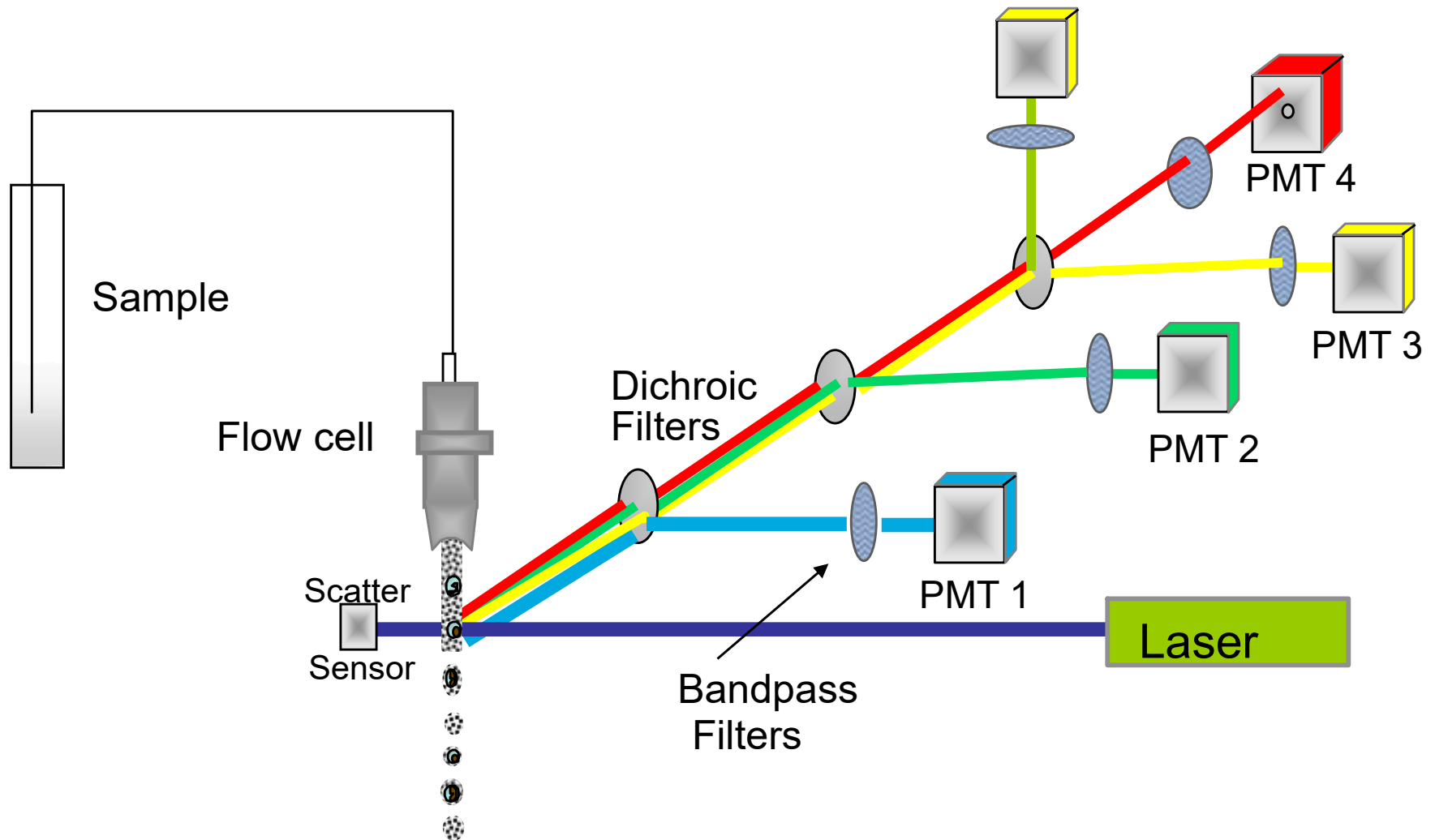


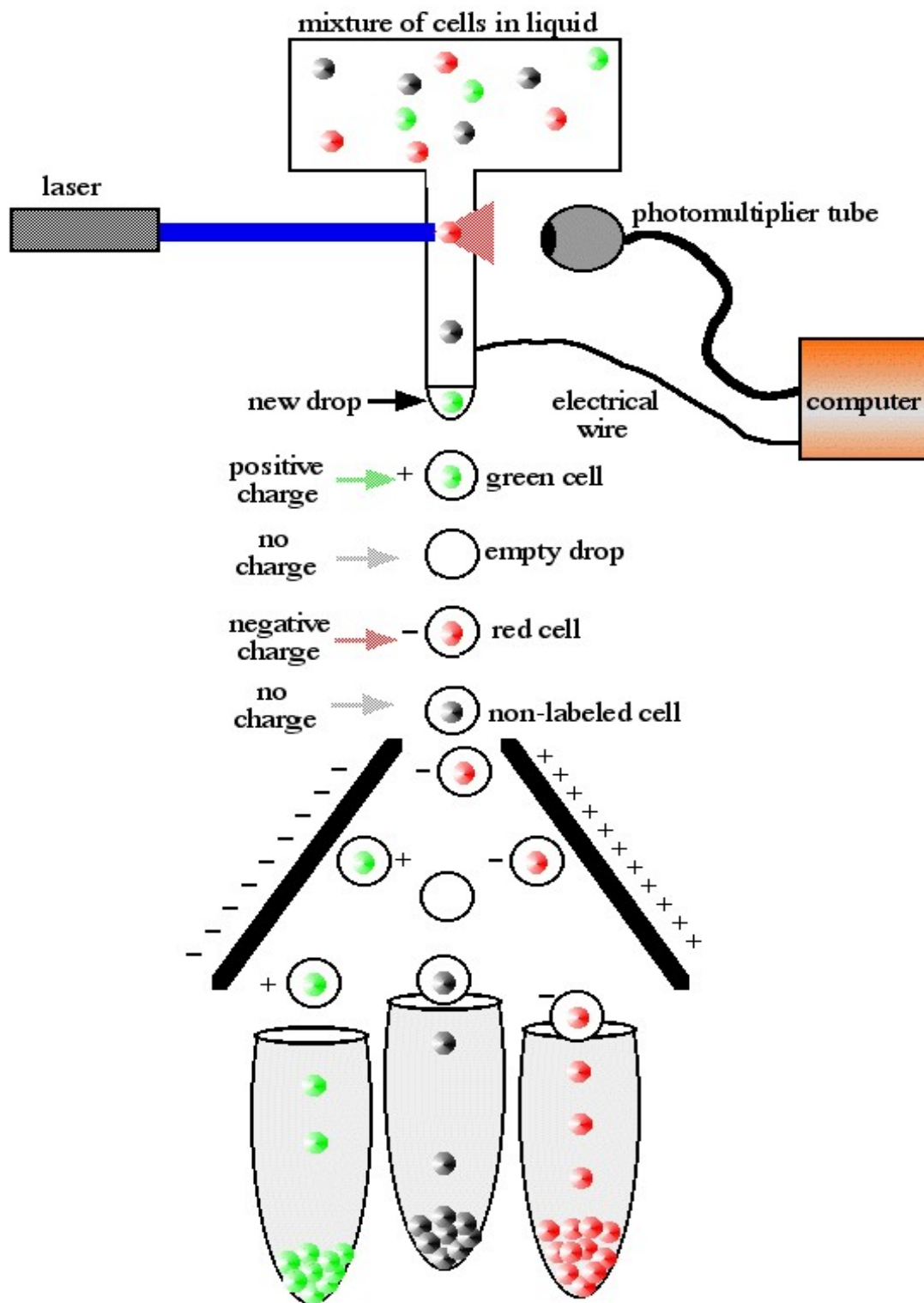
Figura 3- Spettri di eccitazione e di emissione di alcuni dei fluorocromi di più ampio impiego.

La fluorescenza emessa da ciascun fluorocromo è usualmente rilevata in un unico canale di fluorescenza.

La specificità del rilevamento è controllata dalla selettività di filtri ottici e di specchi.



Il **filtro dicroico** è posto a  $45^\circ$  rispetto al raggio laser e blocca, deviandolo di  $90^\circ$ , il fascio di luce di una specifica lunghezza d'onda. Il **band-pass filter** permette il passaggio della luce solo ad una particolare lunghezza d'onda . Il **fotomoltiplicatore (PMT)** è un detector molto sensibile del segnale luminoso.



## Funzione sorter

Il computer elabora i dati che servono a individuare le singole cellule del flusso laminare.

Il flusso laminare è separato in gocce contenenti singole cellule tramite ultrasuoni.

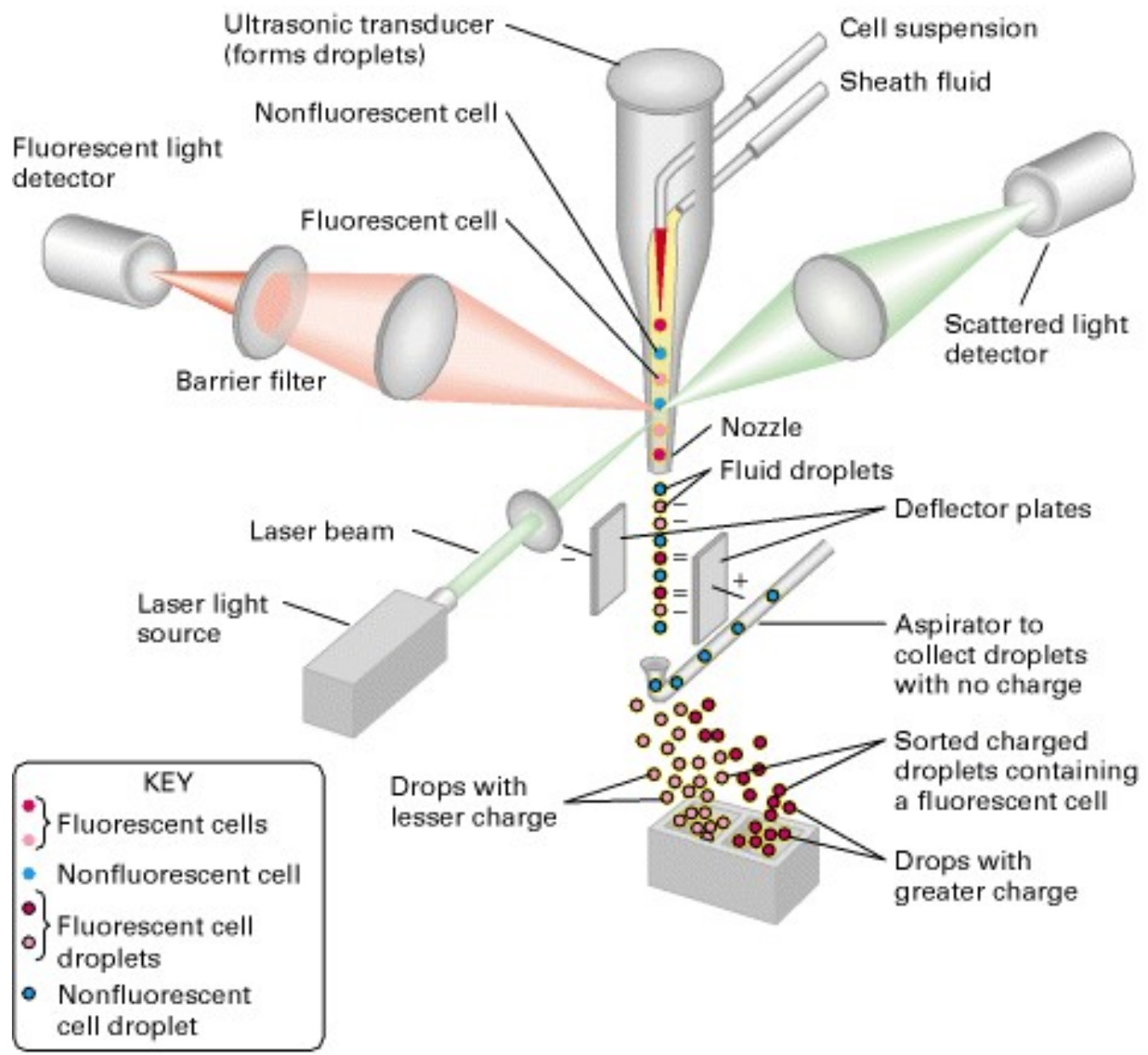
Le gocce vengono caricate elettricamente.

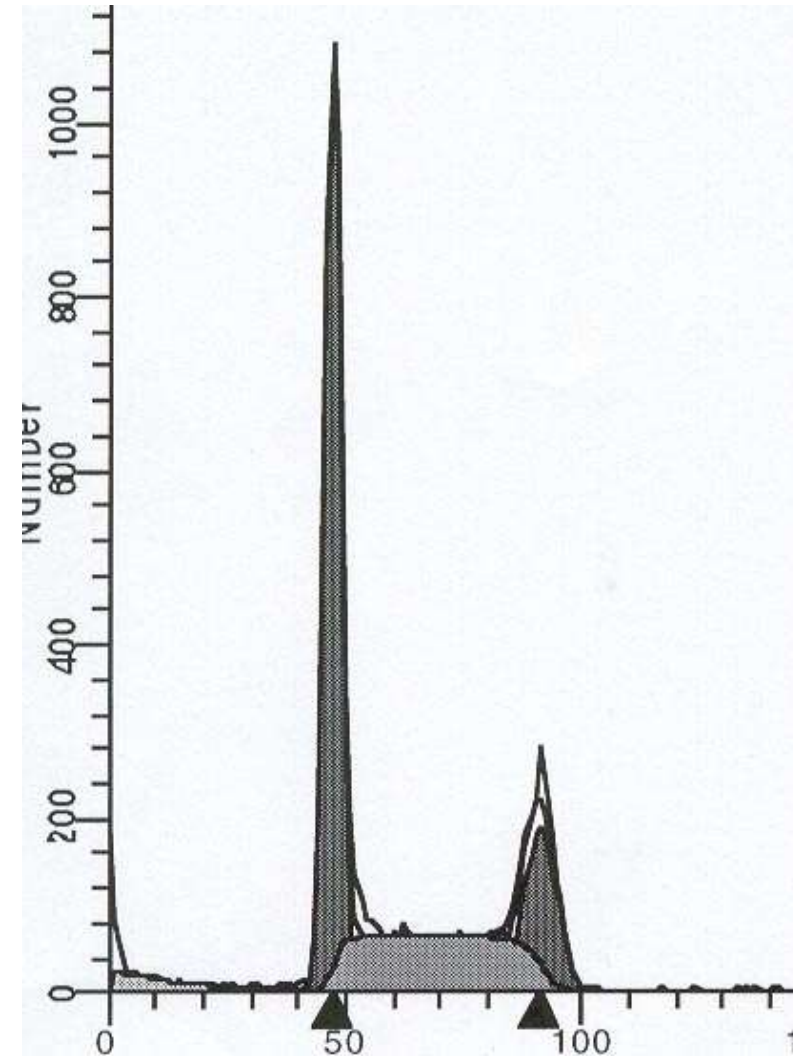
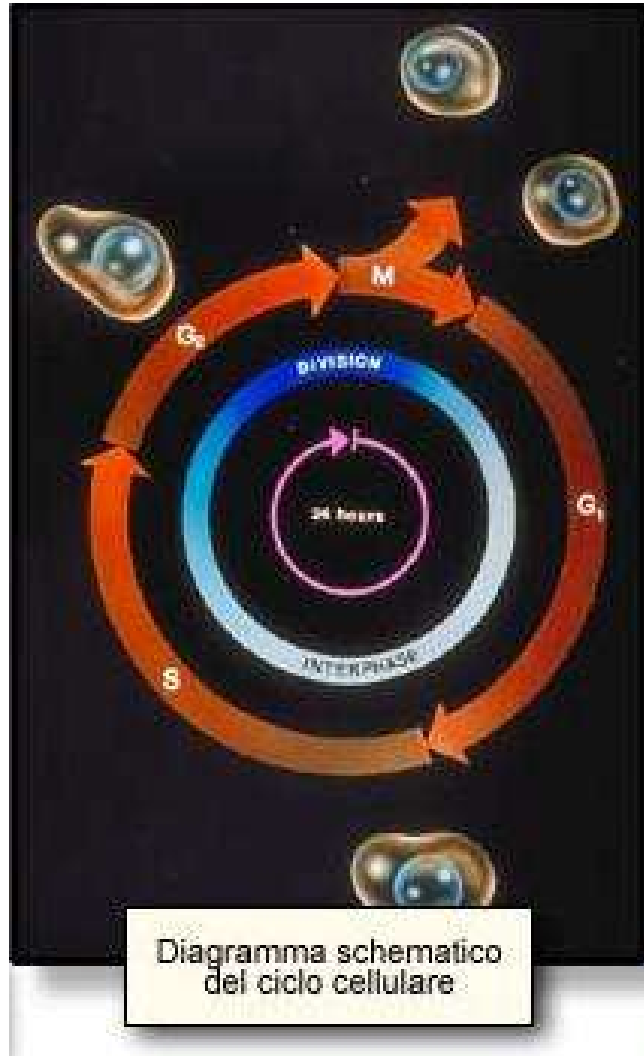
Le gocce cariche vengono deviate da elettrodi carichi e indirizzate verso specifici contenitori.

Le gocce senza cellule vengono scartate.

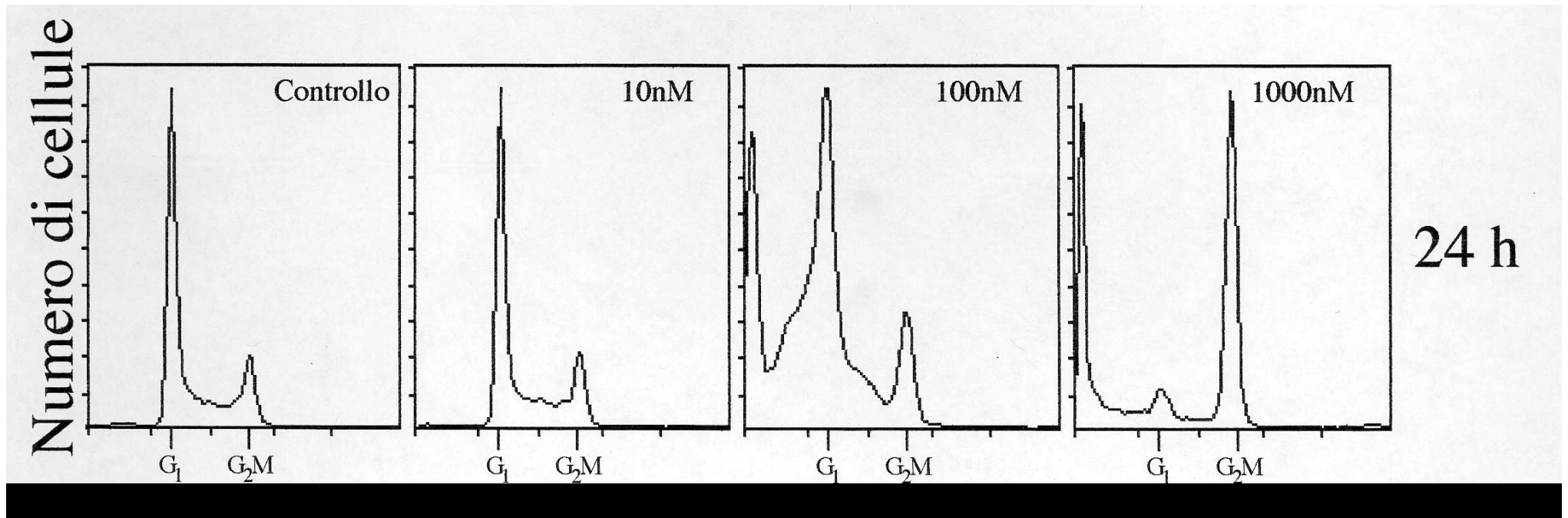
In questo caso vengono isolate tre sottopopolazioni pure di cellule: una positiva al marcatore verde, una positiva al marcatore rosso e una negativa.

Il numero delle cellule in ciascun tubo e il livello di fluorescenza emessa da ciascuna di esse è noto e registrato.





Ciclo cellulare di cellule proliferanti (es. neoplastiche) e classica distribuzione del contenuto di DNA cellulare



Mentre le cellule di controllo possiedono la classica distribuzione di DNA, modificando le condizioni di crescita delle cellule (un modello cellulare di carcinoma ovarico) ovvero aggiungendo un agente anti-mitotico (Taxolo per un tempo breve) si osserva che, mentre per dosi intermedie (dell'ordine di 100nM) si ha un accumulo delle cellule in G<sub>1</sub>, per le dosi alte (1000nM) si ha un blocco delle cellule preferenzialmente in G<sub>2</sub>/M e la comparsa di un picco pre-G<sub>1</sub>. Dose basse di farmaco non inducono nessuna perturbazione del ciclo cellulare.

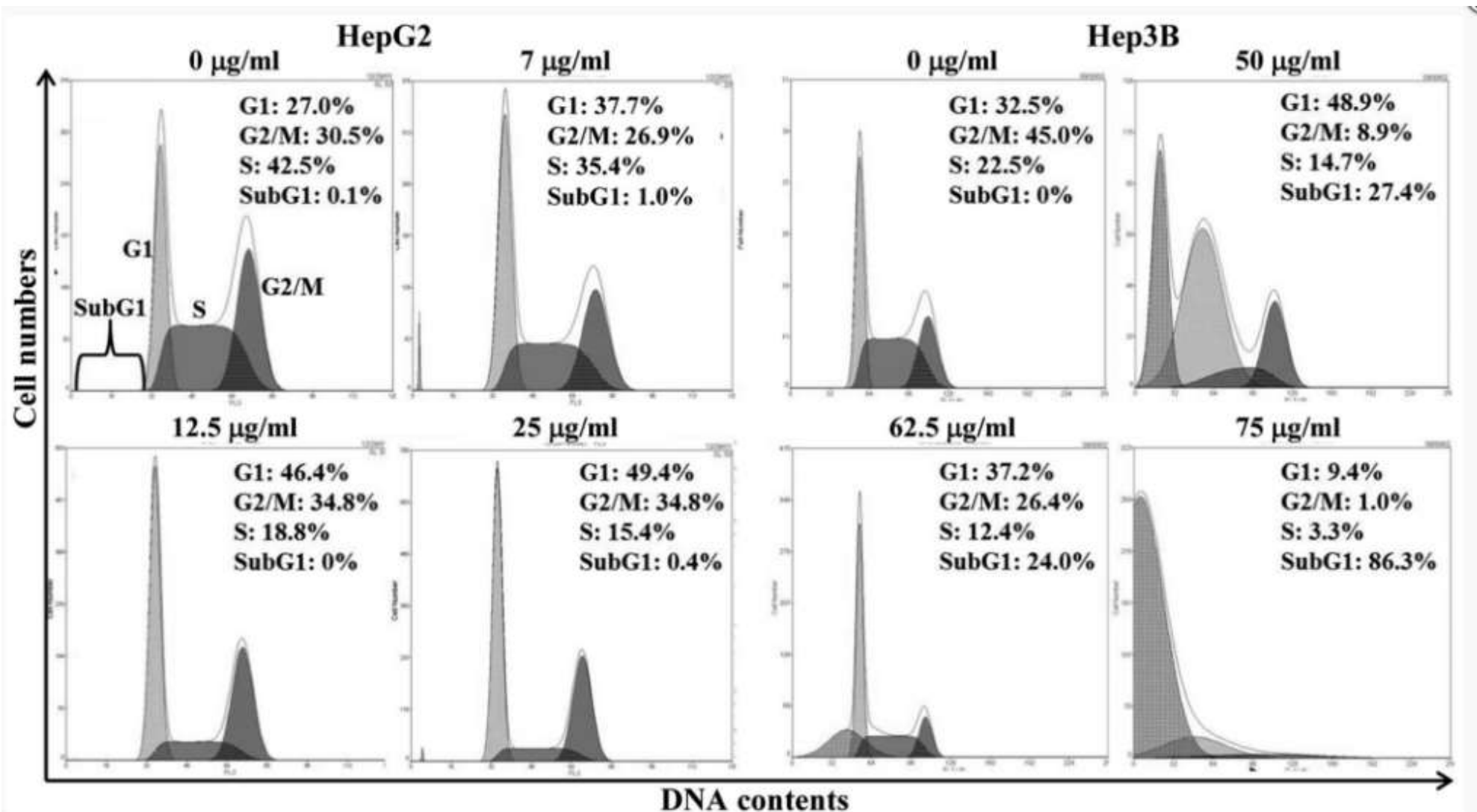


Figure 2 - Effect of luteolin on the cell cycle in HCC cells. The cells were, respectively, treated with indicated concentration of luteolin for 12 h. The percentages of cells in sub-G1, G1, S or G2/M phases of cell cycle are indicated within each histogram. Results represent three independent experiments.

# Manipolazione genetica nelle cellule di mammifero

Transgenesi

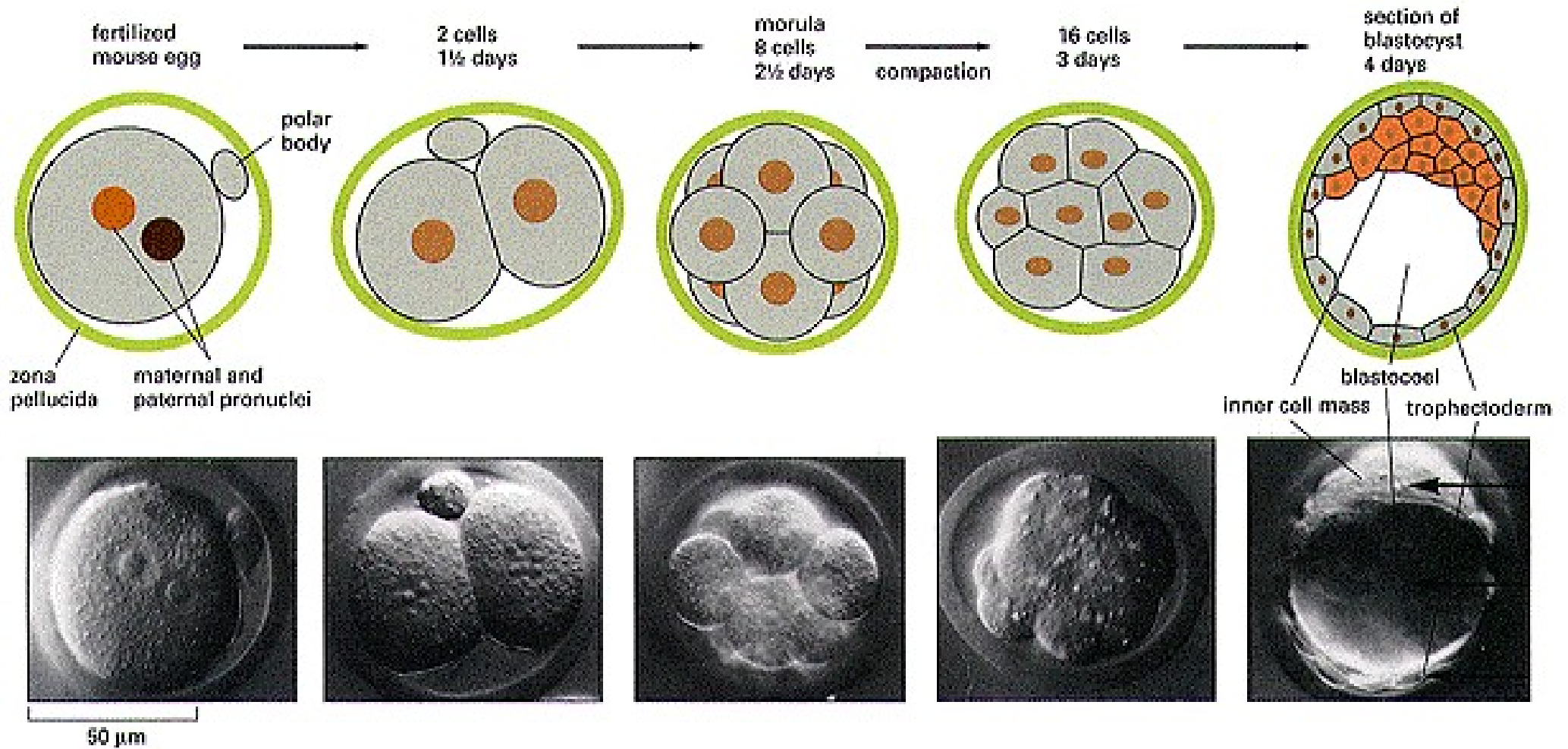
Silenziamento genico

Editing genomico

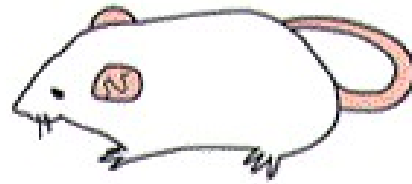
# Topo (*Mus musculus*)



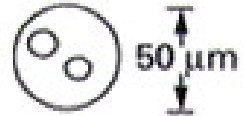
# Sviluppo dello zigote fino allo stadio di blastocisti



MOUSE



fertilized egg



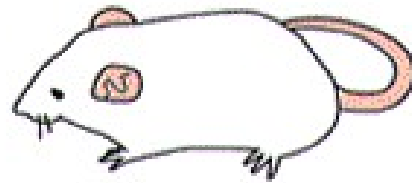
MICROINJECT GENE OF INTEREST AS LINEAR DNA INTO MALE PRONUCLEUS



embryo

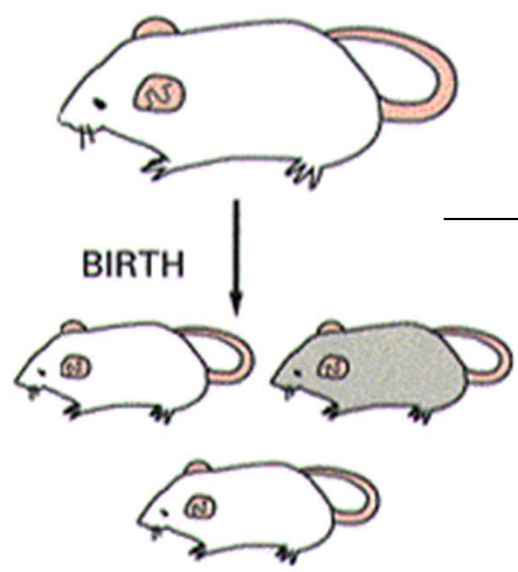


INTRODUCE SEVERAL SUCH EMBRYOS INTO PSEUDOPREGNANT MOUSE

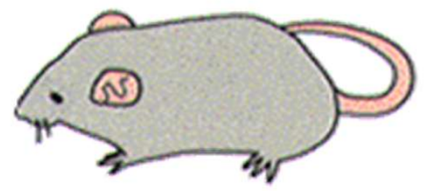


# Topi transgenici

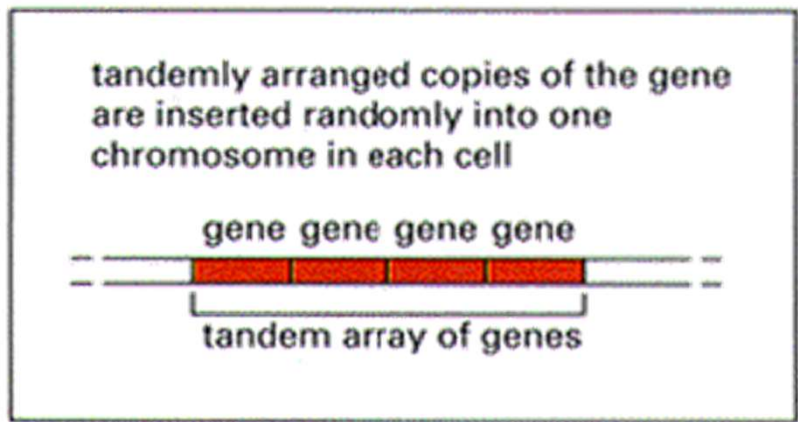
per microiniezione dell'uovo fecondato



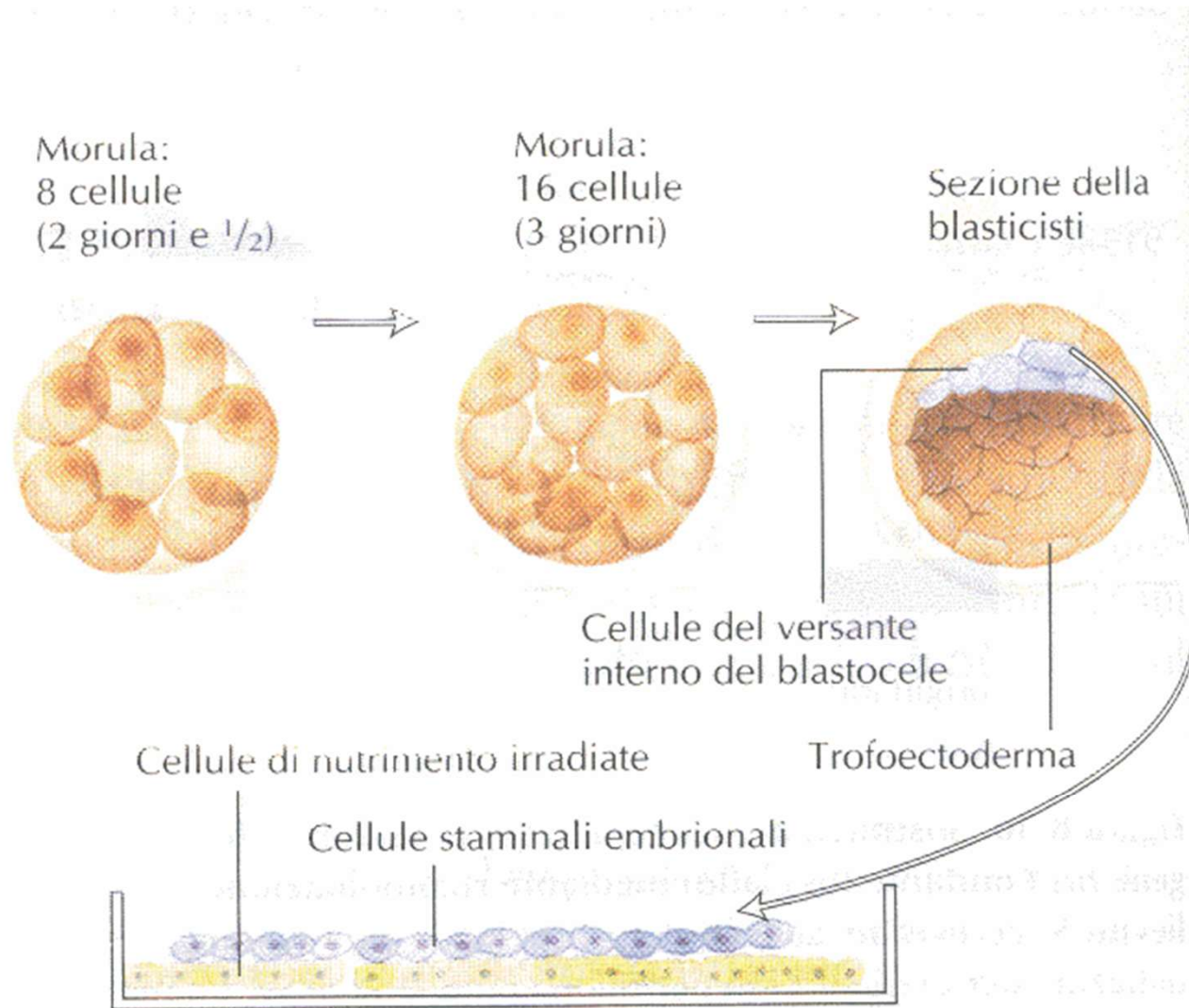
SOMATIC CELLS OF OFFSPRING  
TESTED FOR PRESENCE OF GENE  
AFTER BIOPSY, AND SELECTED  
MOUSE BRED TO TEST FOR GENE  
IN GERM CELLS



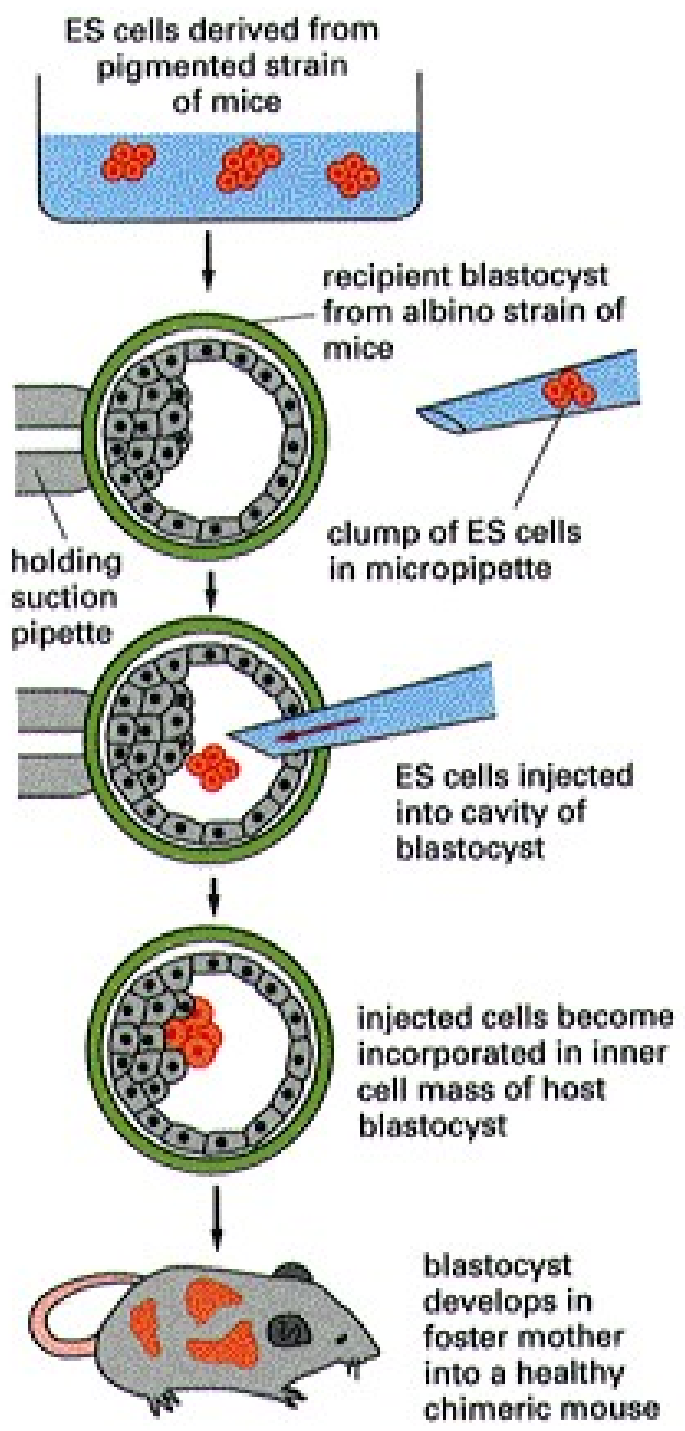
**TRANSGENIC MOUSE**



# Preparazione di cellule staminali embrionali (ES)



Le cellule uovo fecondate di topo all'inizio si dividono lentamente. Dopo quattro giorni e mezzo, formano la blastocisti, una struttura cava costituita da circa 100 cellule che circondano una cavità interna chiamata *blastocele*. Soltanto le cellule ES, che costituiscono la massa cellulare interna, formano effettivamente l'embrione. Altre cellule formano il trofoectoderma, che dà luogo alle membrane (amnion e placenta), mediante le quali l'embrione si attacca alla parete uterina. Le cellule staminali embrionali possono essere rimosse dalla blastocisti e fatte crescere su cellule di nutrimento (*feeder cells*) trattate con una dose letale di radiazioni. [Vedi E. Robertson et al. (1986), *Nature* **323**: 445].



Lezione 13 marzo 2023

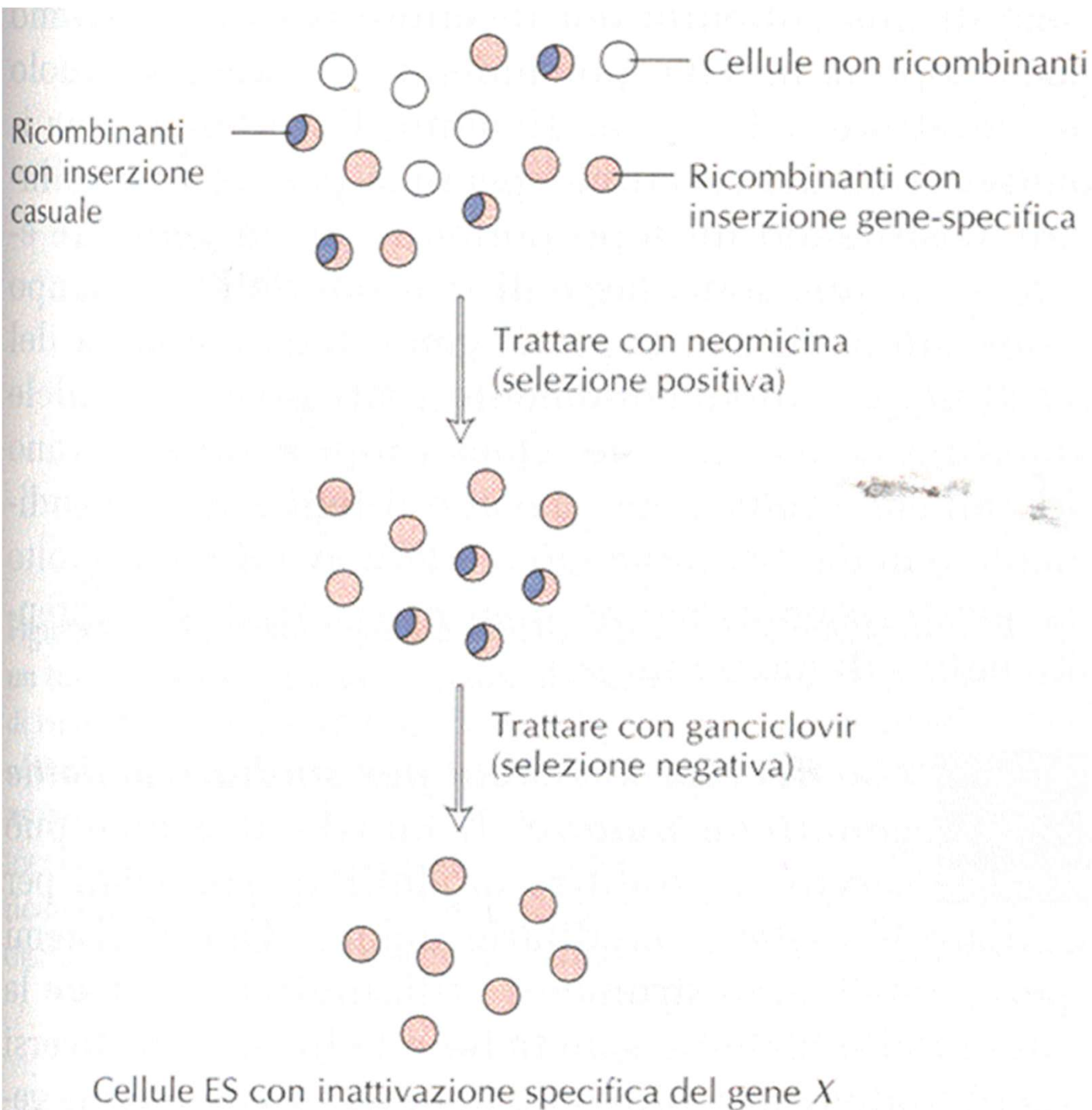
Token 542539

Il primo topo knockout fu creato da Mario Capecchi, Martin Evans ed Oliver Smithies alla fine degli anni ottanta, ed è valso loro il Premio Nobel per la medicina l'8 ottobre 2007.

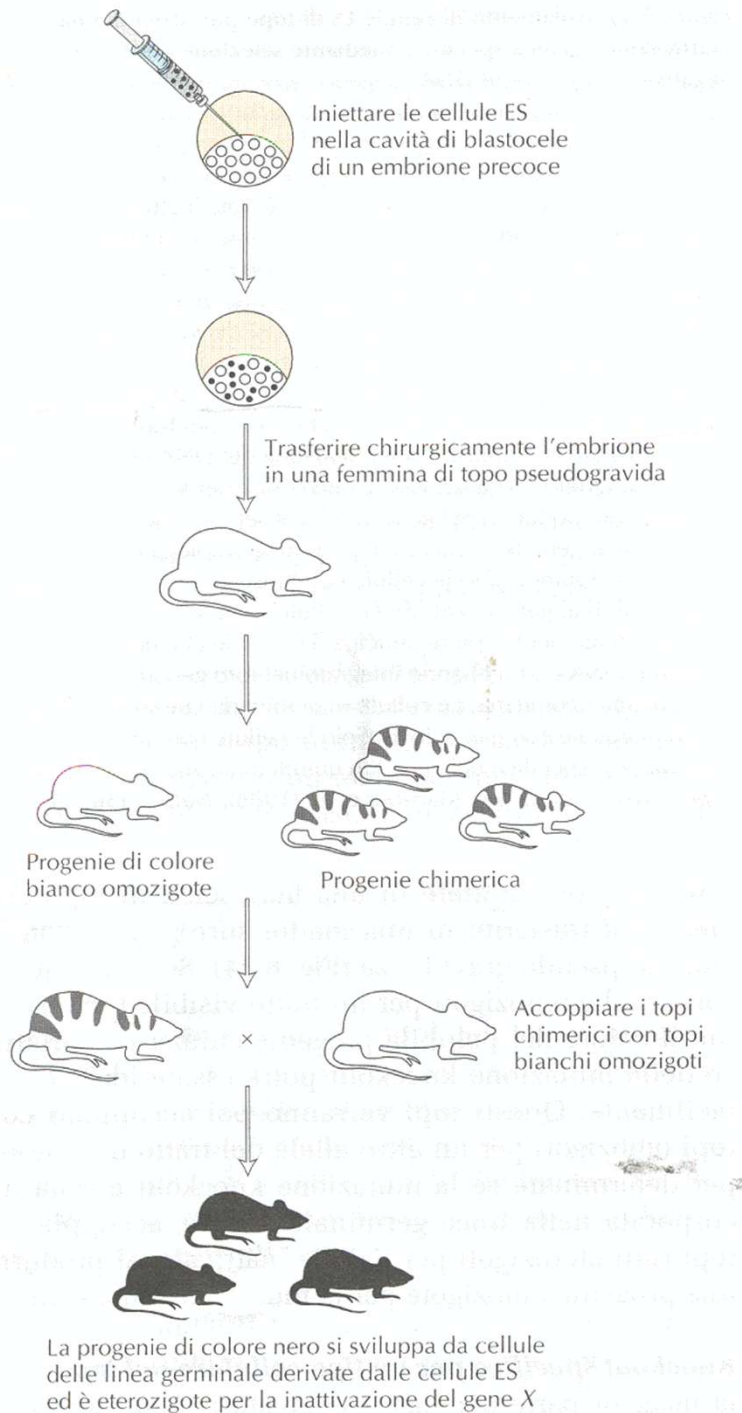


Courtesy of Dr. M. Capecchi, Eccles Institute of Human Genetics.  
Noncommercial, educational use only.





**Selezione  
positiva e  
negativa delle  
cellule ES  
ricombinanti  
portatrici di  
una mutazione  
knock-out**



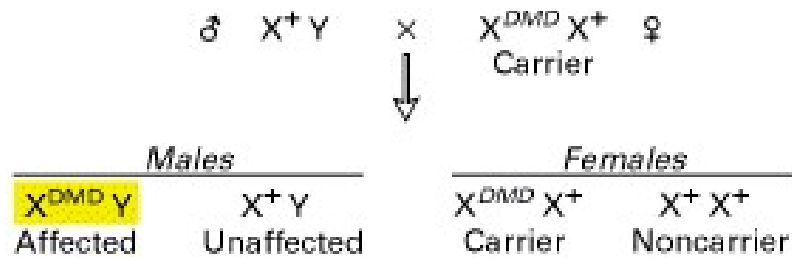
## Inoculo in blastocisti di cellule staminali embrionali knock-out e trasferimento degli embrioni in madri pseudogravide

Le cellule staminali embrionali (ES) eterozigoti per una mutazione knockout in un gene di interesse (X) e omozigoti per un gene marker (in questo caso il colore nero del mantello) vengono trapiantate nel blastocite di un embrione di quattro-cinque giorni, omozigote per un marcatore alternativo (in questo caso il colore bianco del mantello). Gli embrioni a uno stadio precoce vengono quindi impiantati in una femmina pseudogravida. Alcuni dei discendenti sono chimere, indicate dal mantello bianco e nero. I topi chimerici vengono quindi incrociati con topi omozigoti per il colore bianco del mantello; i figli di questo incrocio che avranno mantello nero possederanno nella loro linea germinale cellule derivate dalle ES. Isolando il DNA da una piccola quantità di tessuto della coda, è possibile identificare i topi neri eterozigoti per l'allele knockout. Incrociando tra loro questi topi neri si ottengono individui omozigoti per l'allele inattivato, cioè topi knockout. [Adattato da M.R. Capecchi (1989), *Trends Genet.* 5: 70.]

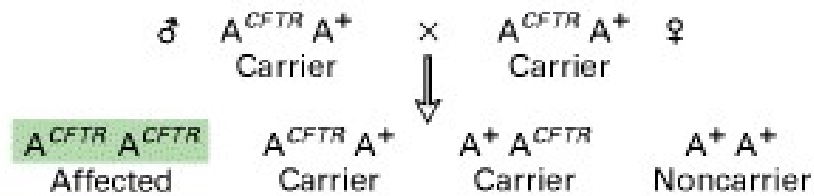
To date, about 11,000 genes have been knocked out in mice, which accounts for roughly half of the mouse genome (Vogel, 2007; Sikorski and Peters, 1997). Through a combination of gene targeting and gene trapping, a global effort is underway to make a knockout mouse for all of the 25,000 mouse genes (Grimm, 2006).

Malattie genetiche umane di cui esistono modelli murini knockout

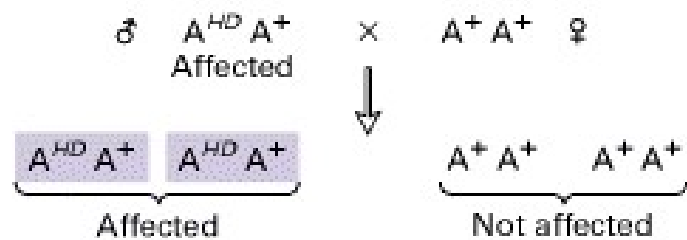
(a) Duchenne muscular dystrophy



(b) Cystic fibrosis



(c) Huntington's disease



# Topi Knock-out condizionali

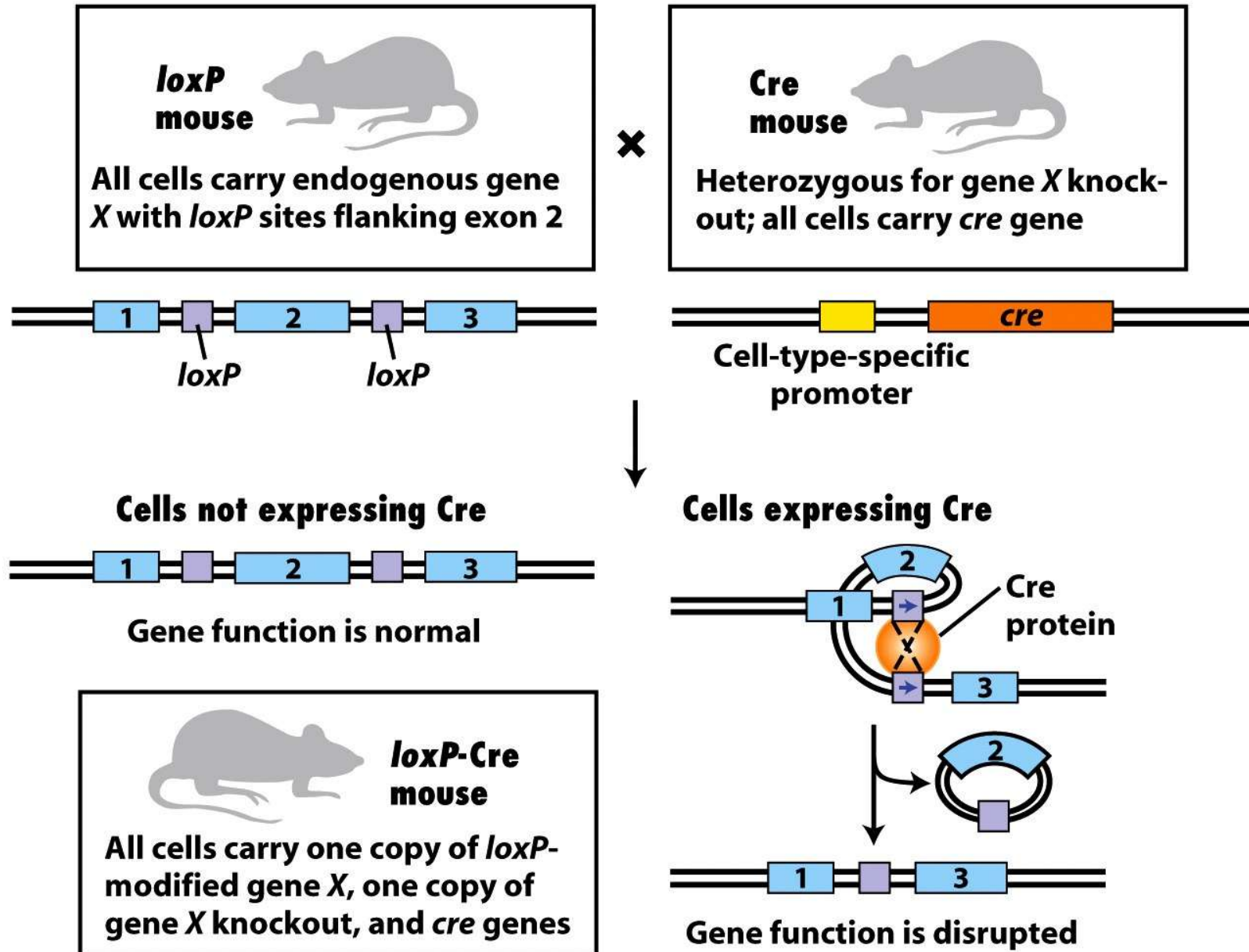


Figure 5-42  
Molecular Cell Biology, Sixth Edition  
© 2008 W. H. Freeman and Company

# MUTANTI CONDIZIONALI PER LO STUDIO DEL TUMORE MAMMARIO

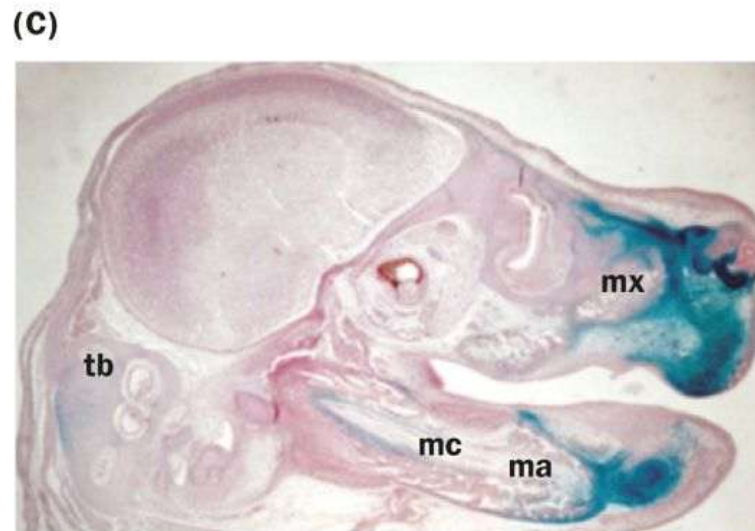
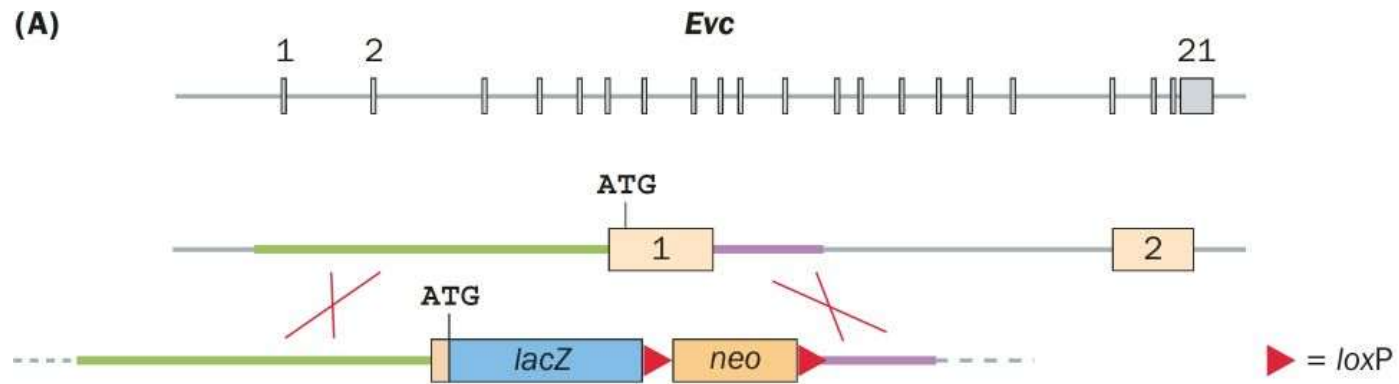
Nel 50% dei casi di tumore mammario familiare sono state riscontrate mutazioni del gene Brca1.

La mancanza di Brca1 causa una precoce mortalità embrionale

Mutante condizionale in cui si determina la rimozione dell'esone11 di Brca1 solo nelle cellule epiteliali del tessuto mammario

## Topo Knock/in:

l' esempio della patologia umana da deficit  
dell'alfa1-antitripsina



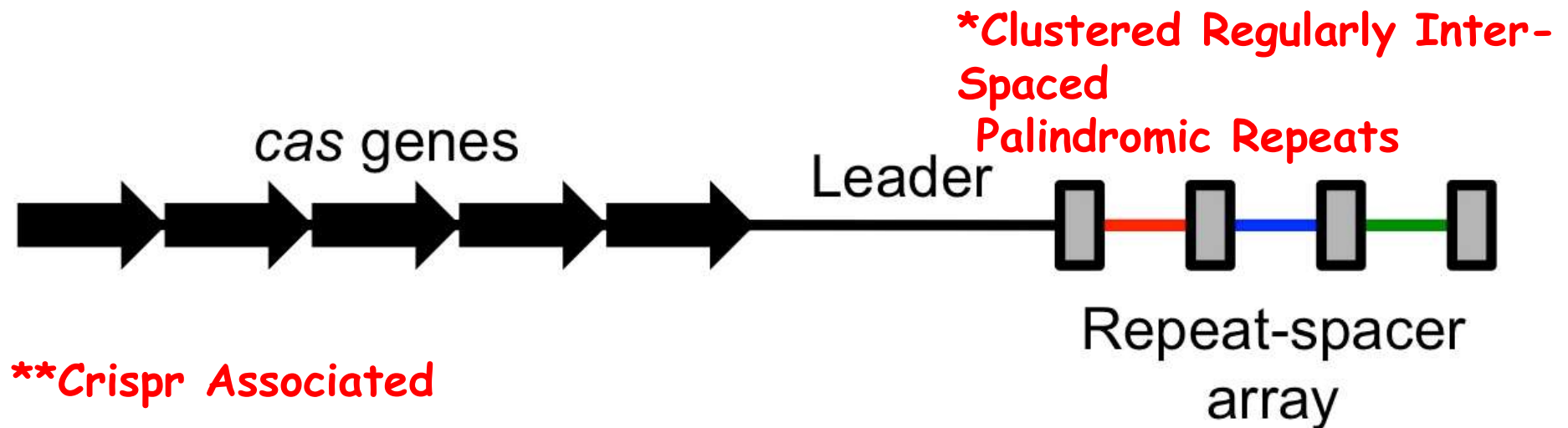
Knock/in del transgene reporter lacZ per inattivare un gene X e monitorarne contemporaneamente la sua normale espressione

**Sono centinaia i modelli animali di malattie umane a carattere monogenico attualmente disponibili**

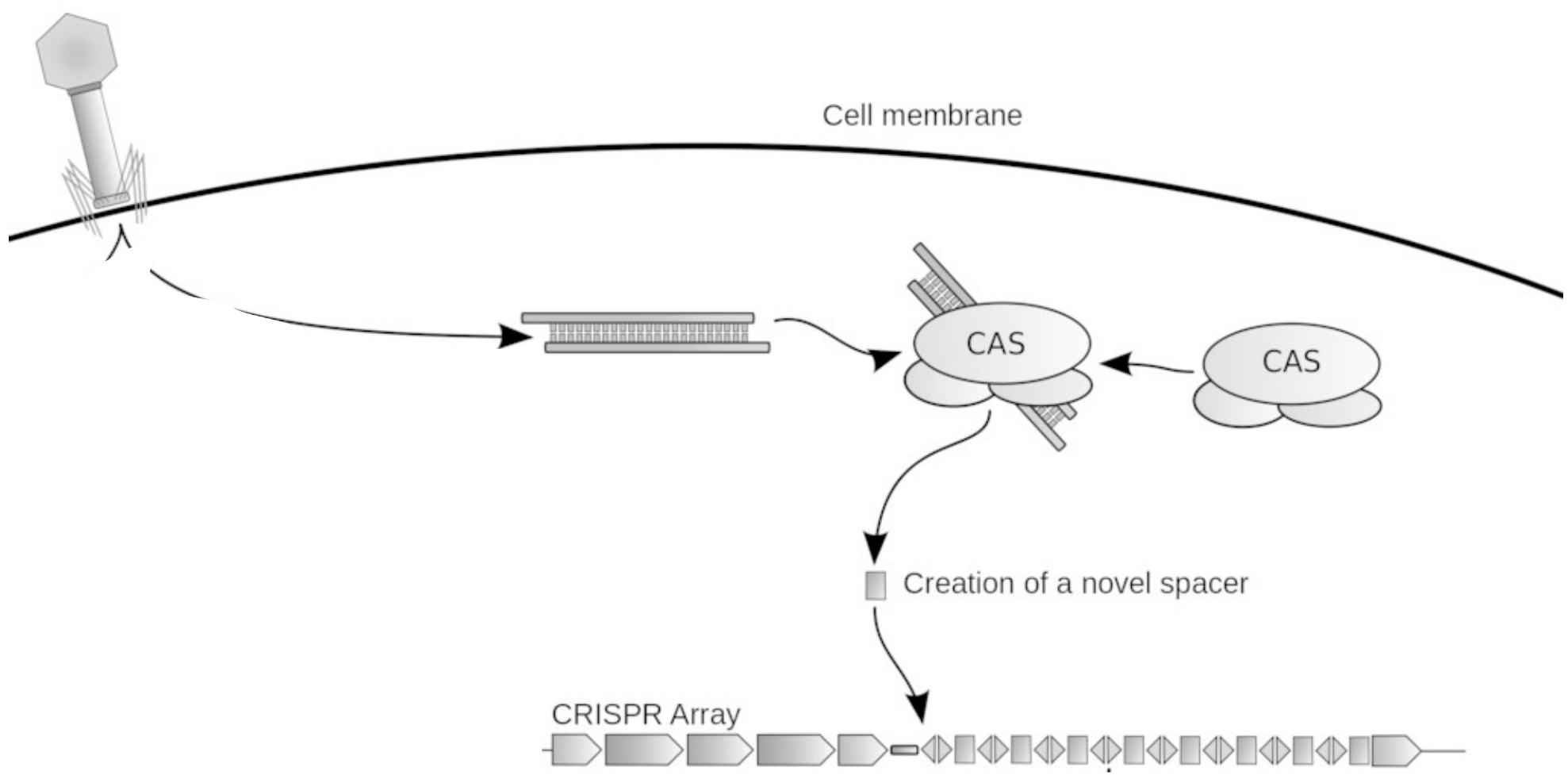
Malattie metaboliche e ormonali	Fibrosi cistica Ipercolesterolemia familiare Arteriosclerosi	K K,T K	<i>Cftr</i> <i>Ldlr</i> <i>Fmr1</i>
Malattie immunologiche ed ematologiche	Emofilia A Talessemia $\alpha$ Talessemia $\beta$	K K K	<i>C/8</i> <i>Hba</i> <i>Hbb</i>
Malattie della vista e dell'udito	Retinite pigmentosa Degenerazioni della retina	T T	<i>Rho</i> <i>Prph2</i>
Disfunzioni della cresta neurale	Albinismo oculocutaneo Sindrome di Waardenburg	T K	<i>Tyr</i> <i>Mitf<sup>mi</sup></i>
Malattie neurologiche e neuromuscolari	Morbo di Alzheimer Ataxia telangiectasia Sindrome X fragile	K,T K K	<i>App</i> <i>Atm</i> <i>Fmr1</i>
Sindromi familiari di predisposizione al tumore	Retinoblastoma familiare Poliposi adenomatosa del colon Sindrome di Li-fraumeni Sindrome di Gorlin	K K K K	<i>Rb</i> <i>Apc</i> <i>p53</i> <i>Ptch</i>

# Genome Editing

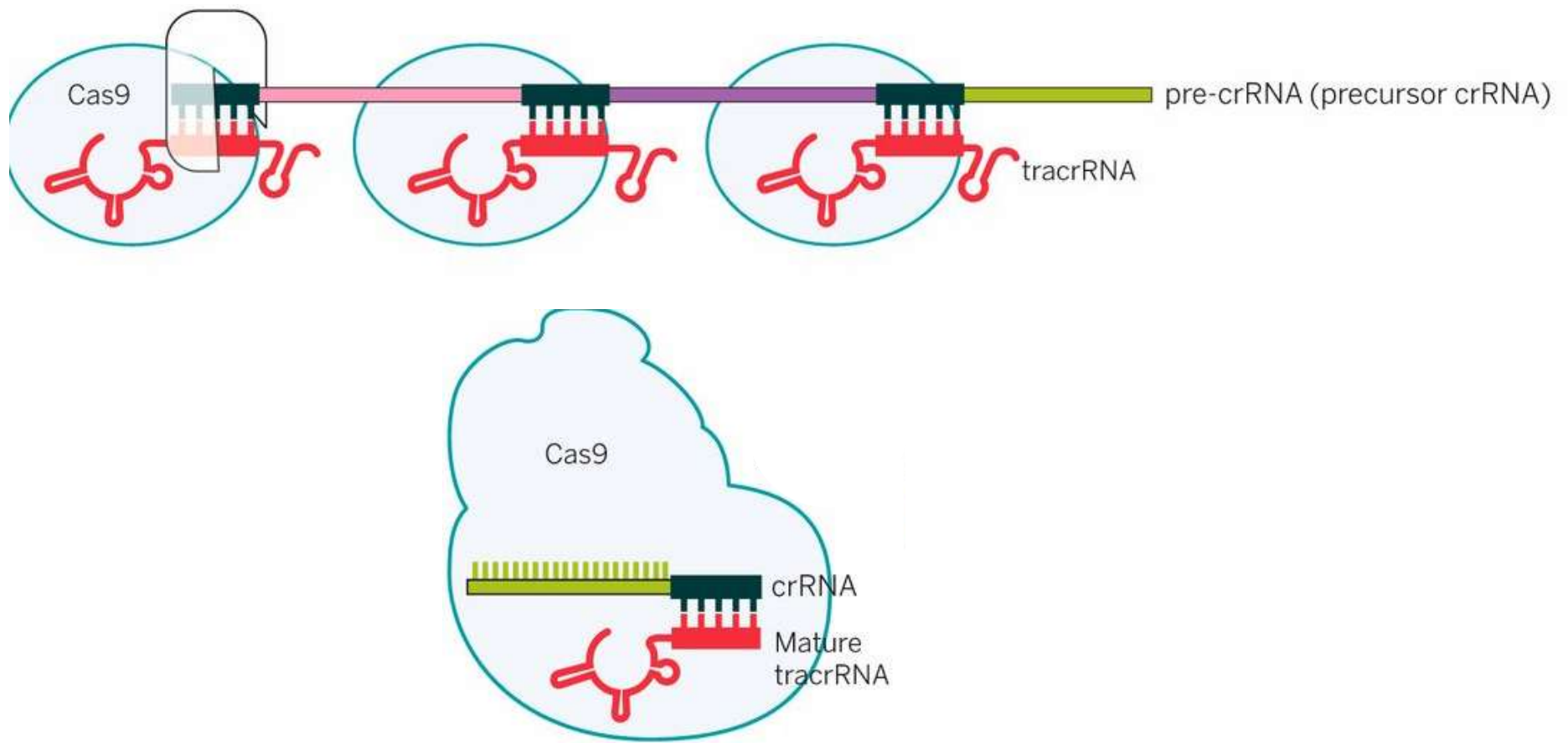
## Il sistema CRISPR\*-CA<sub>s</sub>9\*\*



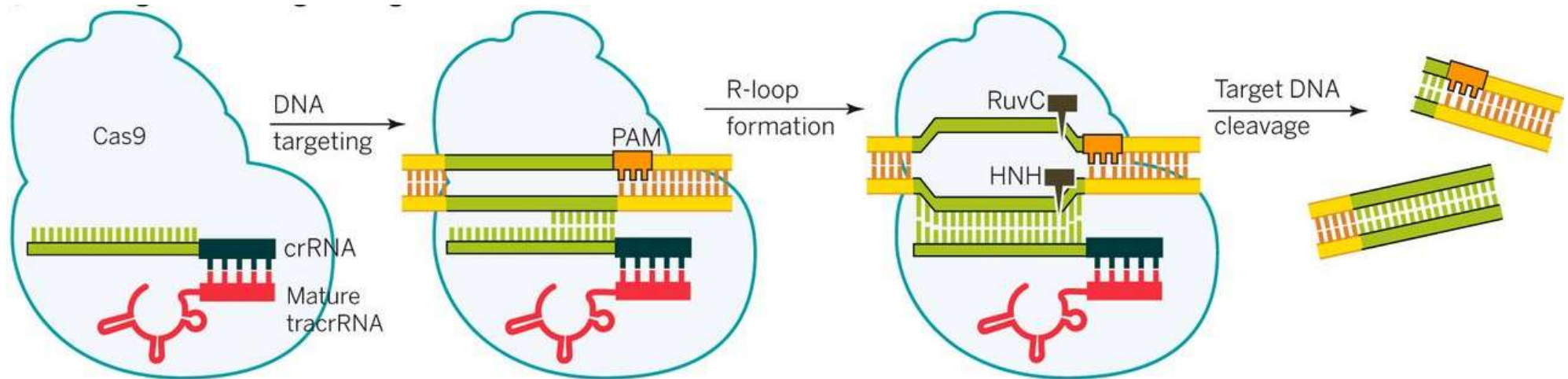
Sistema immunitario batterico scoperto come tale nel 2005 quando si notò che le sequenze spaziatrici hanno origine plasmidica o virale e che i geni associati a questa regione codificano per proteine con domini elicasi e nucleasici. Nel 2008 si è scoperto che RNAs derivati dalle CRISPR (crRNAs) complessati con proteine Cas interferivano con la proliferazione di virus infettanti E. Coli



L'endonucleasi **CAS9** si lega al trascritto pre-crRNA.  
Per il legame di Cas9 e per il successivo processamento dei singoli crRNAs è necessaria una piccola molecola di RNA (il **trans-activating crRNA**) codificata da una sequenza a monte del locus Cas.

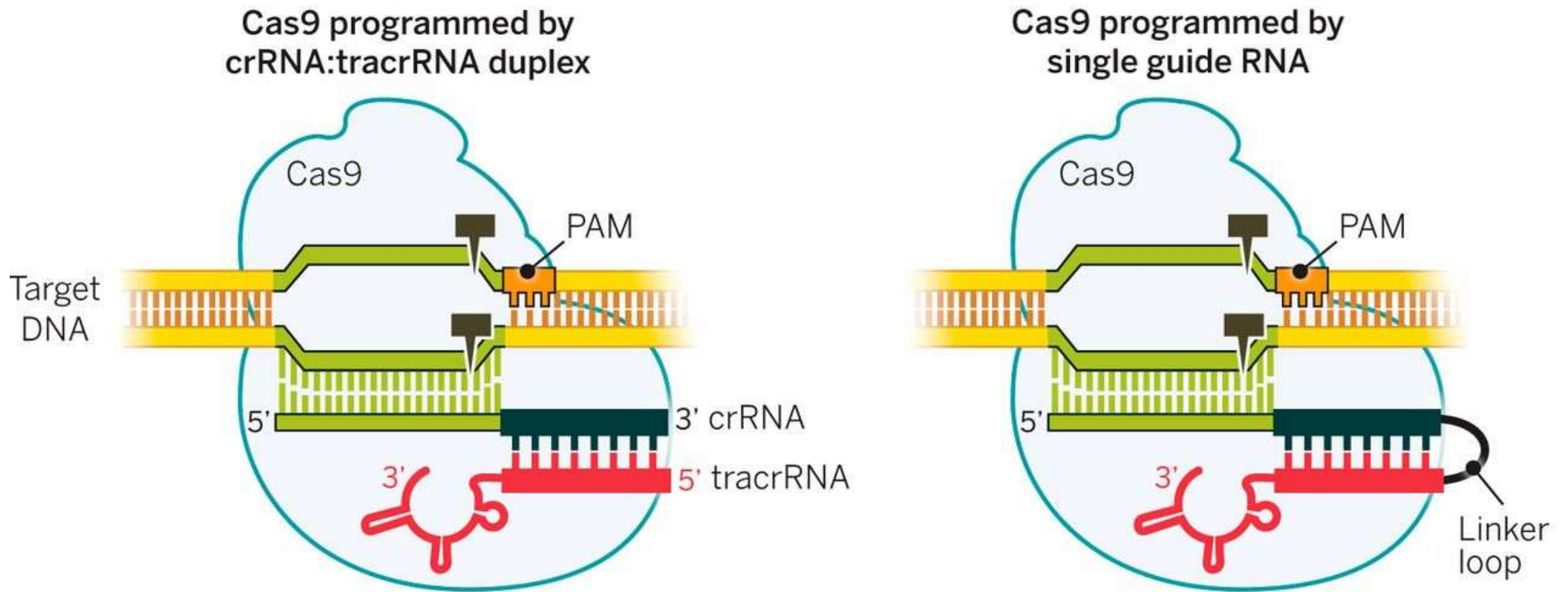


Il **complesso Cas9/tracrRNA/crRNA** raggiunge il DNA target che viene legato per complementarità con una sequenza del crRNA lunga 20 nt.

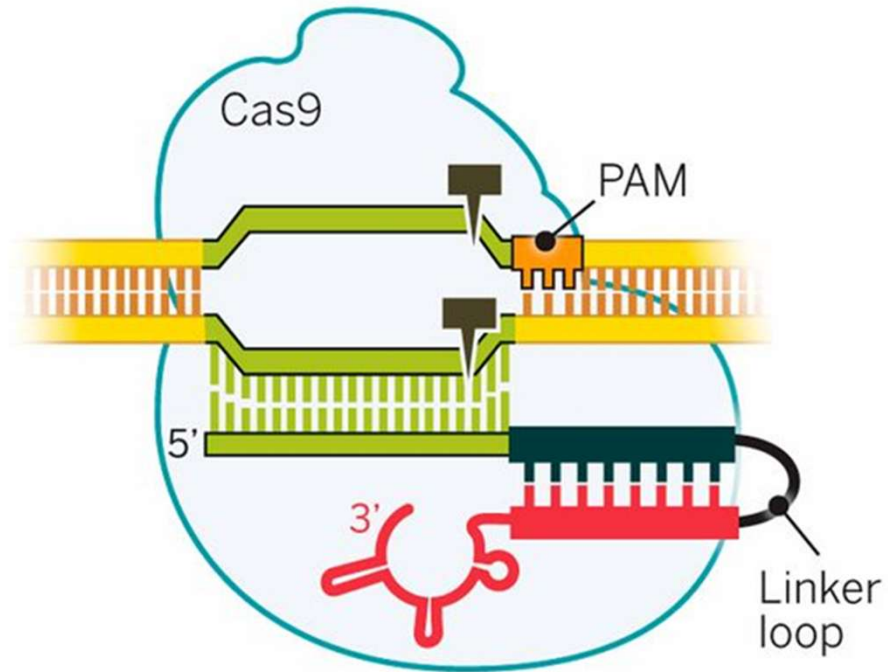


I due strand del DNA target vengono riconosciuti e tagliati da due diversi domini della Cas9 (HNH per lo strand complementare al crRNA e RuvC per lo strand opposto).

# Ingegnerizzazione del doppio trascritto tracrRNA/crRNA in un **singolo RNA** guida (sgRNA)



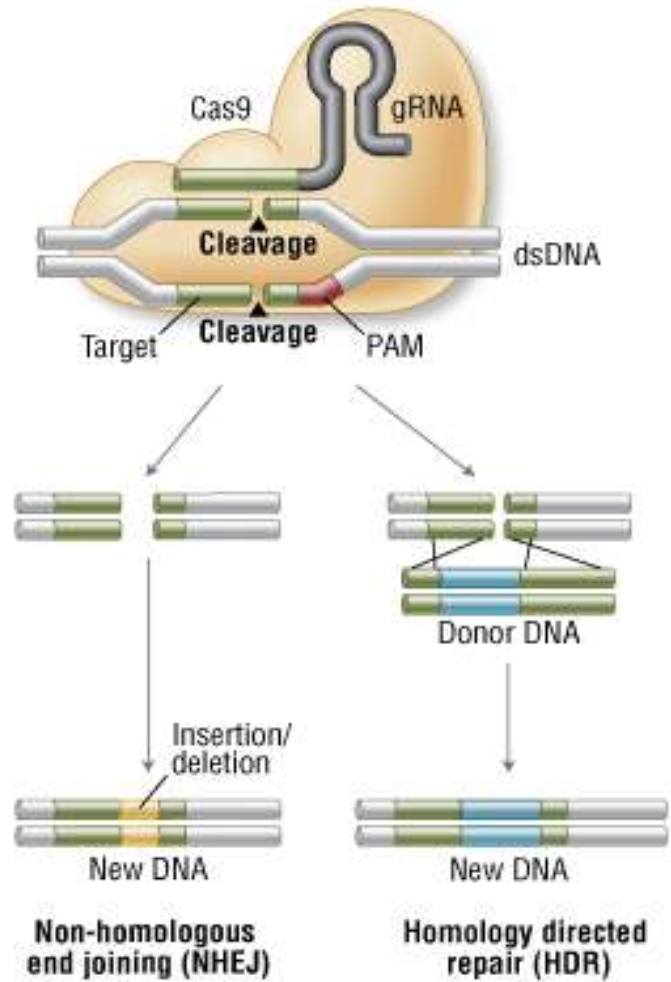
## Cas9 programmed by single guide RNA



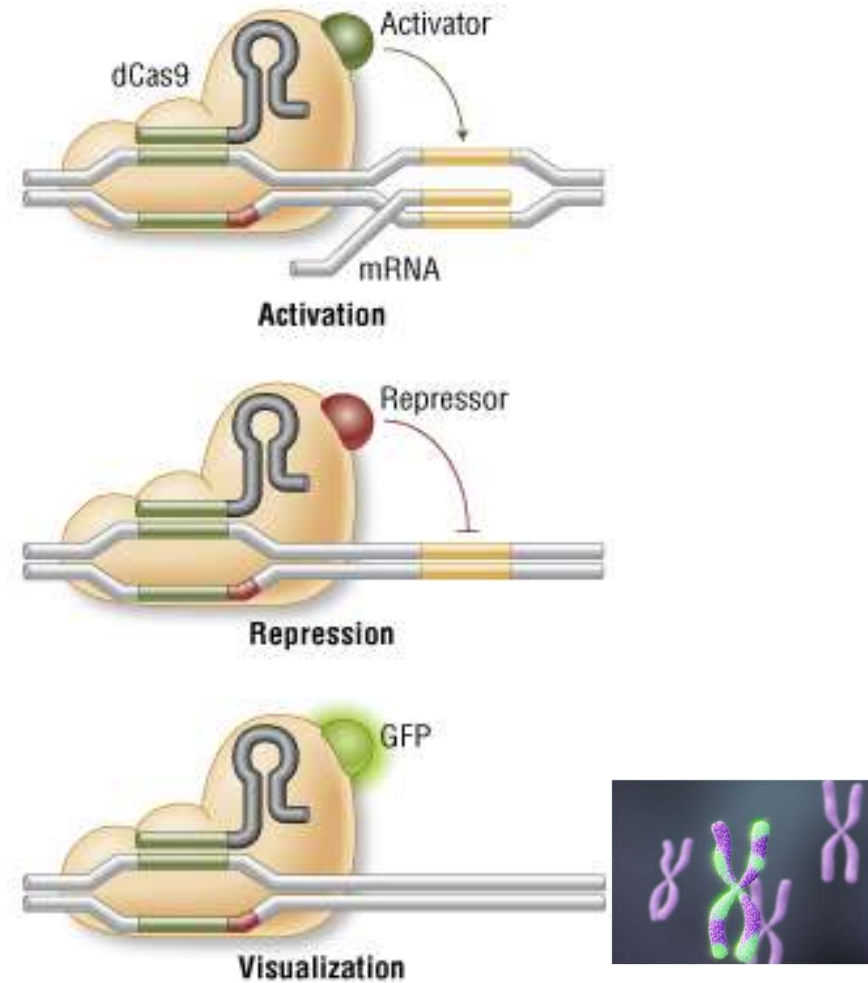
La semplice modifica della sequenza di 20 nt potrà targettare Cas9 su qualsiasi sequenza di DNA

Se si spinge la cellula a scegliere «**Homology Directed Repair (HDR)**» piuttosto che «Non-Homologous End-Joining (NHEJ)» e si fornisce un DNA template che può essere utilizzato per il riparo, il genome editing può produrre mutazioni specifiche, non solo K.O. ma anche gain of function.

### A. Genome Engineering With Cas9 Nuclease



### C. Localization With Defective Cas9 Nuclease



Individuare la sequenza che può rappresentare il segnale di riconoscimento del sgRNA e disegnare il costrutto

**Step 1:** Identify a PAM (NGG) sequence in the DNA sequence you would like to target.

```
GTT GGG GGG AGG GGT CGG CAA TTG AAC CGG TGC CTA GAG AAG GTG GCG CGG
CAA CCC CCC TCC CCA GCC GTT AAC TTG GCC ACG GAT CTC TTC CAC CGC GCC
```

PAM

**Step 2:** Determine the 5' start of the actual sgRNA targeting sequence by counting 20 nucleotides upstream of the PAM sequence.

```
GTT GGG GGG AGG GGT CGG CAA TTG AAC CGG TGC CTA GAG AAG GTG GCT CGG
CAA CCC CCC TCC CCA GCC GTT AAC TTG GCC ACG GAT CTC TTC CAC CGC GCC
```

↑

PAM



<https://it.video.search.yahoo.com/search/video?fr=mcafee&p=malat1+and+crispr+cas9&type=E211IT1277G0#id=1&vid=b4fbbfcc5c5149700e718446cc9bc90a&action=click>