

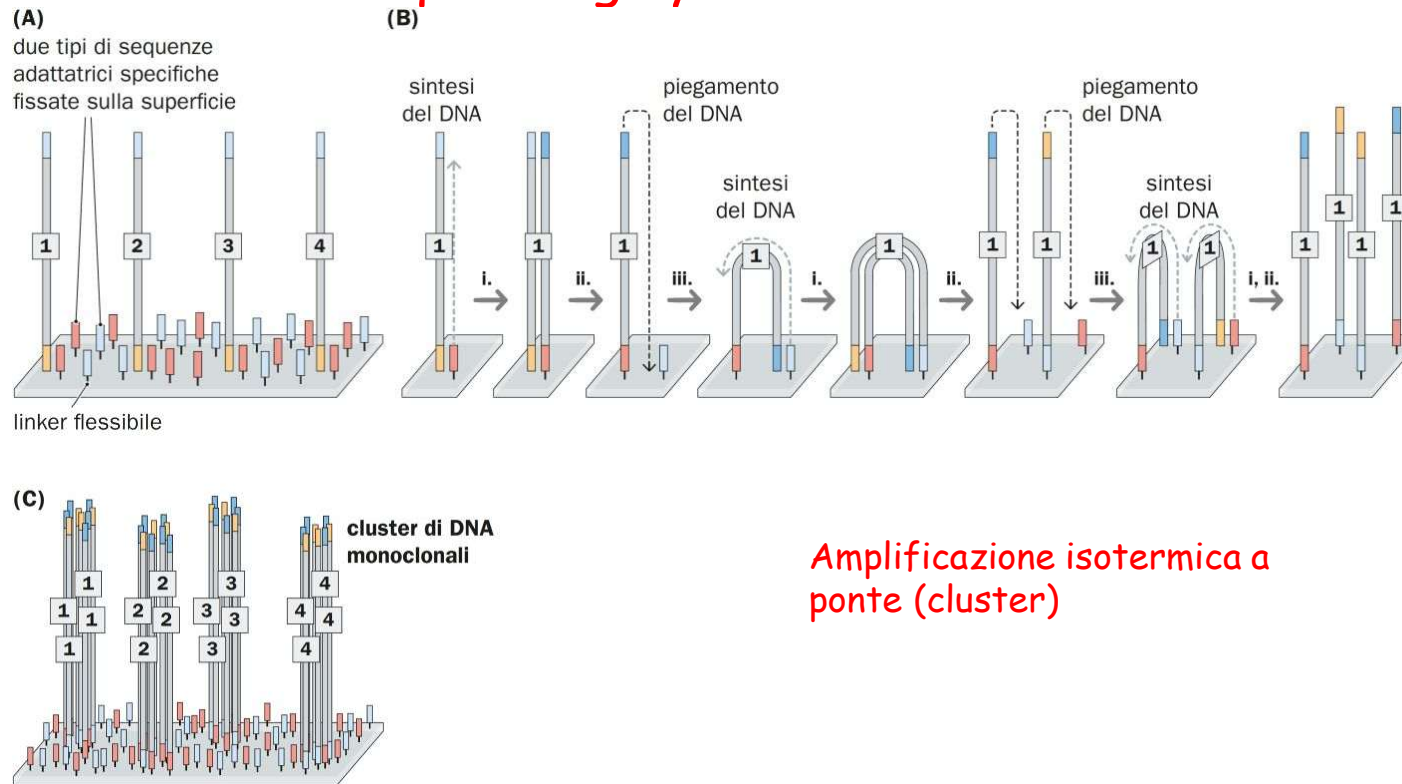
Next Generation Sequencing (NGS)

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)

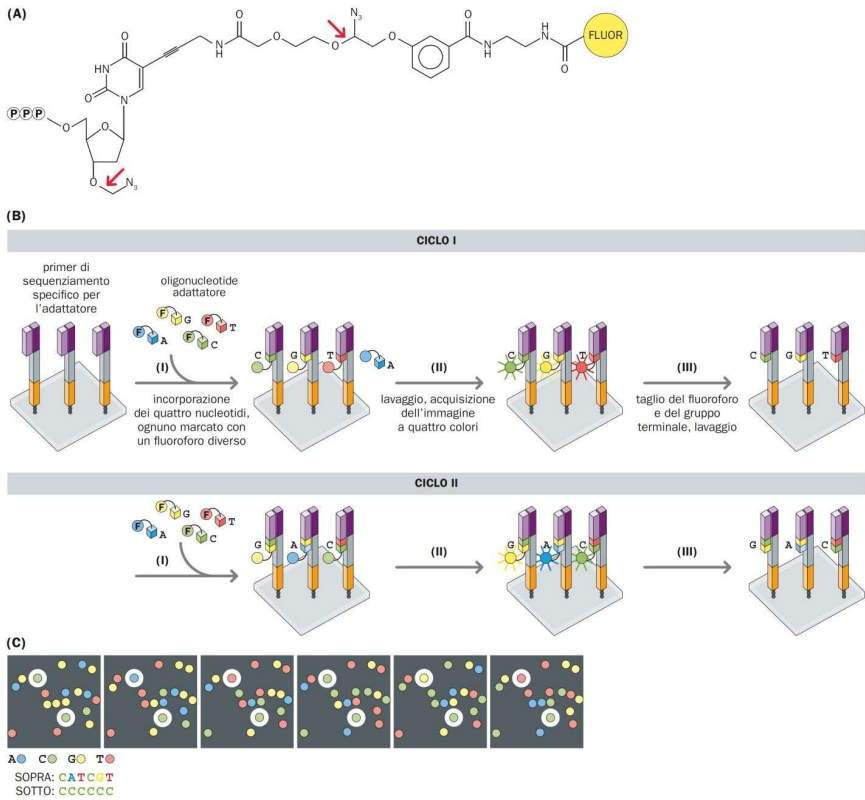
Next Generation Sequencing (NGS) Illumina sequencing system



Amplificazione isoterma a ponte (cluster)

Next Generation Sequencing (NGS)

Illumina sequencing system



Sequenziamento

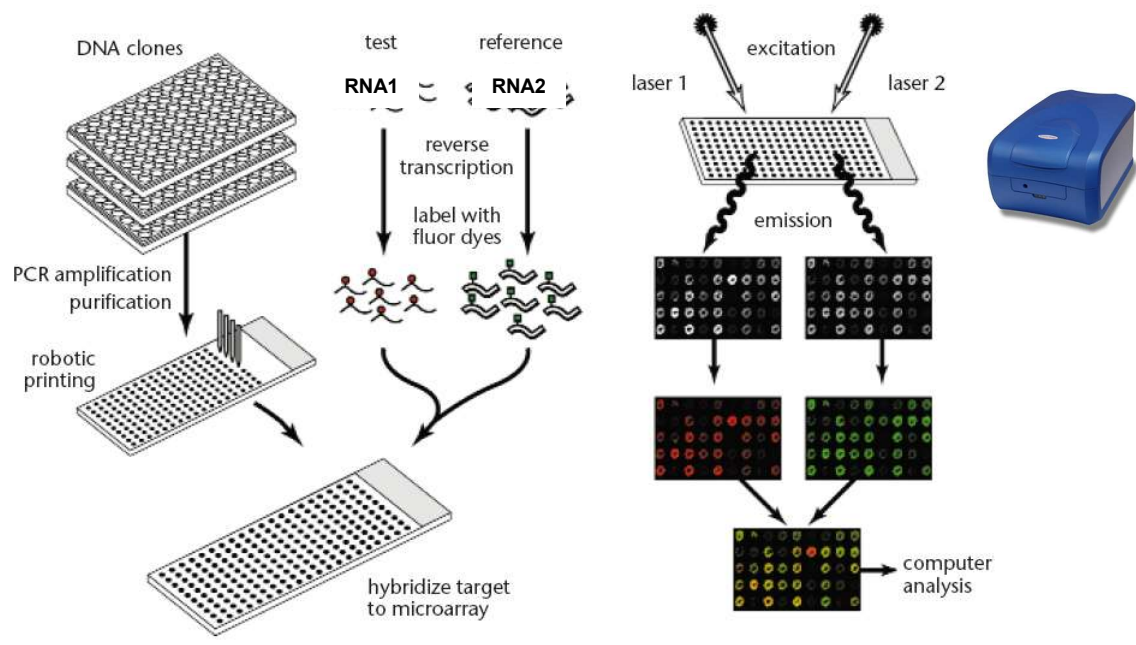
Next Generation Sequencing
(NGS)

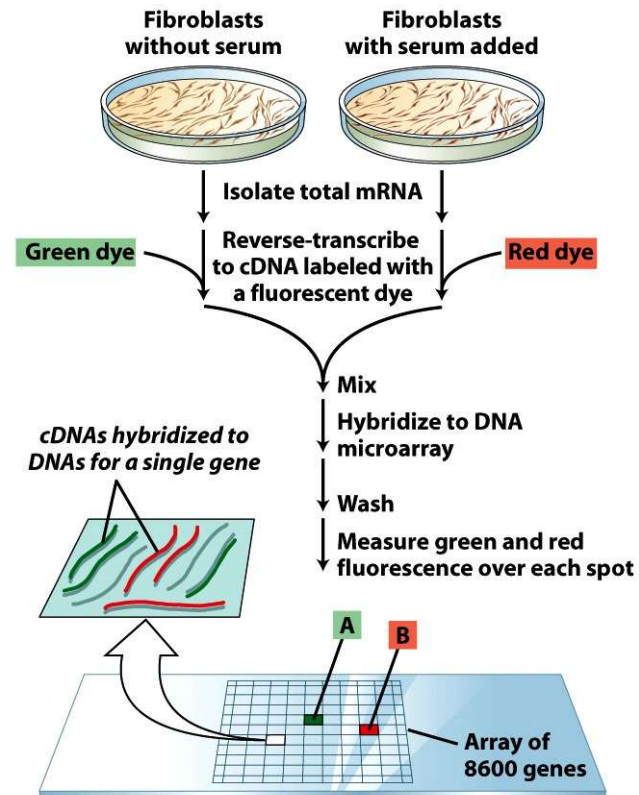
Illumina sequencing system

Studio dell'espressione genica

- Northern Blotting
- Reverse Transcriptase-PCR
- Western blotting
- MicroArray trascrizionale

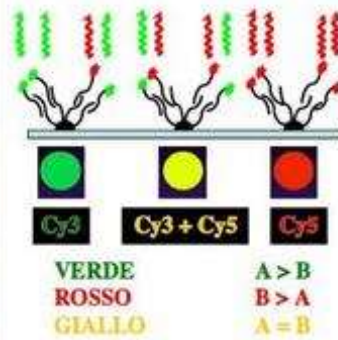
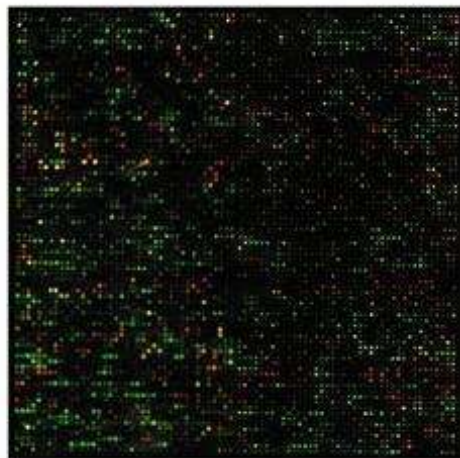
Microarray

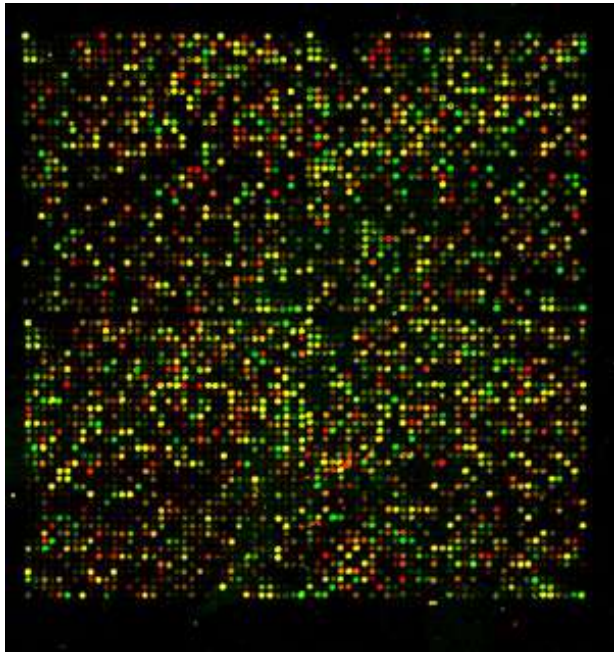




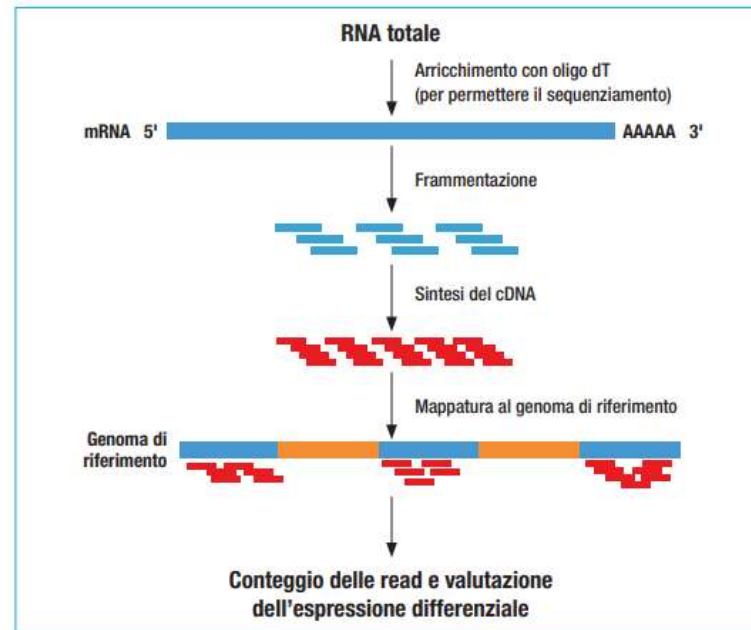
- A** If a spot is green, expression of that gene decreases in cells after serum addition
- B** If a spot is red, expression of that gene increases in cells after serum addition

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





RNAseq

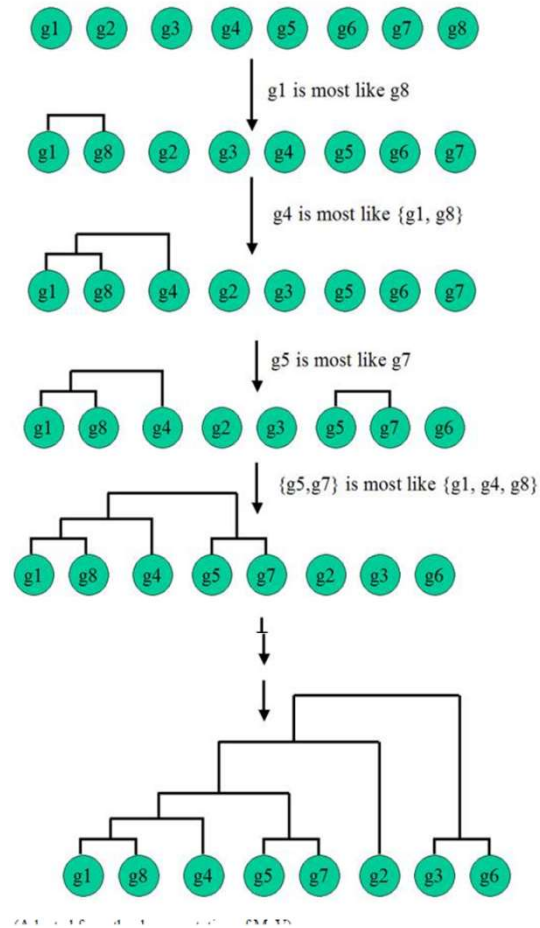


L'RNA-Seq è una tecnica per l'analisi del trascrittoma e la sua quantificazione basata sulle tecnologie di Next-Generation Sequencing. I sequenziatori forniscono una valutazione dell'espressione genica attraverso le **READS**, ovvero le sequenze che identificano l'ordine in cui si susseguono le basi 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

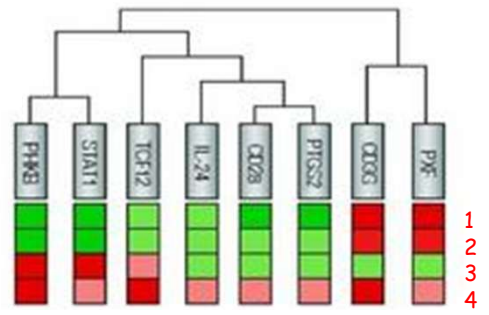
Hierarchical Clustering



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



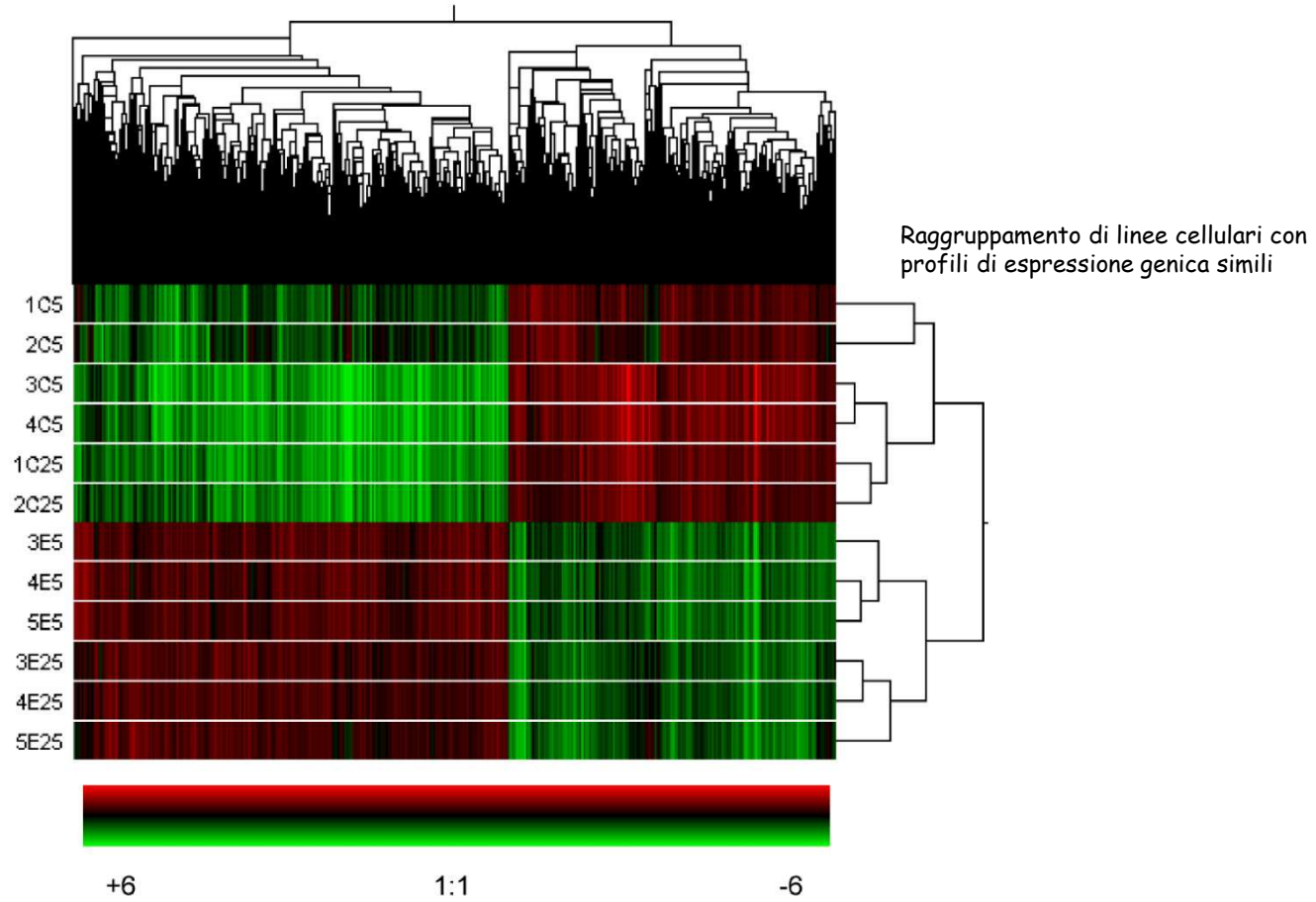
Raggruppamento di geni con profili di espressione simili (valutati in quattro diverse linee cellulari)



Linee cellulari

Clustering Analysis

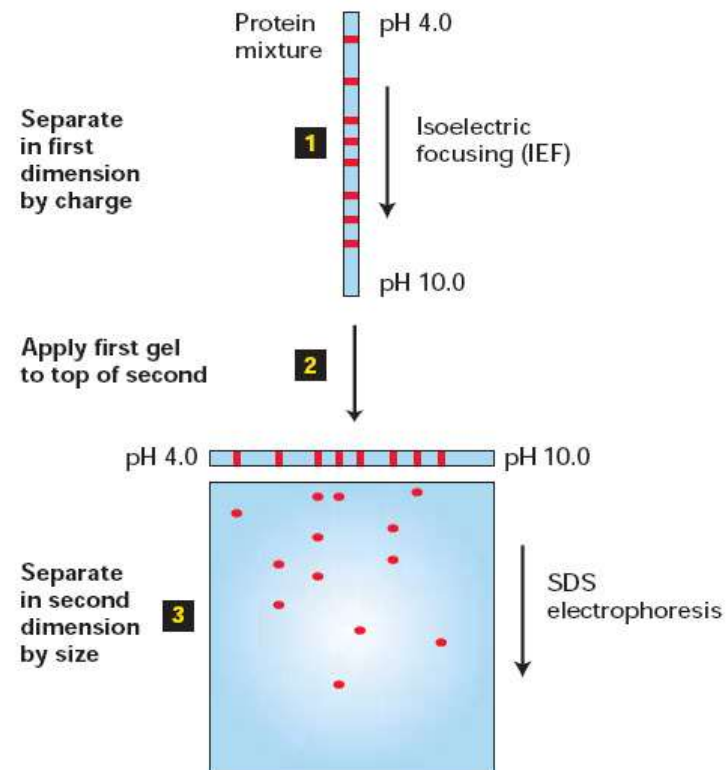
Raggruppamento di geni con livelli di espressione simili



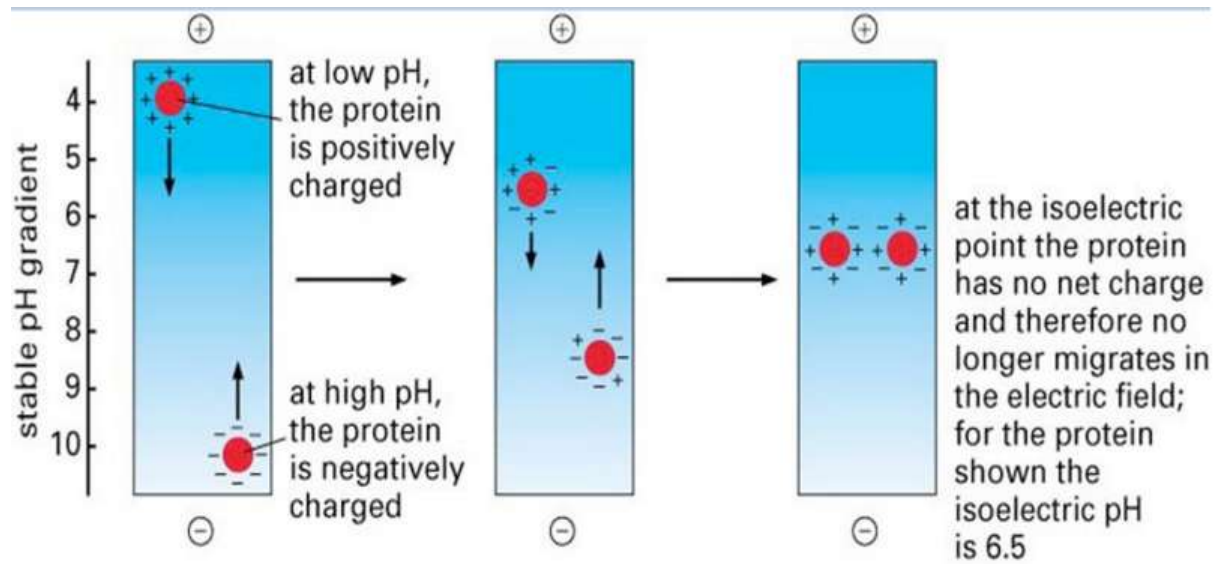
Proteomica
Elettroforesi bidimensionale-Spettrometria di massa

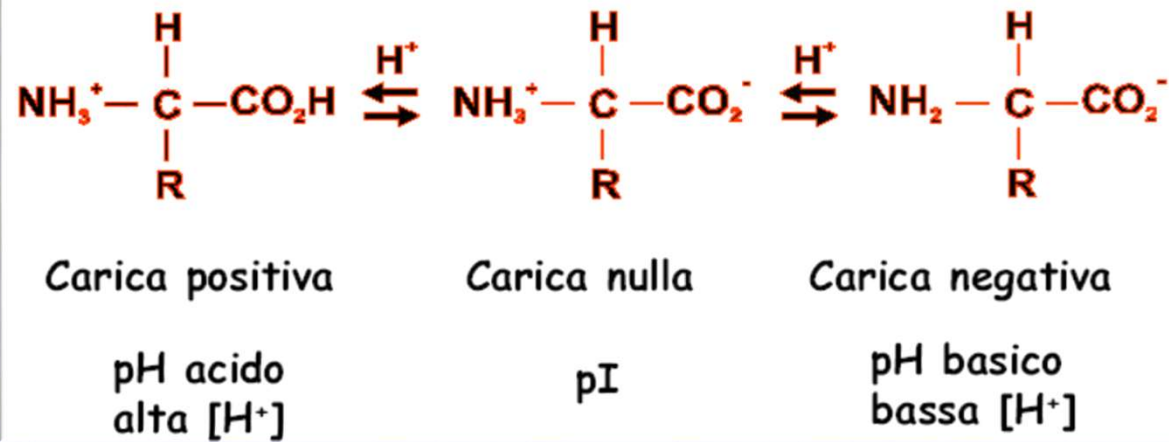
Elettroforesi Bidimensionale

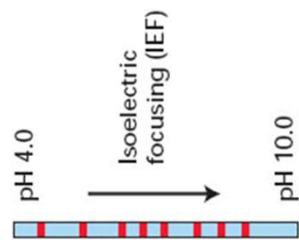
Le proteine sono separate per carica (gradiente di pH) e per grandezza.



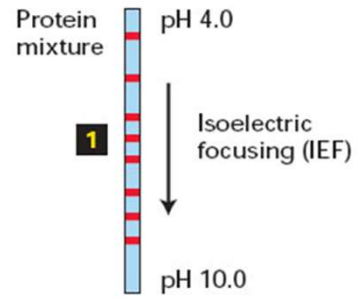
Isoeletrificazione



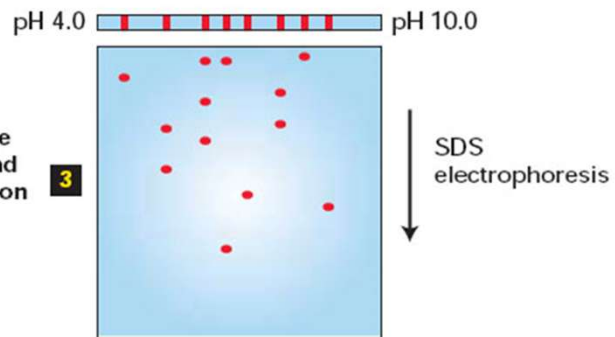




Separate
in first
dimension
by charge

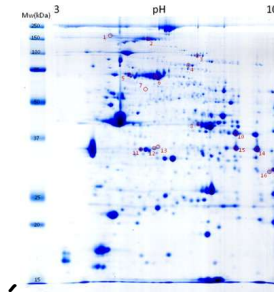


Separate
in second
dimension
by size

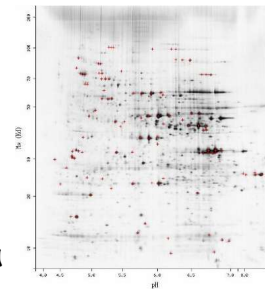


Colorazione del gel elettroforetico

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.

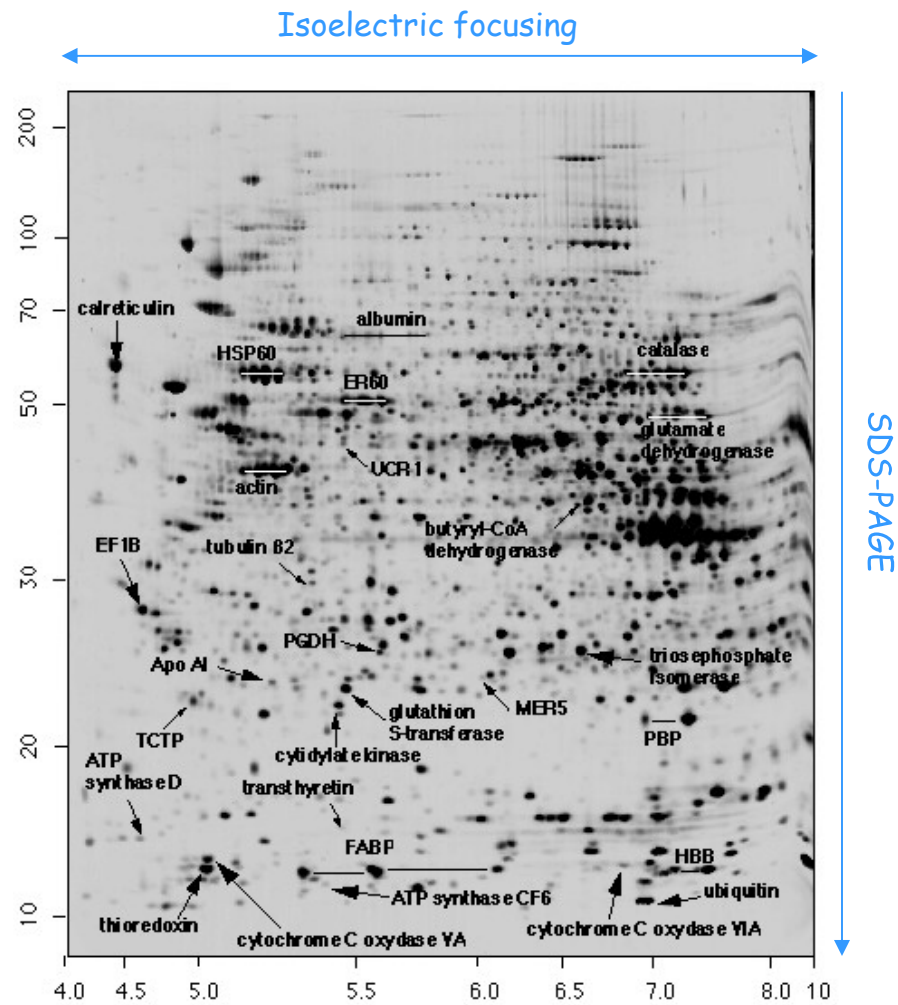


3. **Fluorescent staining SYPRO™** ha una sensibilità intermedia fra le due colorazioni precedenti. Richiede l'utilizzo di uno scanner per fluorescenza ed è compatibile con la spettrometria di massa.

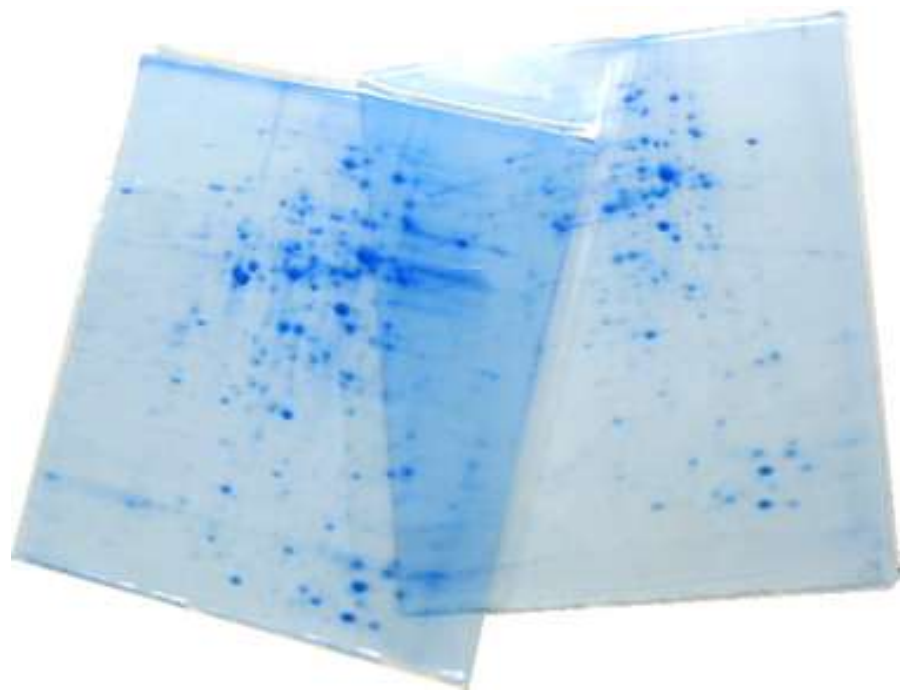
Ogni macchia corrisponde ad una proteina



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)

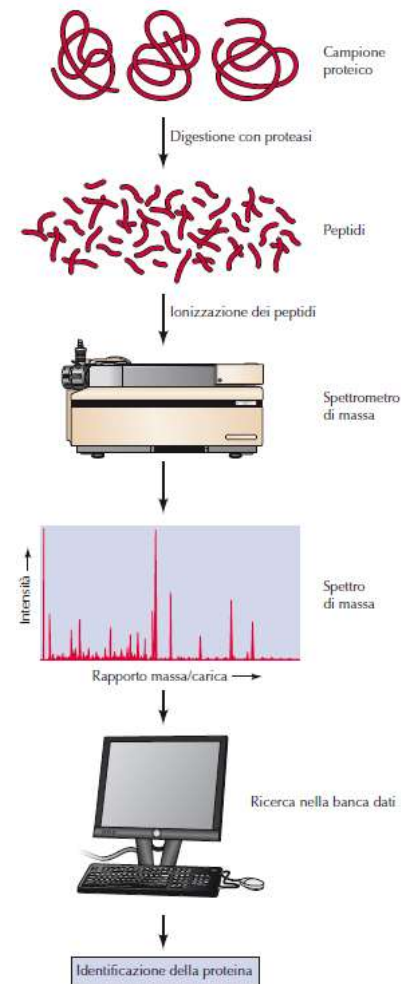
-Una macchia ritagliata dal gel è digerita da una proteasi in piccoli peptidi.

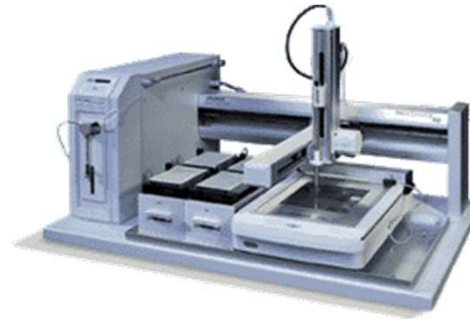
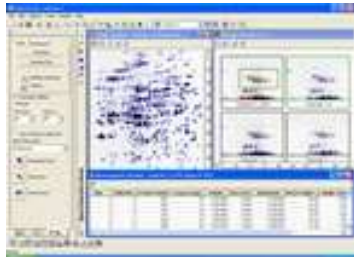
-I peptidi vengono sottoposti ad una alta carica che li ionizza e li rende volatili.

- 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.

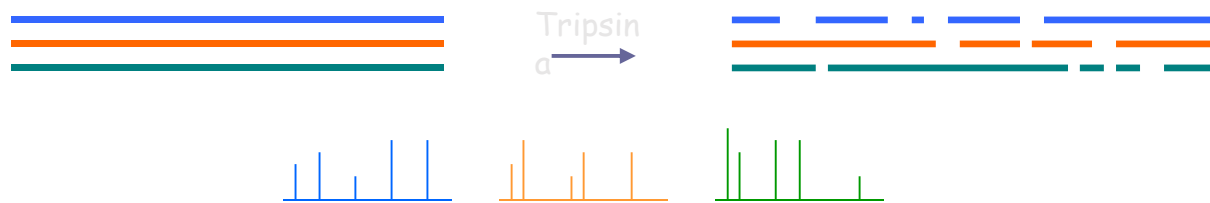
-Uno spettro di massa sarà confrontato con spettri teorici di un data base e la proteina potrà essere identificata.





Digestione proteolitica "in gel" della proteina

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



Peptide mass fingerprint

Proteolytic enzymes

Chymotrypsin

Trypsin

Lys-C protease

Arg-C protease

Cleavage specificity

Phe and Try

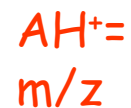
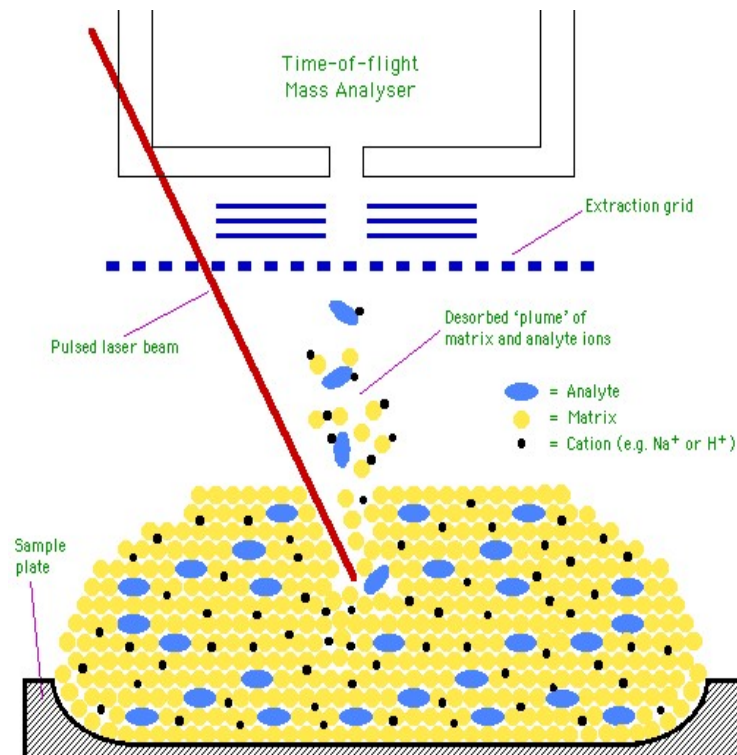
Arg and Lys

Lys

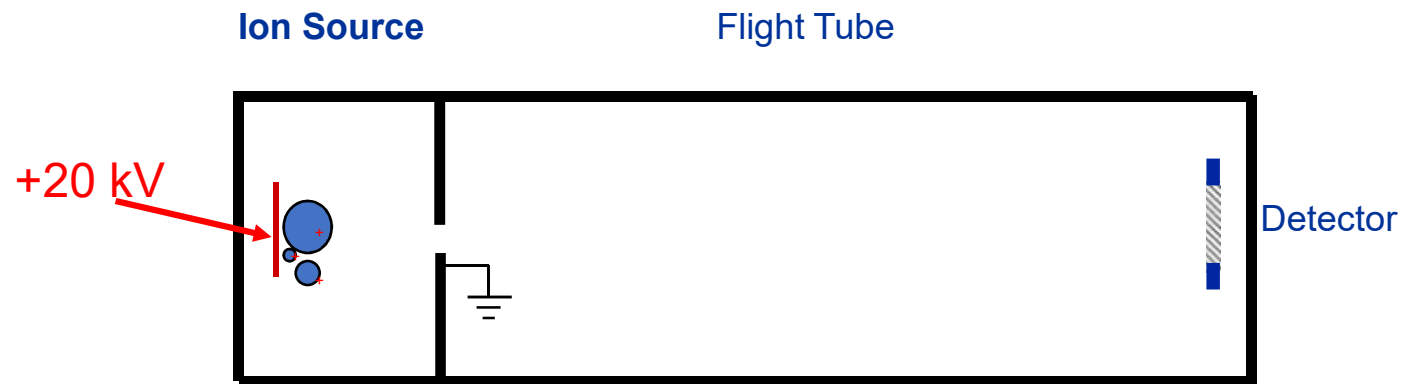
Arg

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.

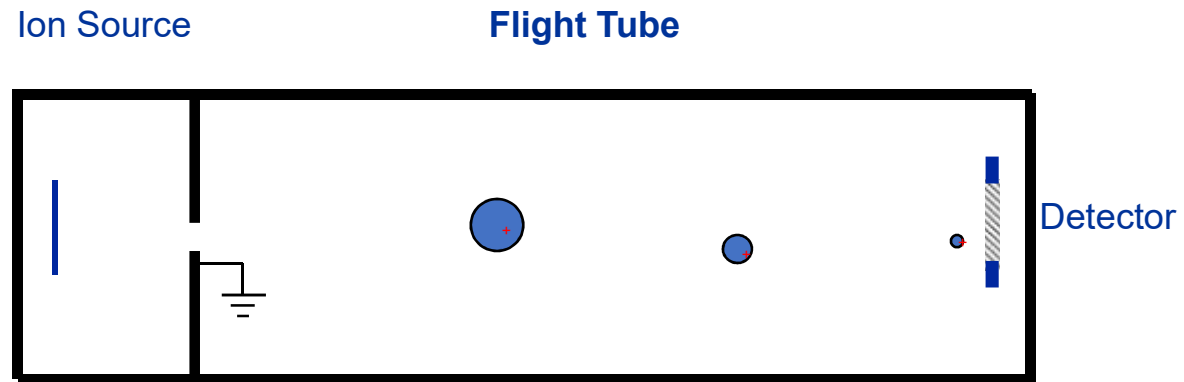
La proteina ionizzata viene accelerata da un campo elettrostatico (20.000V) e espulsa in un tubo di volo (TOF)



Time-of-Flight Mass Analyzer

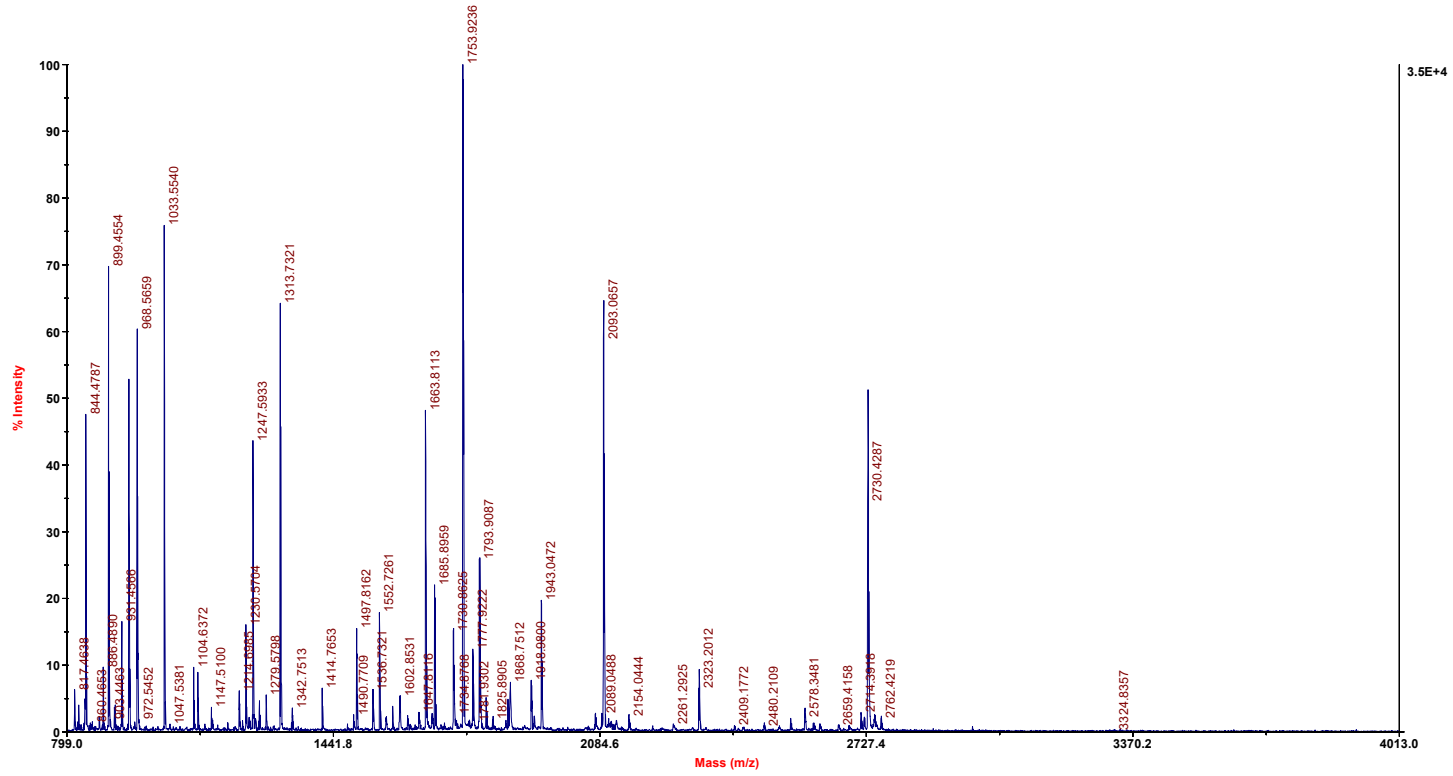


Time-of-Flight Mass Analyzer



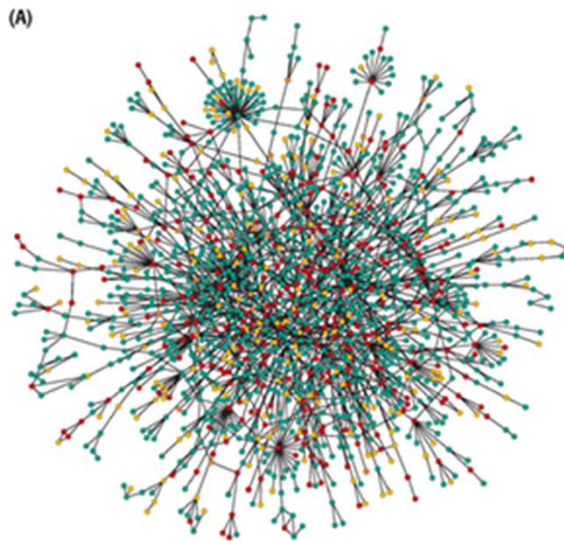
Il TOF e' un cronometro!

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.

Manipolazione genetica nelle cellule di mammifero

Transgenesi

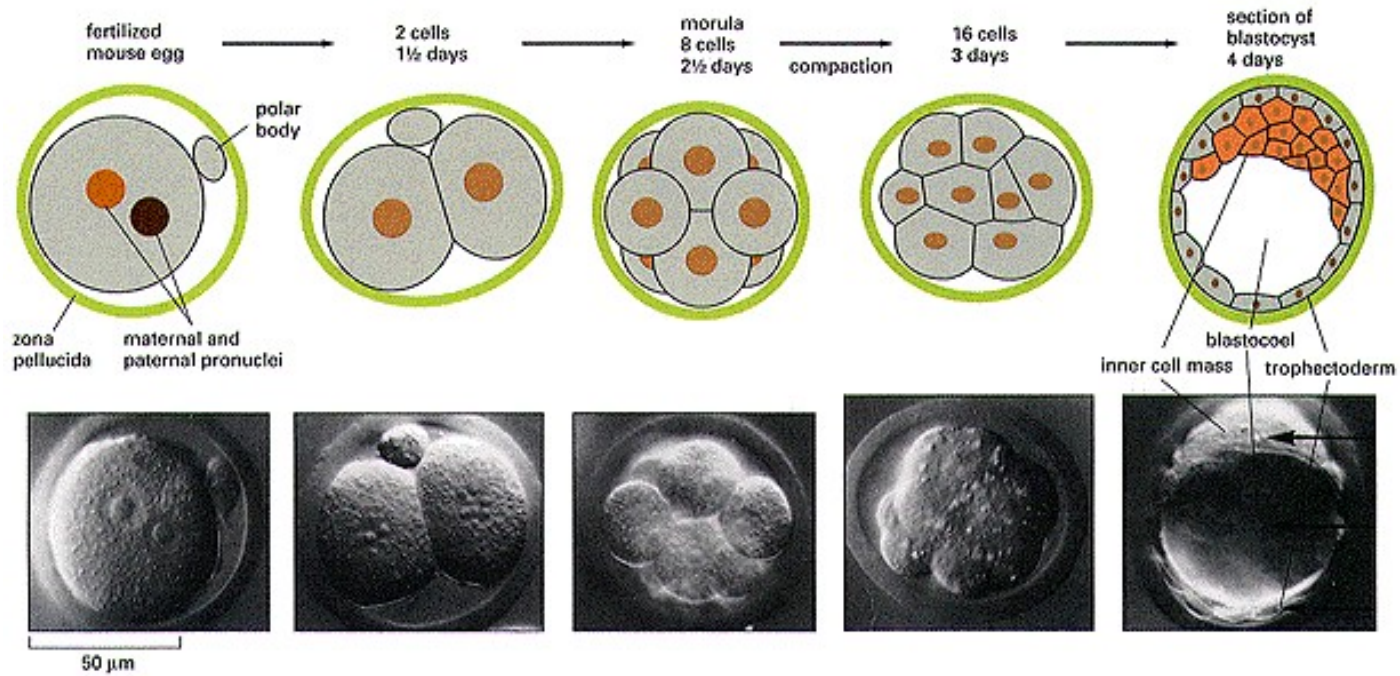
Silenziamento genico

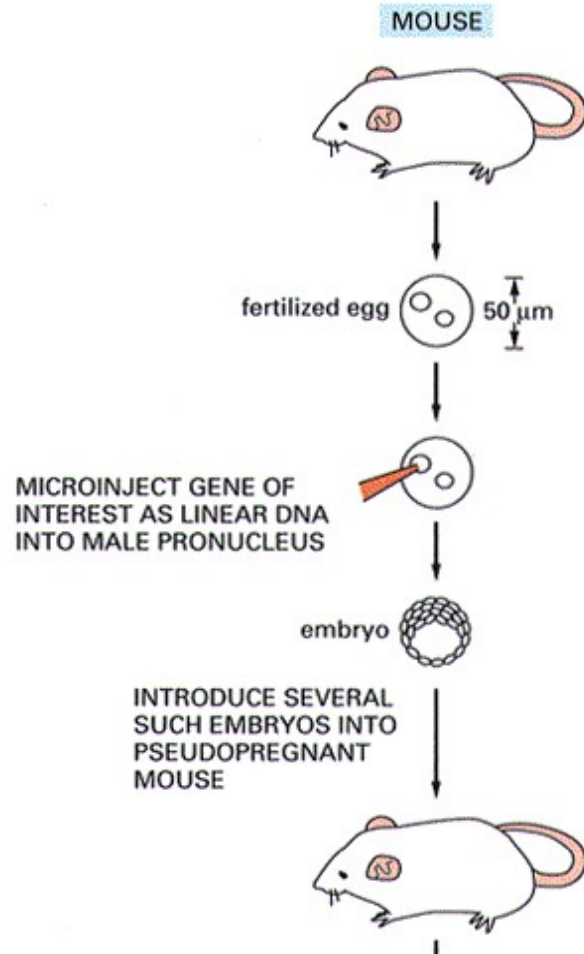
Editing genomico

Topo (*Mus musculus*)



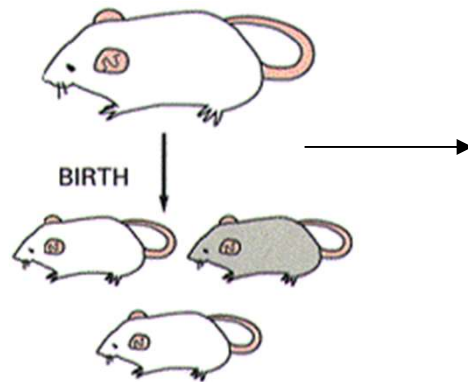
Sviluppo dello zigote fino allo stadio di blastocisti



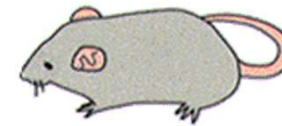


Topi transgenici

per microiniezione dell'uovo fecondato

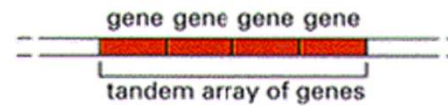


SOMATIC CELLS OF OFFSPRING
TESTED FOR PRESENCE OF GENE
AFTER BIOPSY, AND SELECTED
MOUSE BRED TO TEST FOR GENE
IN GERM CELLS

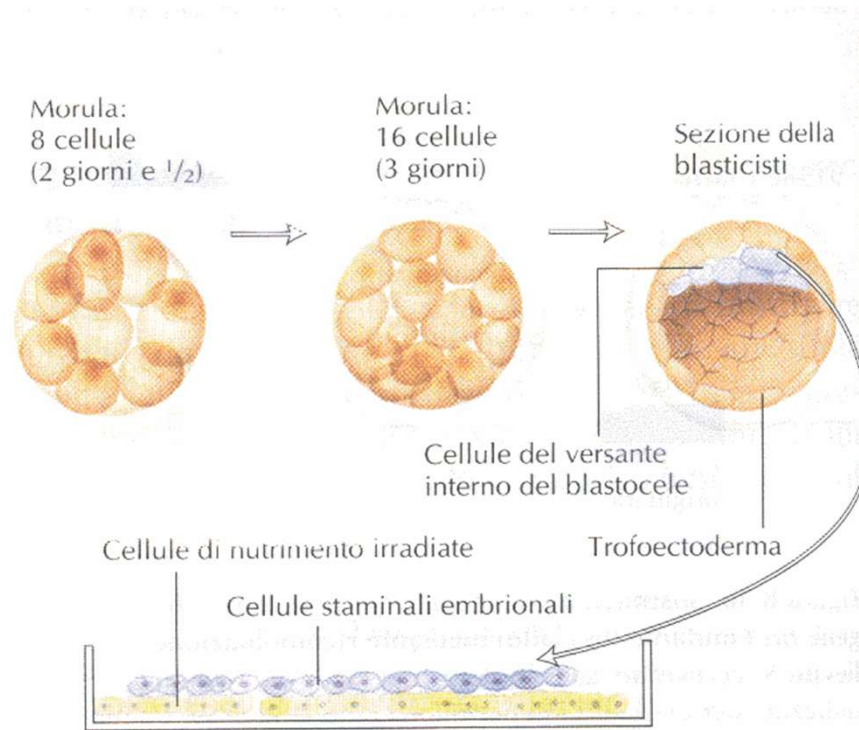


TRANSGENIC MOUSE

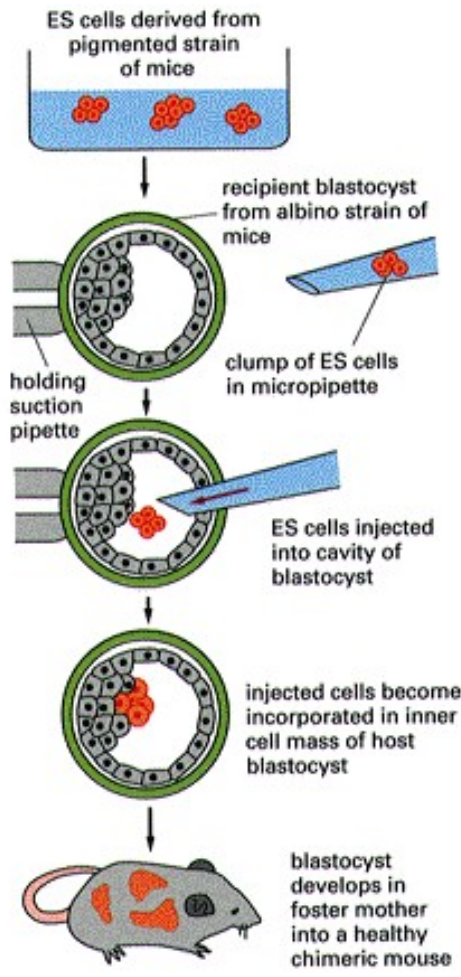
tandemly arranged copies of the gene
are inserted randomly into one
chromosome in each cell



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 *blastocite*. 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].



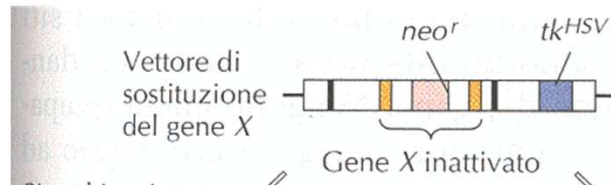


Lezione 20 aprile 2026

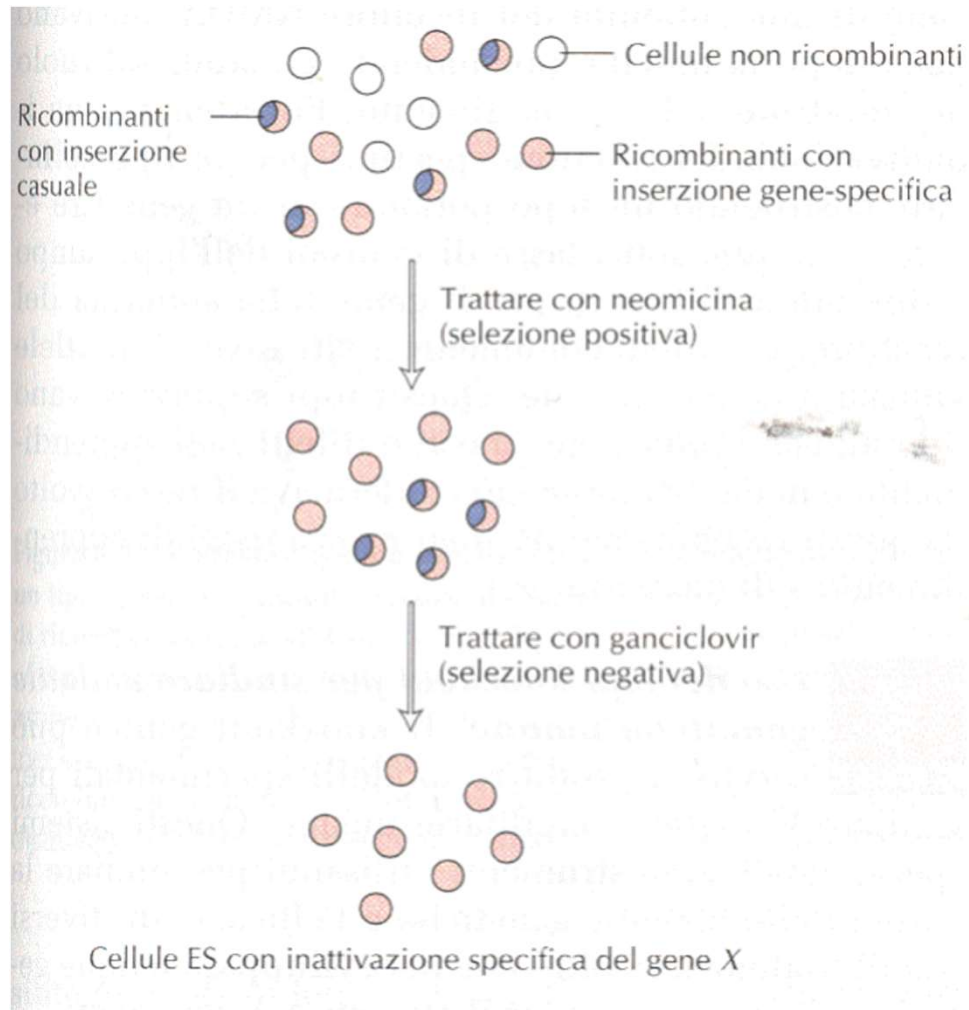
Il primo topo knockout fu creato da Mario Capecchi, Martin Evans ed Oliver Smithies alla fine degli anni ottanta, ed è valso loro il Premio Nobel per la medicina l'8 ottobre 2007.



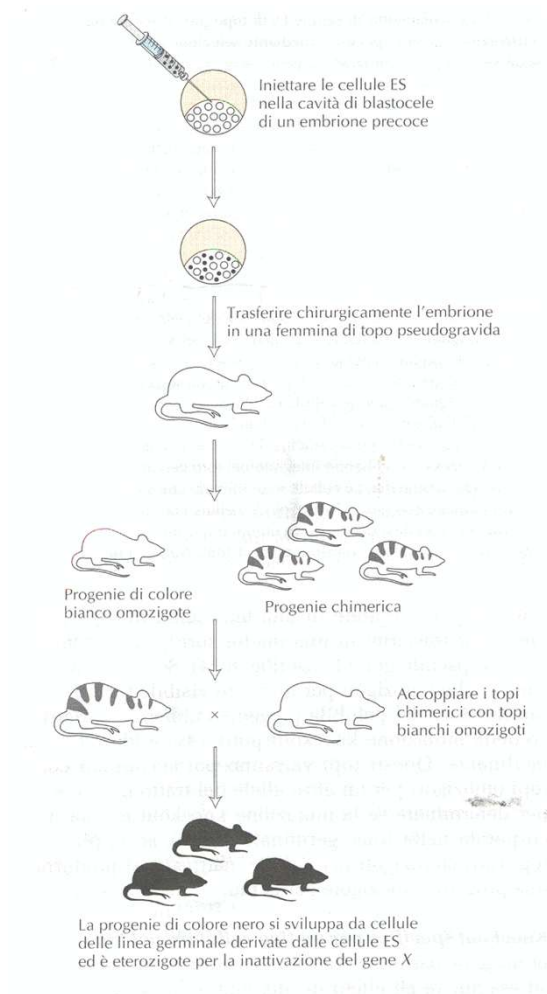
Courtesy of Dr. M. Capecchi, Eccles Institute of Human Genetics.
Noncommercial, educational use only.



Costrutto finalizzato ad una mutazione knock-out



**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).

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

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

Fibrosi cistica

Gene: *CFTR*

Topo KO: sì

Quanto è fedele: parziale

Riproduce difetti intestinali e ghiandolari

Meno fedele per il fenotipo polmonare (nei topi è più lieve)

Distrofia muscolare di Duchenne

Gene: *DMD* (distrofina)

Modello famoso: topo **mdx** (di fatto un KO funzionale)

Quanto è fedele: buono ma non perfetto

Debolezza muscolare sì

Progressione meno grave rispetto all'uomo

Beta-talassemia

Gene: *HBB*

Topo KO: sì

Fedeltà: buona per studiare anemia e fisiopatologia eritroide

Atassia-telangiectasia

Gene: *ATM*

Topo KO: sì

Fedeltà: buona

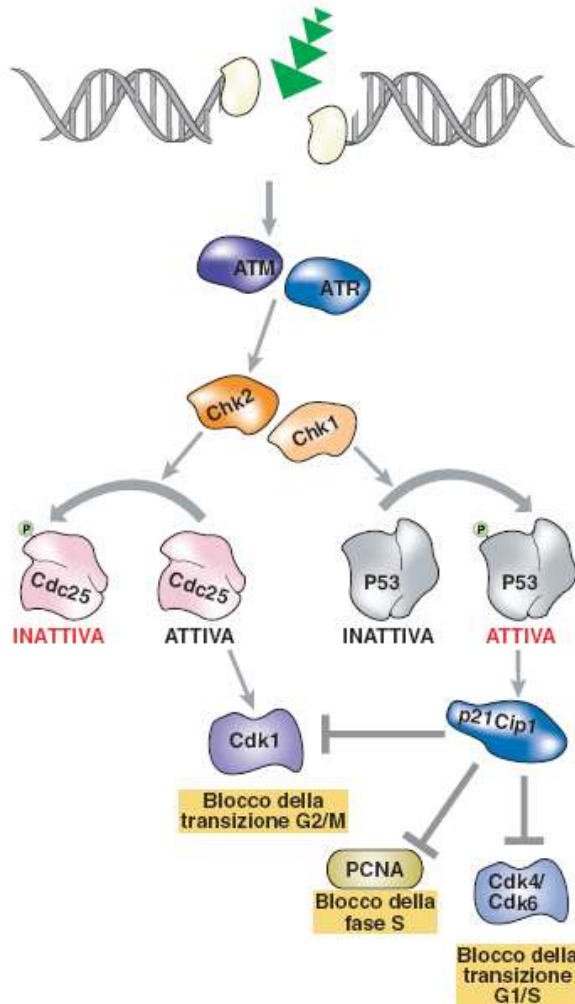
Instabilità genomica, immunodeficienza, tumori

Sindrome dell'X fragile

Gene: *FMR1*

Topo KO: sì

Fedeltà: buona per aspetti neurologici e comportamentali



Gene: *ATM*
Topo KO: sì
Fedeltà: buona
 Instabilità genomica, immunodeficienza,
 tumori

Topi Knock-out condizionali

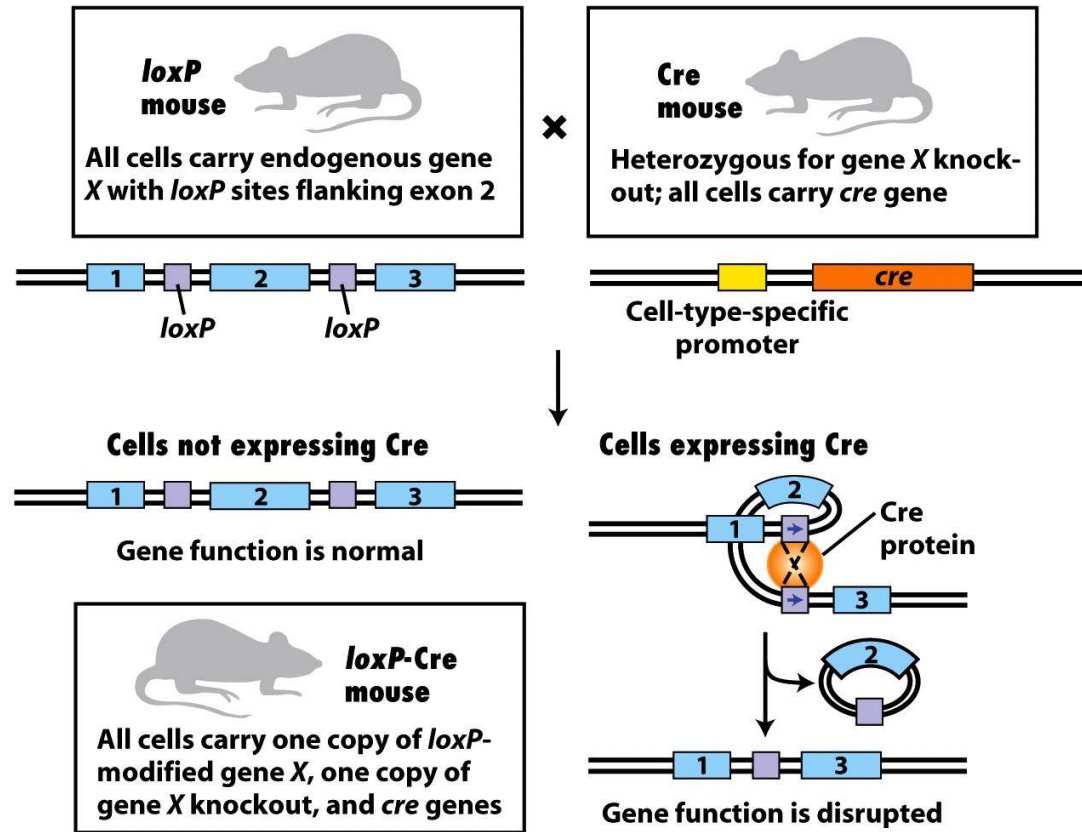


Figure 5-42
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
 © 2008 W.H. Freeman and Company

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

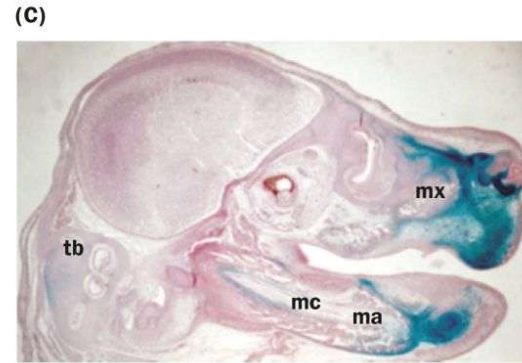
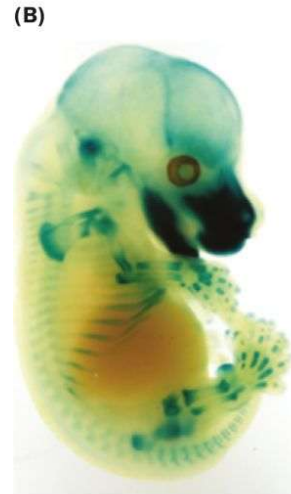
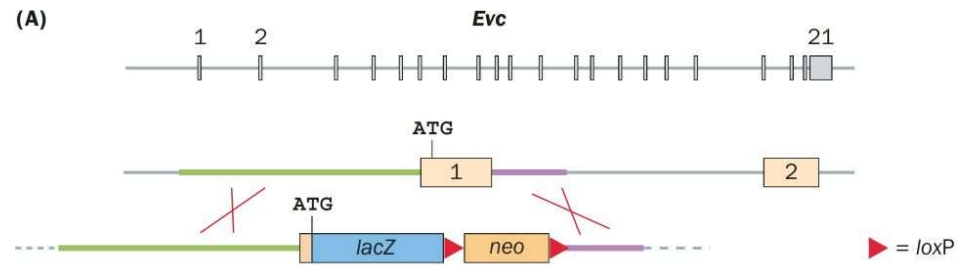
Topo Knock/in:

esempi delle patologia umane

con **gain e loss of functions**

da **deficit dell'alfa1-antitripsina**

e **Corea di Hungtington**



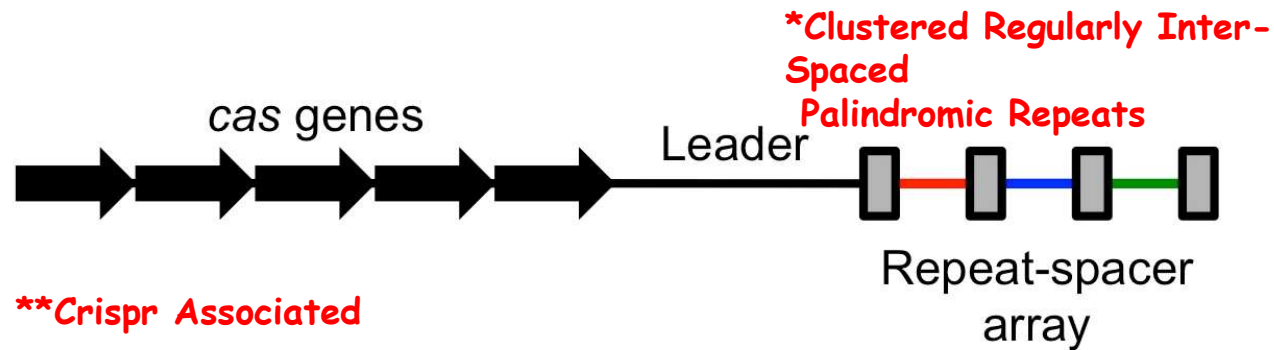
Knock/in del transgene reporter *lacZ* per inattivare un gene X e monitorarne contemporaneamente la sua normale espressione



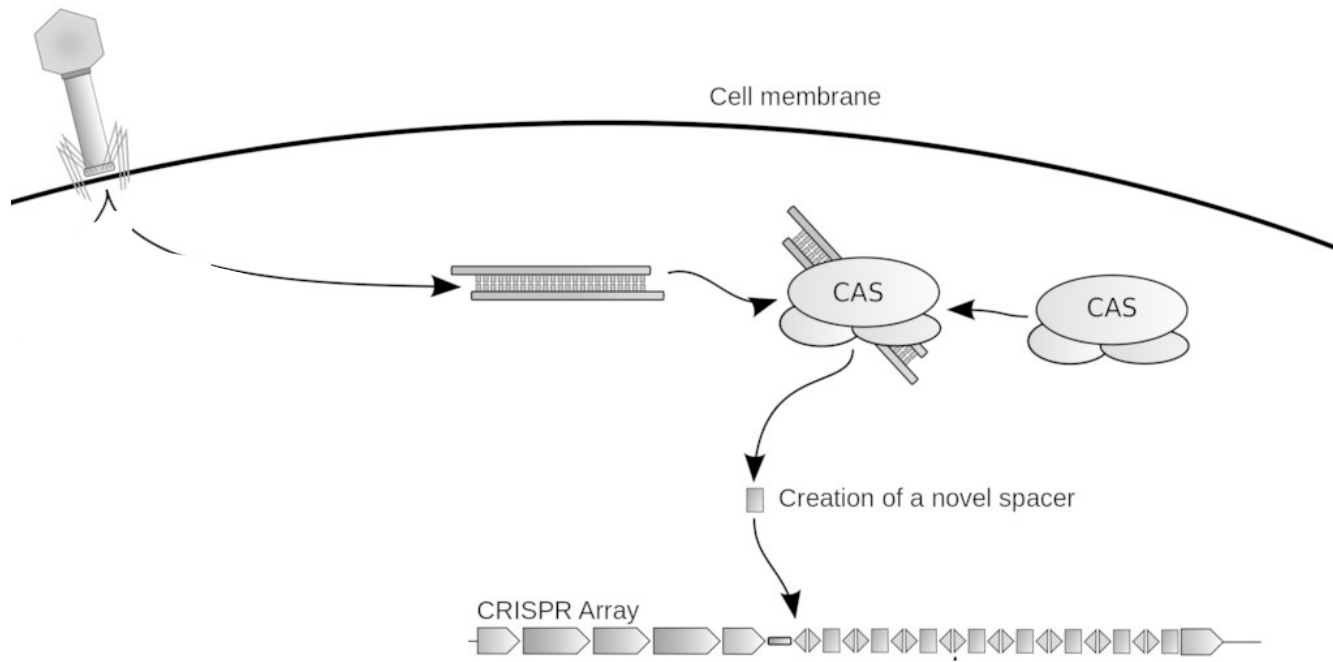
Lezione 23 aprile 2026

Genome Editing

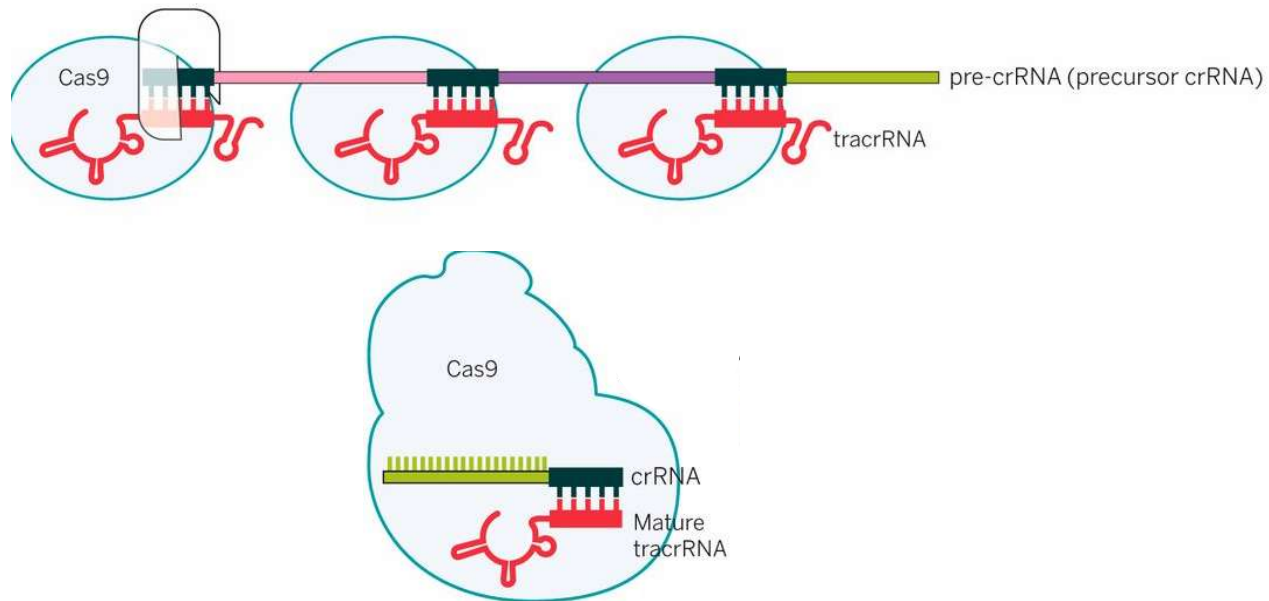
Il sistema CRISPR*-Cas9**



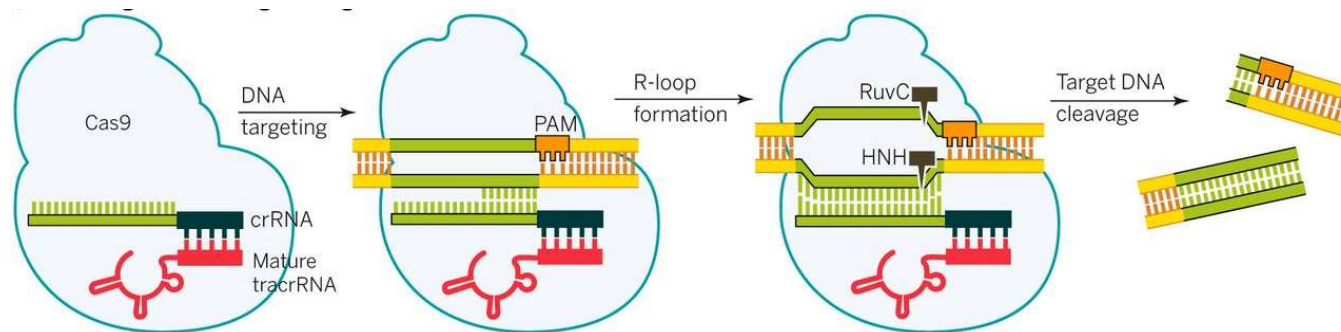
Sistema immunitario batterico scoperto come tale nel 2005 quando si notò che le sequenze spaziatrici hanno origine plasmidica o virale e che i geni associati a questa regione codificano per proteine con domini elicasi e nucleasici. Nel 2008 si è scoperto che RNAs derivati dalle CRISPR (crRNAs) complessati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

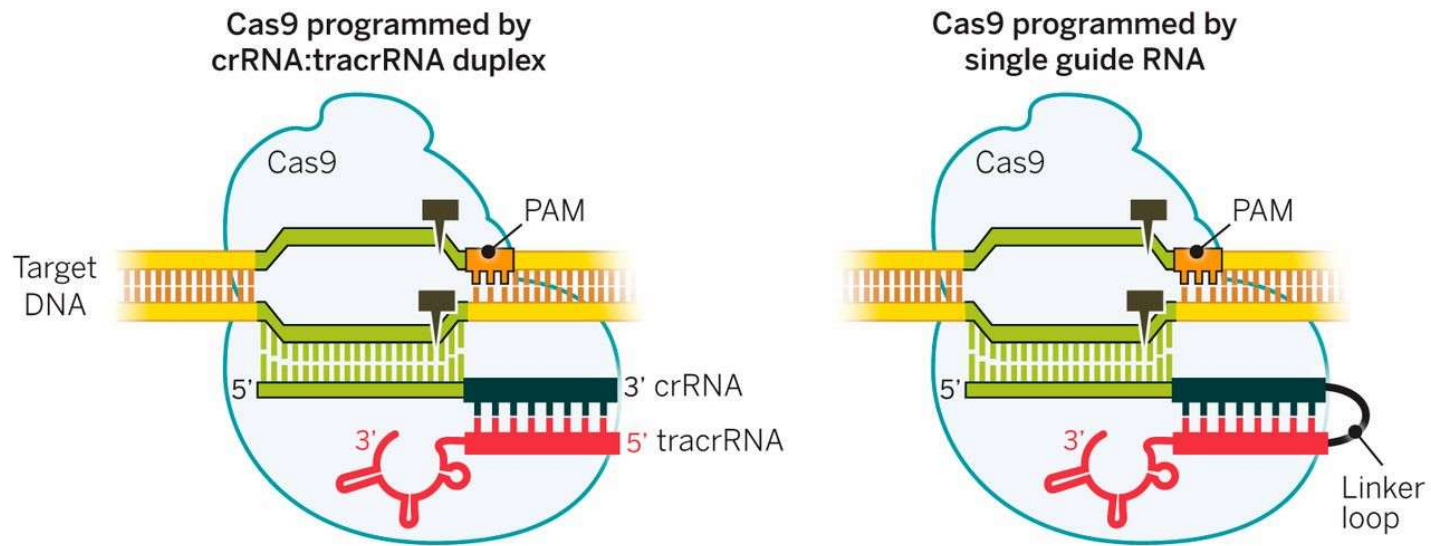


Il **complesso Cas9/tracrRNA/crRNA** raggiunge il DNA target che viene legato per complementarità con una sequenza del crRNA lunga 20 nt.

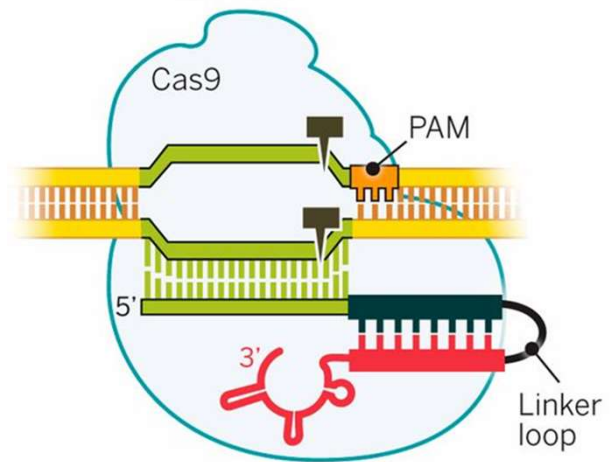


I due strand del DNA target vengono riconosciuti e tagliati da due diversi domini della Cas9 (HNH per lo strand complementare al crRNA e RuvC per lo strand opposto).

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.

Crispr/Cas9 nella terapia antitumorale

Con **CRISPR-Cas9** si modificano geneticamente le cellule T per renderle più aggressive contro il cancro. Questo si fa **ex vivo**:
si prelevano cellule T dal paziente
si modificano in laboratorio
si reinfondono nel paziente

Target principale: PD-1

Uno dei geni più importanti è:

PDCD1 (PD-1)

PD-1 è un **"freno" delle cellule T**

normalmente serve per evitare autoimmunità
i tumori lo sfruttano per spegnere le cellule T

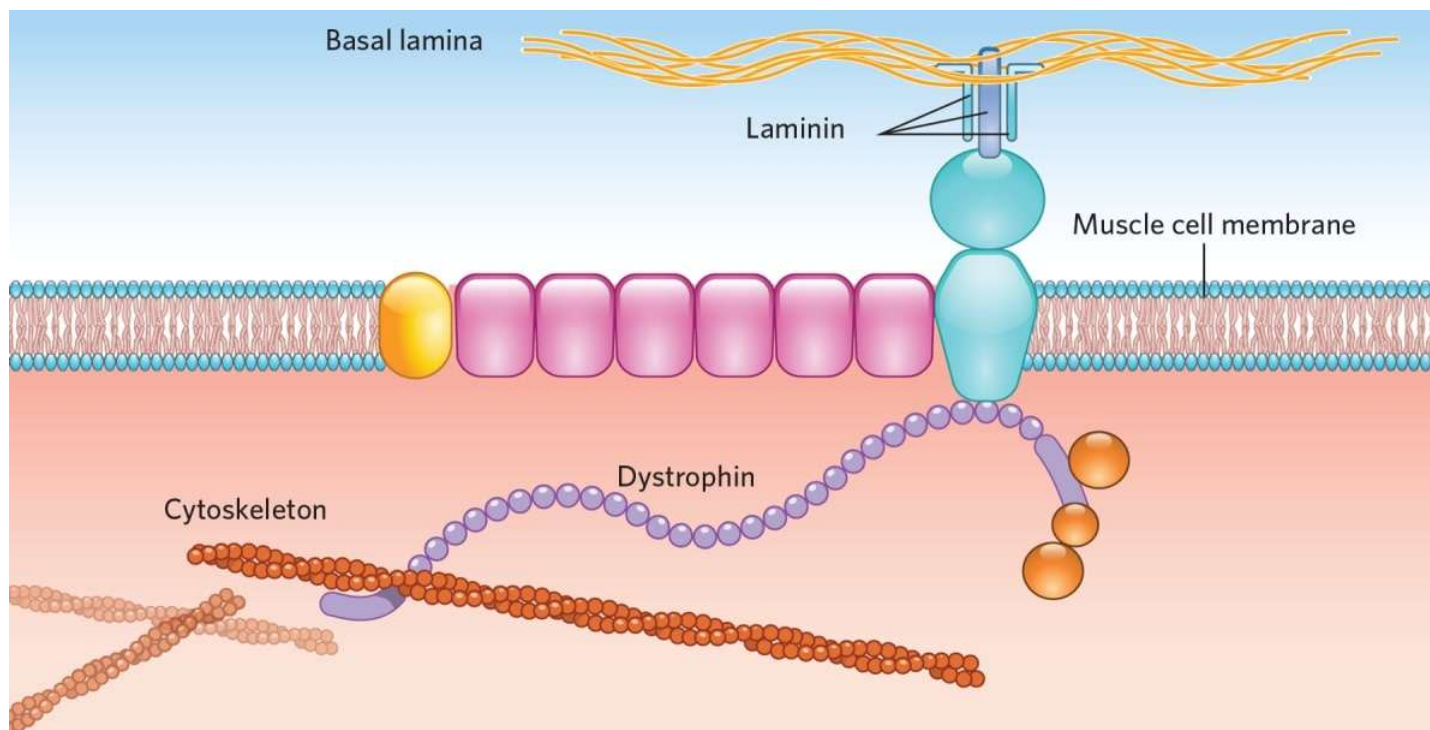
↳ CRISPR può:

disattivare PD-1

risultato: cellule T più attive contro il tumore

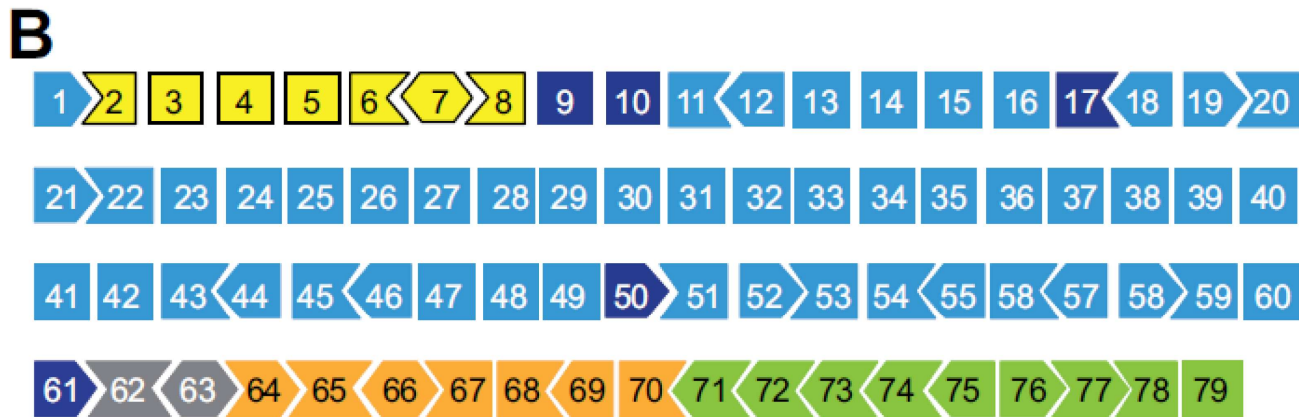
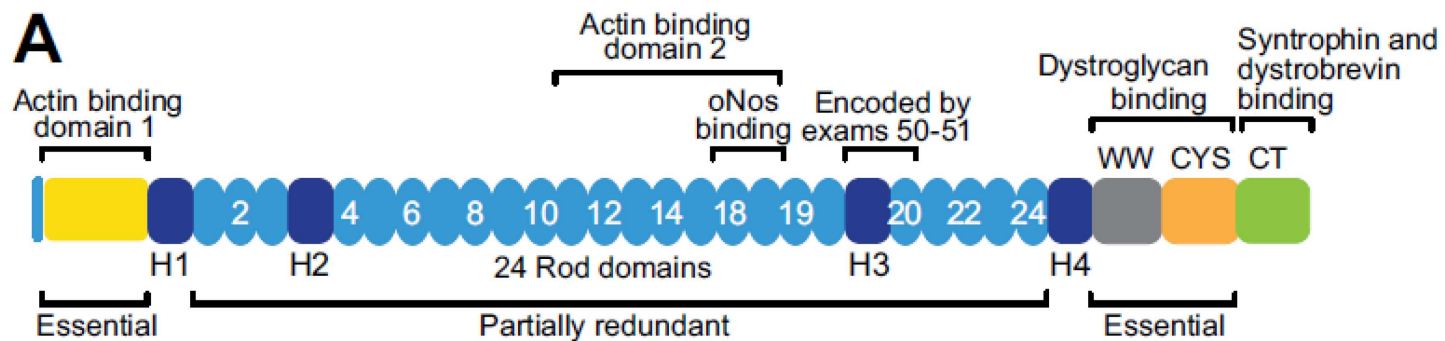
Crispr/Cas9 nella terapia genica della distrofia di Duchenne (sperimentale)

- il gene è **DMD**
- il problema tipico è un **frameshift** che interrompe la produzione della distrofina
- CRISPR ai lati dell'esone che hai descritto (due tagli → eliminazione di un esone)
- **ripristino della reading frame**
- distrofina più corta ma parzialmente funzionale



La distrofina collega il citoscheletro della cellula muscolare alla matrice extracellulare. In pratica, funziona come un **"ammortizzatore"** durante la contrazione muscolare. Se manca, le fibre muscolari si danneggiano facilmente e vengono progressivamente sostituite da tessuto adiposo e fibroso.

Il gene DMD enorme (~2,4 milioni di basi, 79 esoni). La zona centrale (esoni ~45-55) → la più colpita



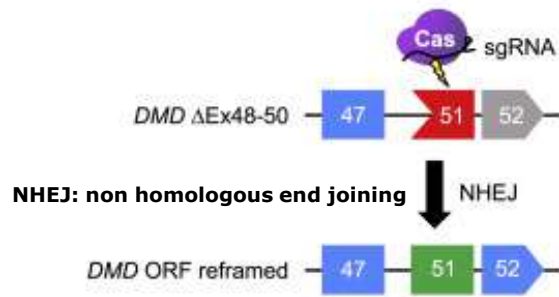
Le mutazioni più frequenti sono delle delezioni per **crossing over ineguali** per appaiamenti anomali tra sequenze simili (quelle che codificano per i domini centrali della proteina) in meiosi.

Se le delezioni non corrispondono a un numero di triplette multiplo di tre si ha una **mutazione frameshift** con introduzione precoce di triplette di stop.

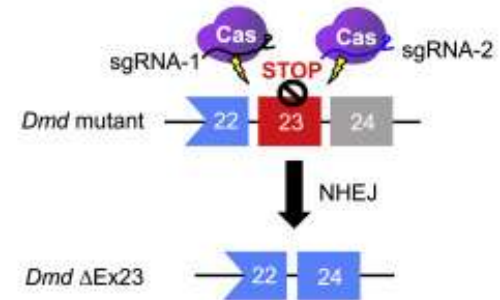
Quando nelle mutazioni del gene DMD compare un **codone di stop prematuro**, l'mRNA viene spesso eliminato tramite un sistema chiamato: **Nonsense-mediated decay (NMD)**

RISULTATO: distrofina poca o assente

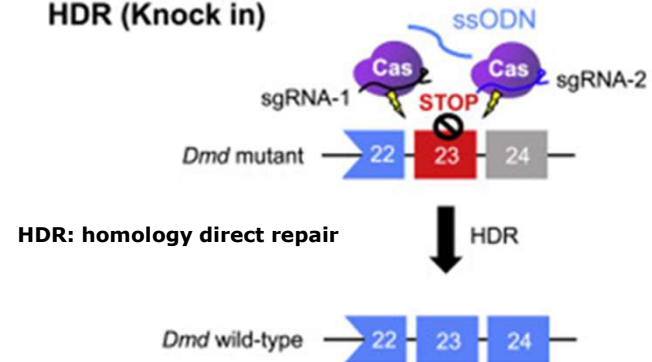
A Exon reframing



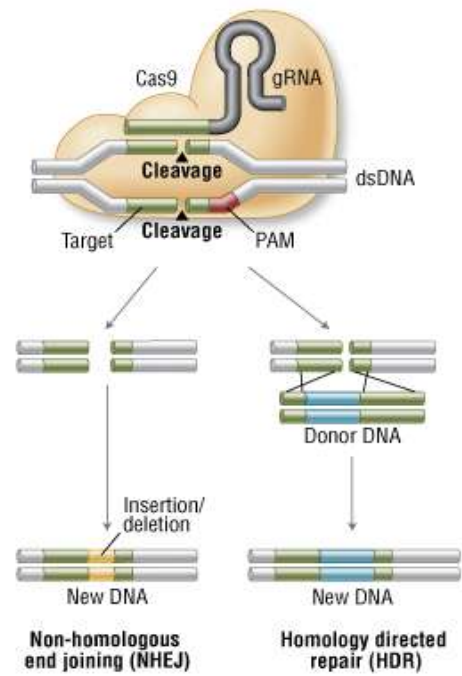
B Exon deletion



C HDR (Knock in)



A. Genome Engineering With Cas9 Nuclease



C. Localization With Defective Cas9 Nuclease

