

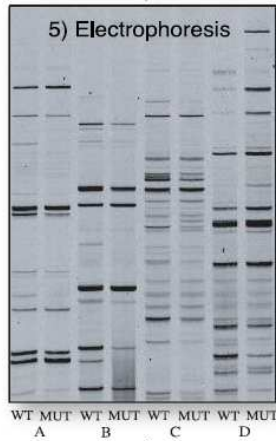
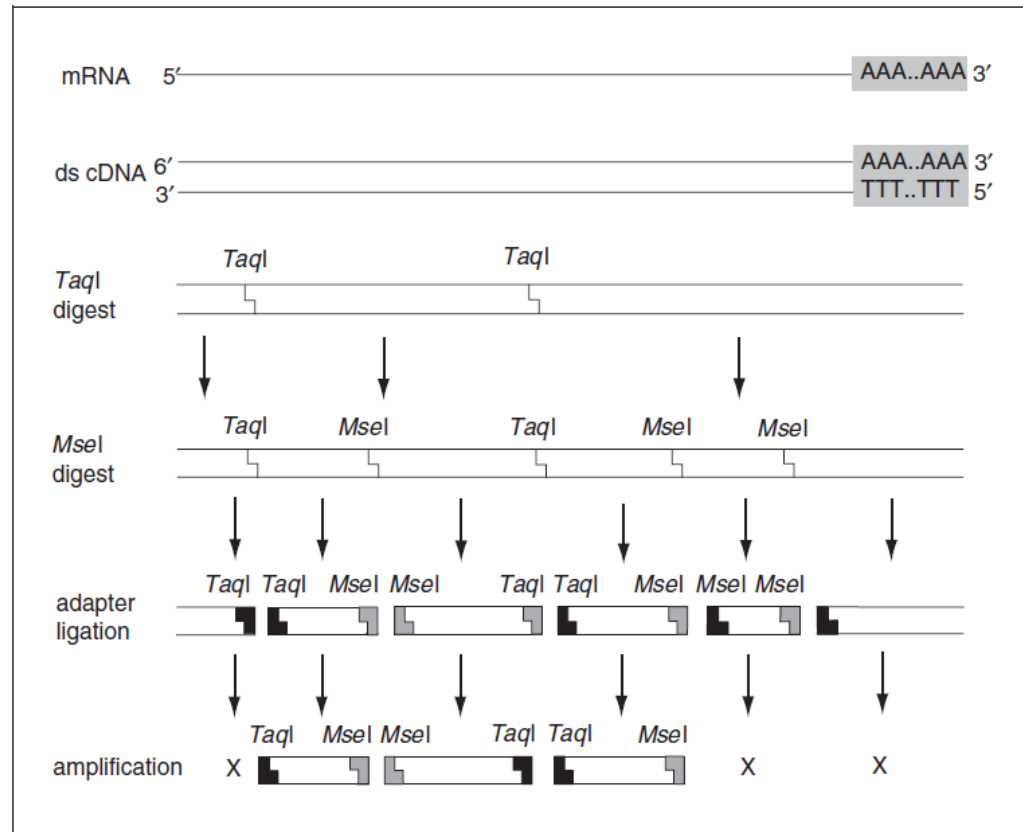
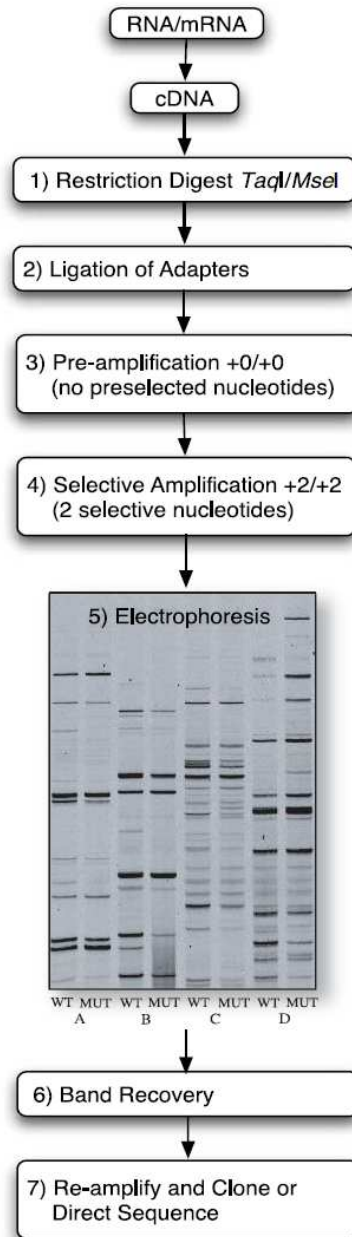
ANALISI DI ESPRESSIONE SU LARGA SCALA

ANALISI DI ESPRESSIONE SU LARGA SCALA

Studio dell'espressione di un grande numero di geni (migliaia) allo stesso tempo

Non richiede necessariamente il sequenziamento del genoma dell'organismo di interesse

cDNA-AFLP



EcoRI-primer +0: 5'-GACTGCGTACCAATTC-3'

EcoRI-primer +1: 5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'

EcoRI-primers +2: 5'-GACTGCGTACCAATTCAN-3'

EcoRI-primers +3: 5'-GACTGCGTACCAATTCANN-3'

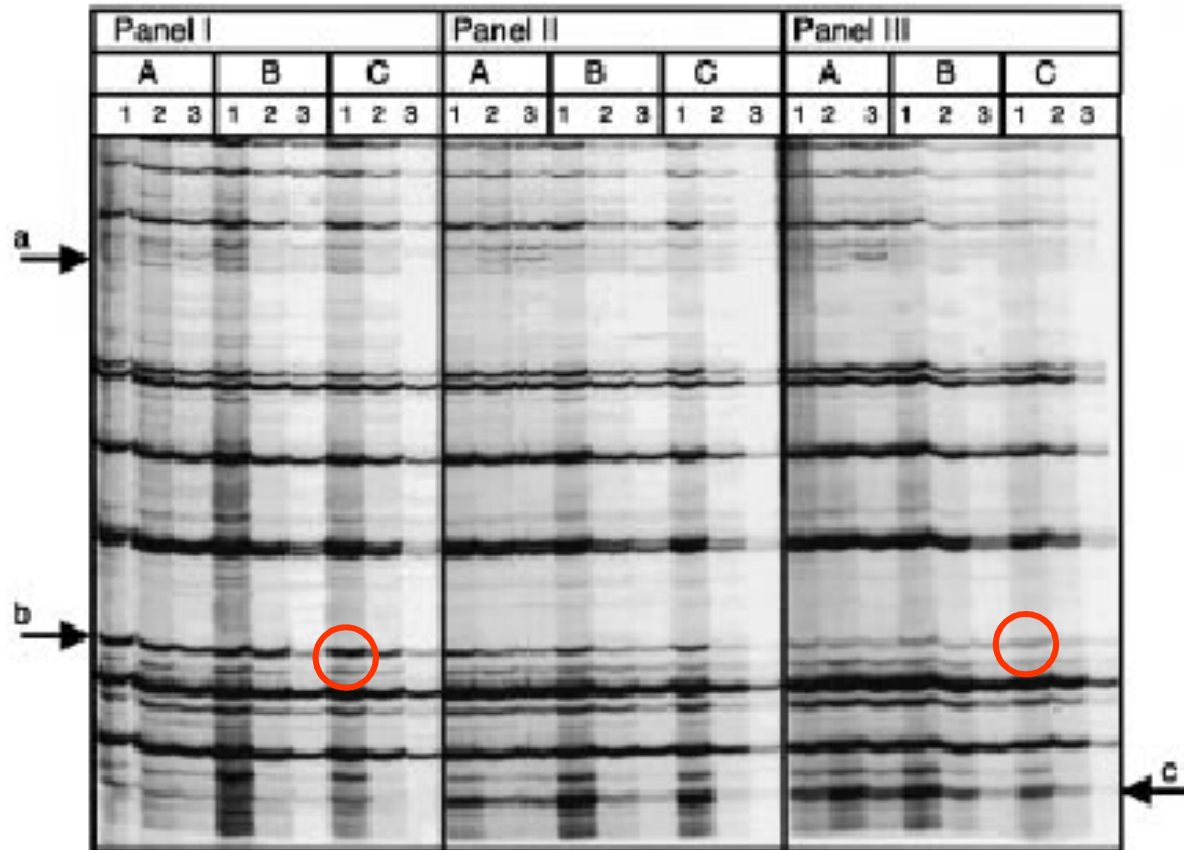
MseI-primer +1: 5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'

MseI-primers +2: 5'-GATGAGTCCTGAGTAACN-3'

MseI-primers +3: 5'-GATGAGTCCTGAGTAACNN-3'

cDNA-AFLP

Fingerprinting su gel di poliacrilammide



A = 10 cicli; B = 15 cicli; C = 20 cicli

1 = diluizione 1:10 del template, 2= dil. 1:50; 3= dil. 1:100

cDNA-AFLP

- Permette il riconoscimento di mRNA differenzialmente espressi, senza forti restrizioni riguardo il sistema sperimentale
- Essendo basata sulla PCR, mostra una elevata sensibilità.
- Rispetto a tecniche precedenti come il "differential display" mostra una maggiore specificità nei trascritti amplificati e riproducibilità dei profili di espressione (condizioni di PCR più stringenti, permesse dall'impiego di "primer" specifici)
- Costa poco!

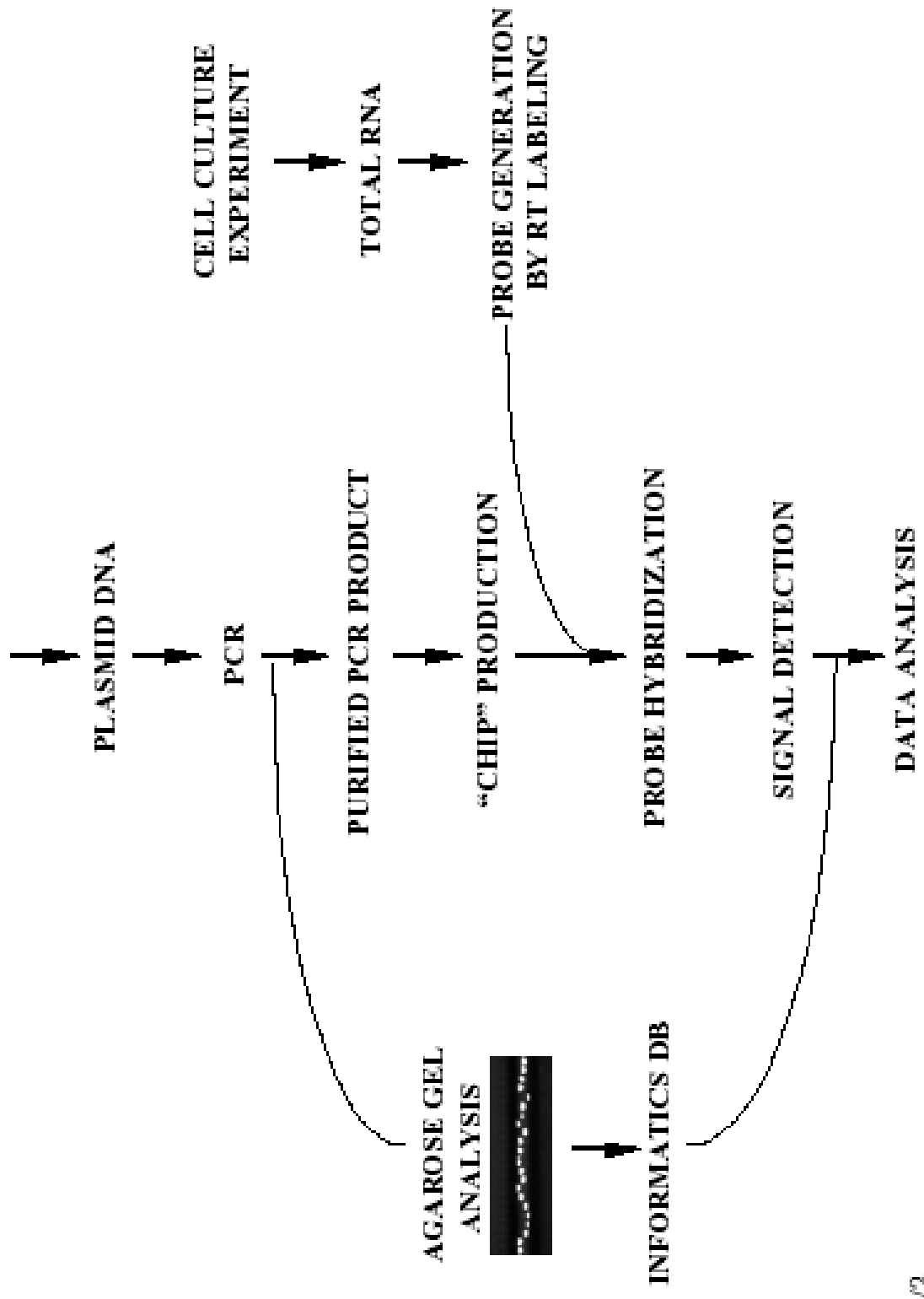
ANALISI DI ESPRESSIONE CON MICROARRAYS

- Sequenze di DNA (**sonde**) specifiche per un alto numero di geni immobilizzate in una superficie molto piccola
- Ibridazione di RNA marcati (**target**) sull'array rilevata tramite fluorescenza
- La scansione dell'array con un laser fornisce valori di **fluorescenza** proporzionali alla quantità di RNA marcato corrispondente a ciascuna sonda

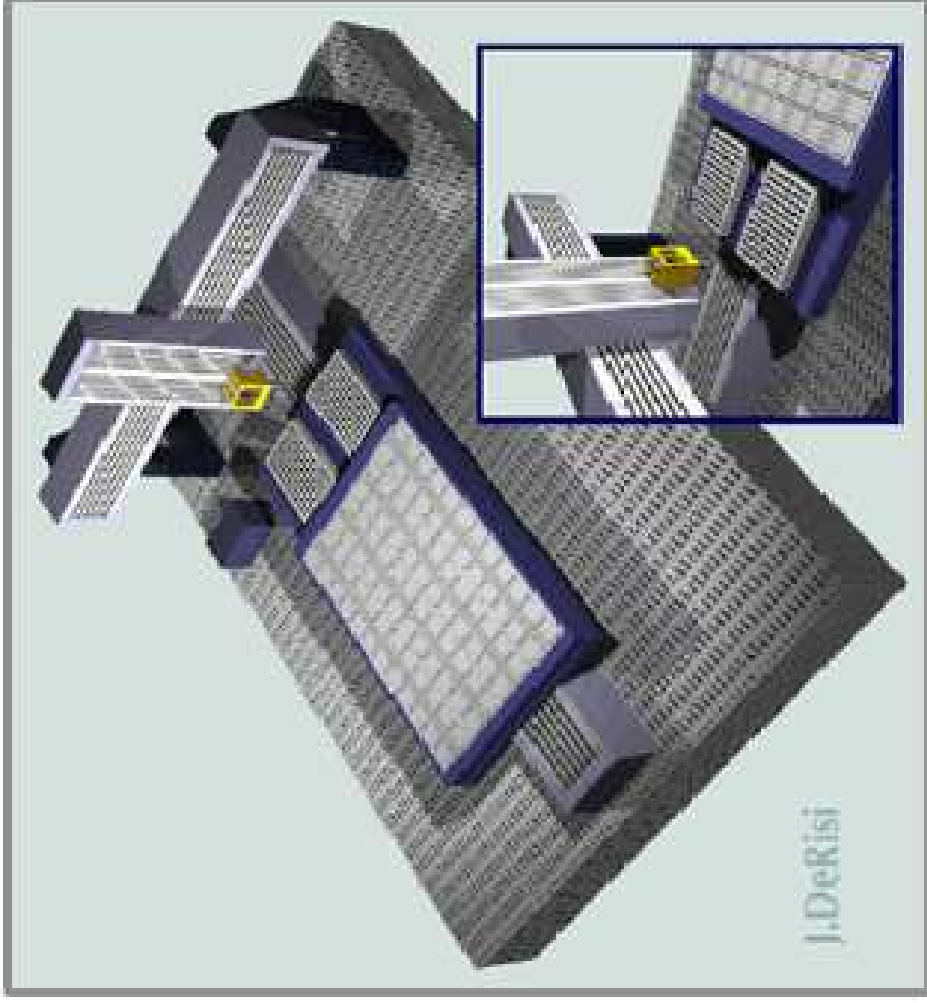
Microarrays a cDNA

- Analisi comparativa (due campioni allo stesso tempo)
- Problemi di cross-ibridazione
- Costo più contenuto
- Si può fare "in casa"

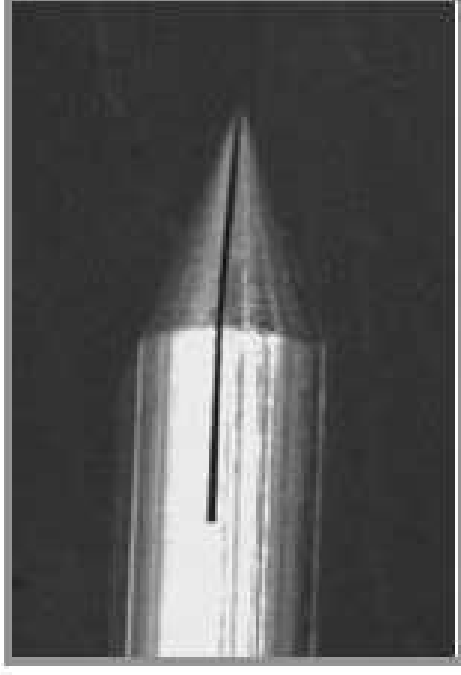
cDNA CLONES IN BACTERIA

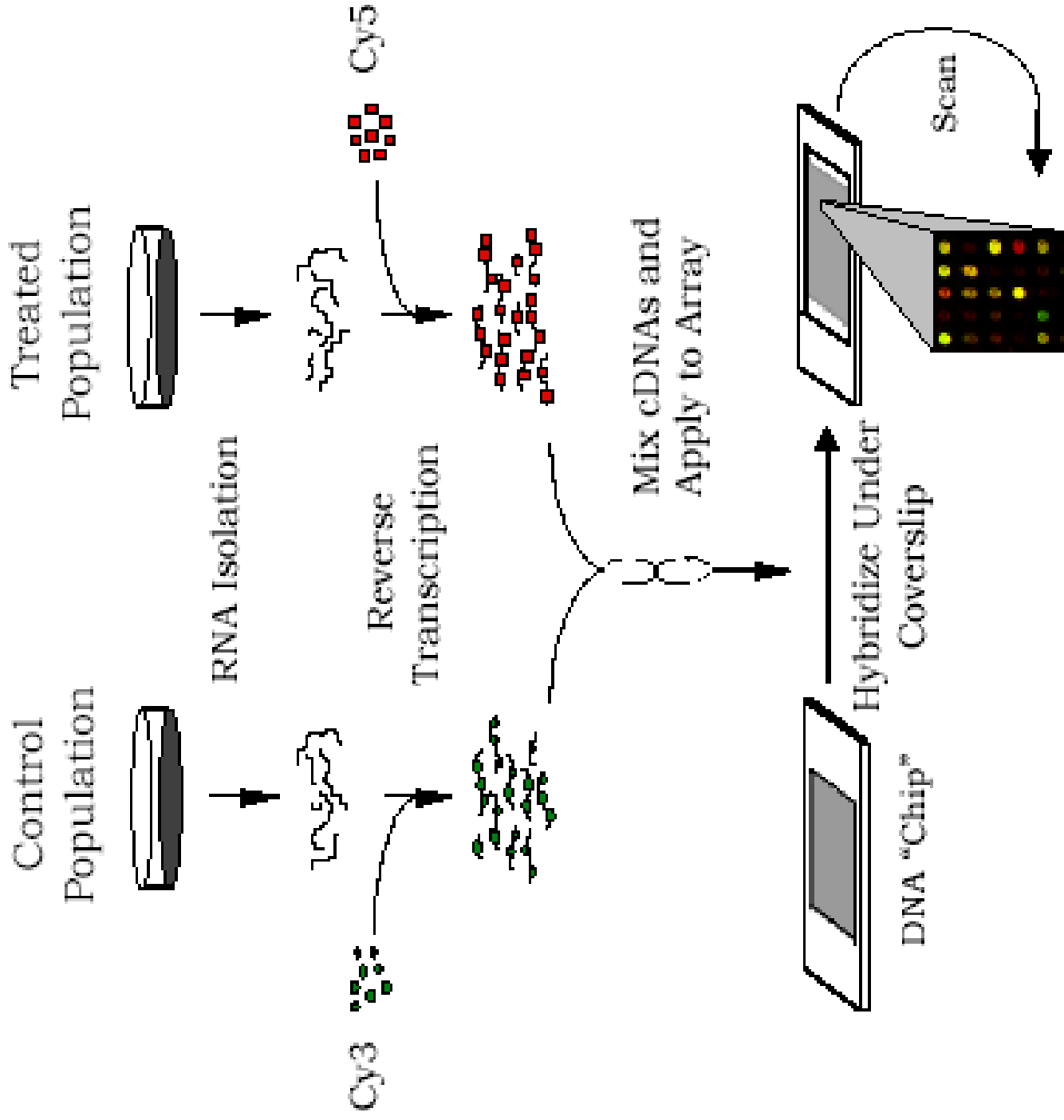


X-Y-Z Robot

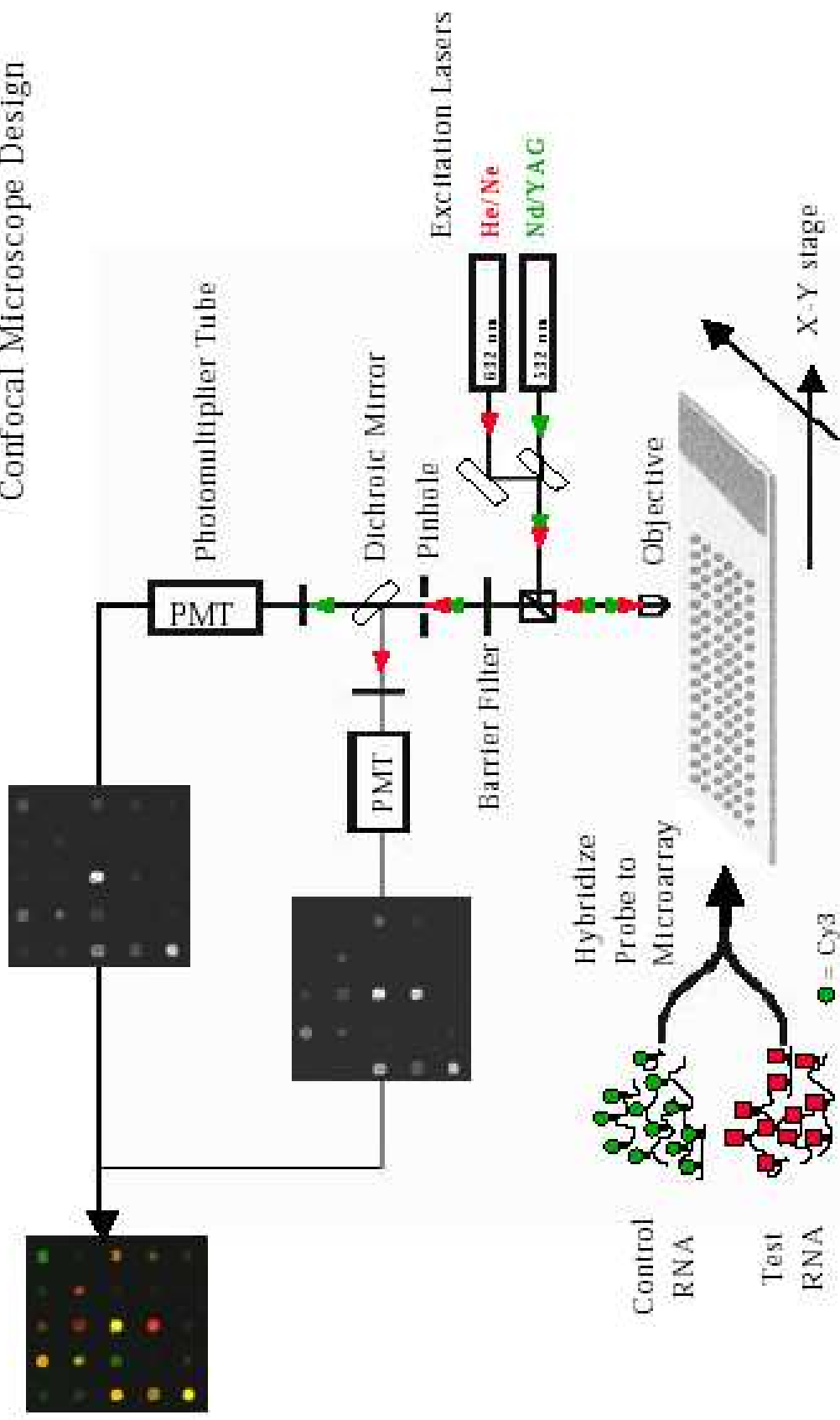


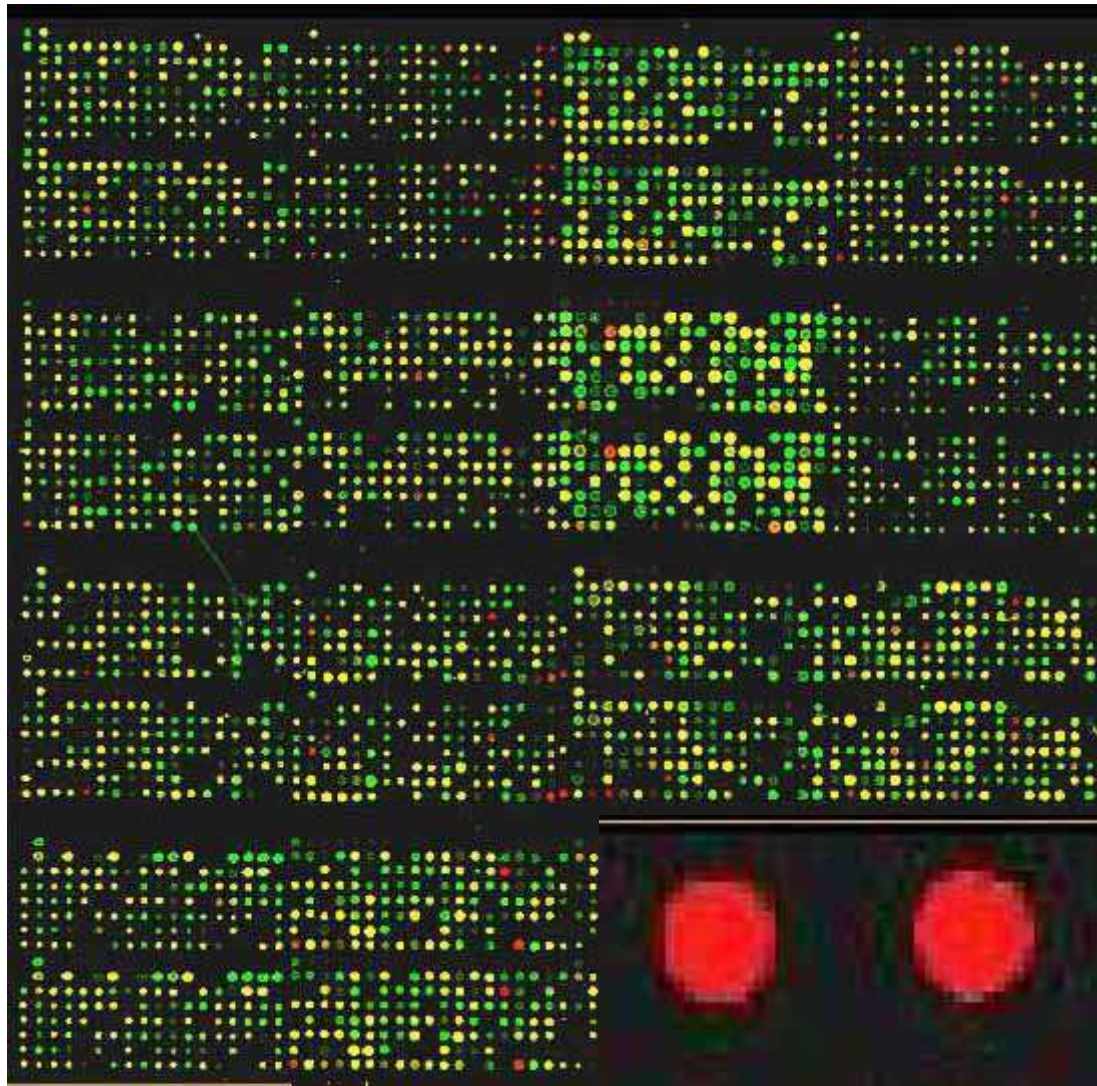
Quill-pen Spotting Tip (“fountain-pen” design)





Confocal Microscope Design



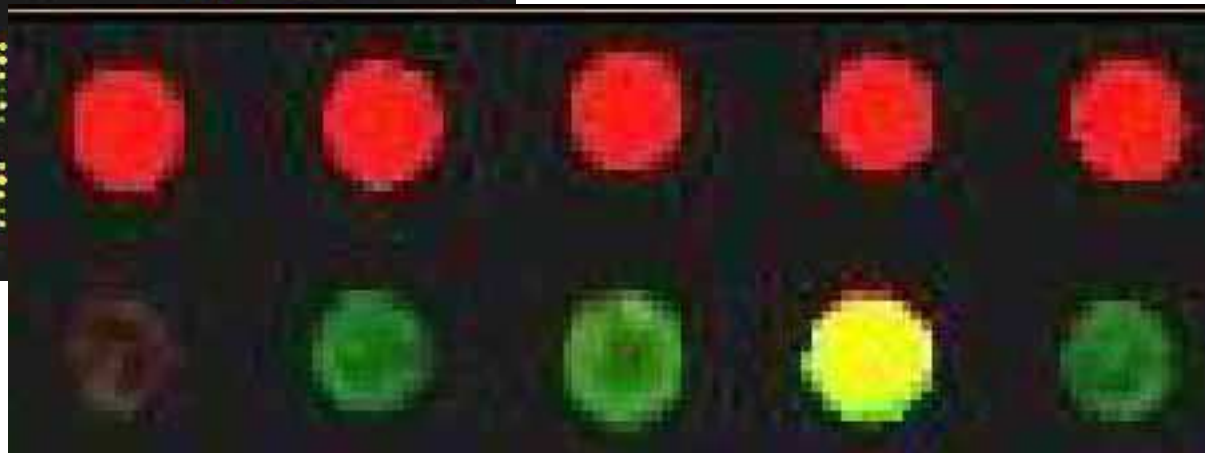


Spot rosso: $Cy5 > Cy3$

Spot verde: $Cy3 > Cy5$

Spot giallo: $Cy3 = Cy5$

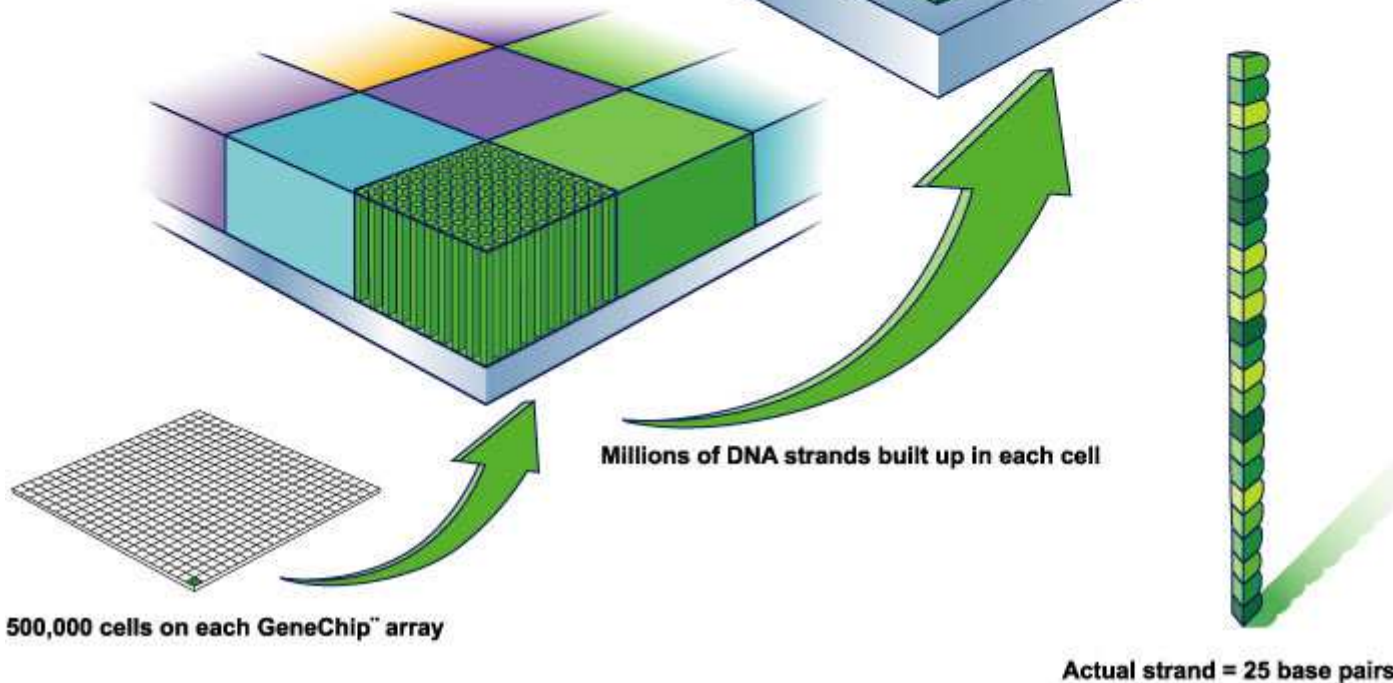
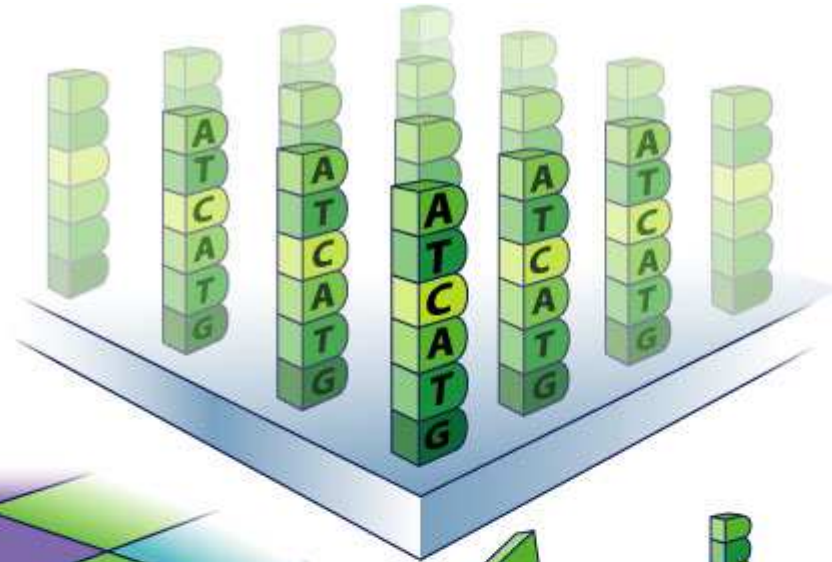
Spot nero: no ibridazione



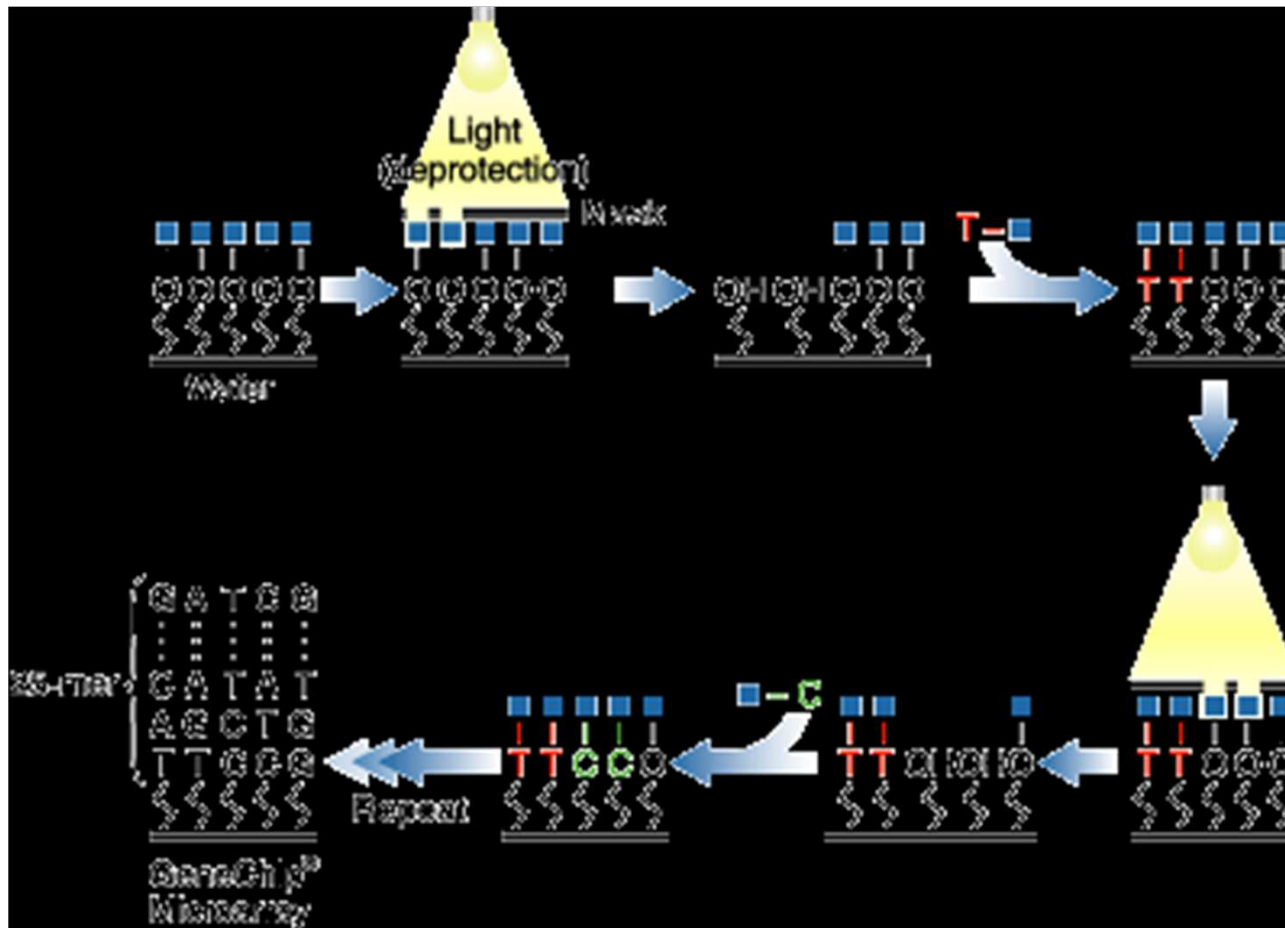
Microarrays ad **oligonucleotidi** (GeneChips)

- Analisi di un campione alla volta
- Forniscono valori assoluti di espressione
- Alta specificità
- Costo elevato

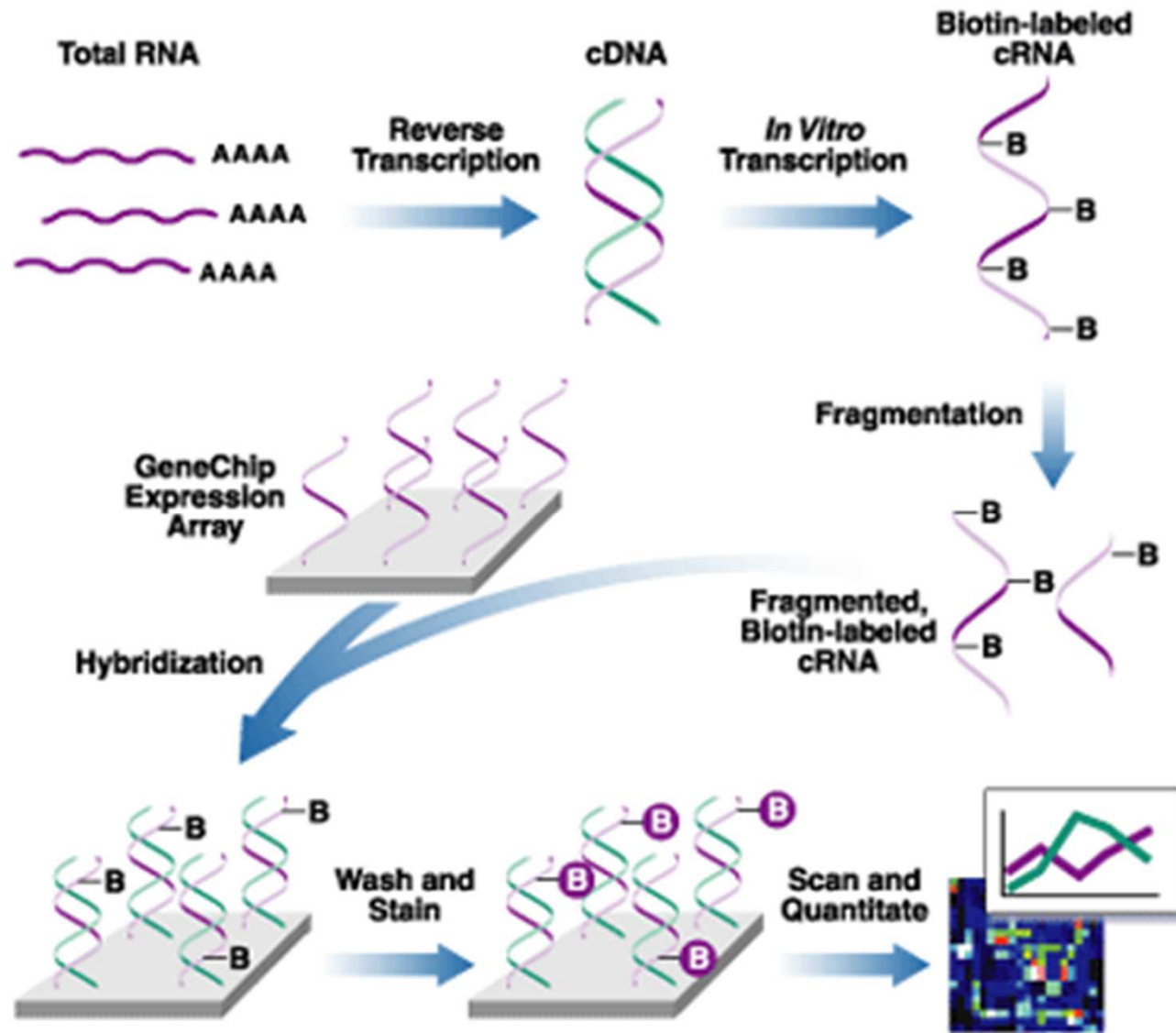
Microarray ad oligonucleotidi (GeneChip)



Processo litografico per la fabbricazione di GeneChips della Affymetrix



Saggio di espressione usando GeneChips

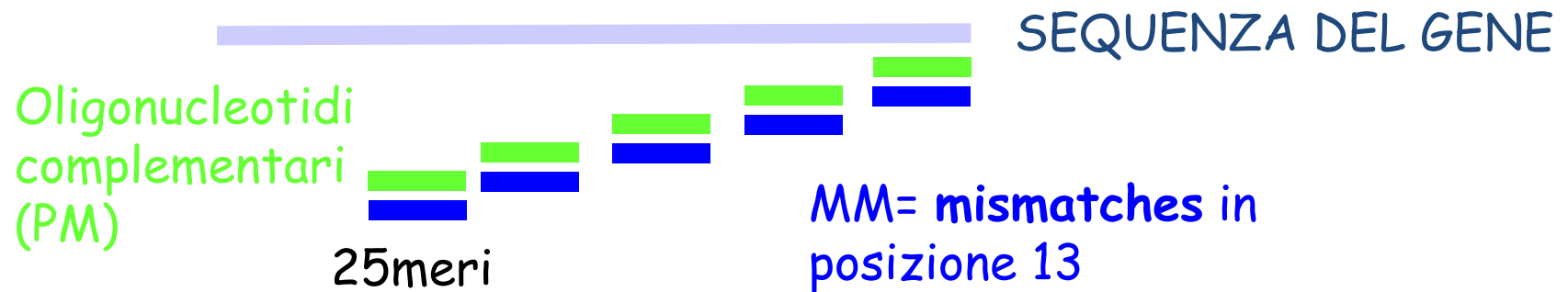


- Ogni gene sul chip è rappresentato da 25-meri
- 16-20 sequenze selezionate per rappresentare ciascun gene
- Ogni 25-mero è chiamato **perfect match (PM)** (appaiamento perfetto)
- Ogni PM è accompagnato da un **mismatch probe (MM)** (sonda ad appaiamento imperfetto)

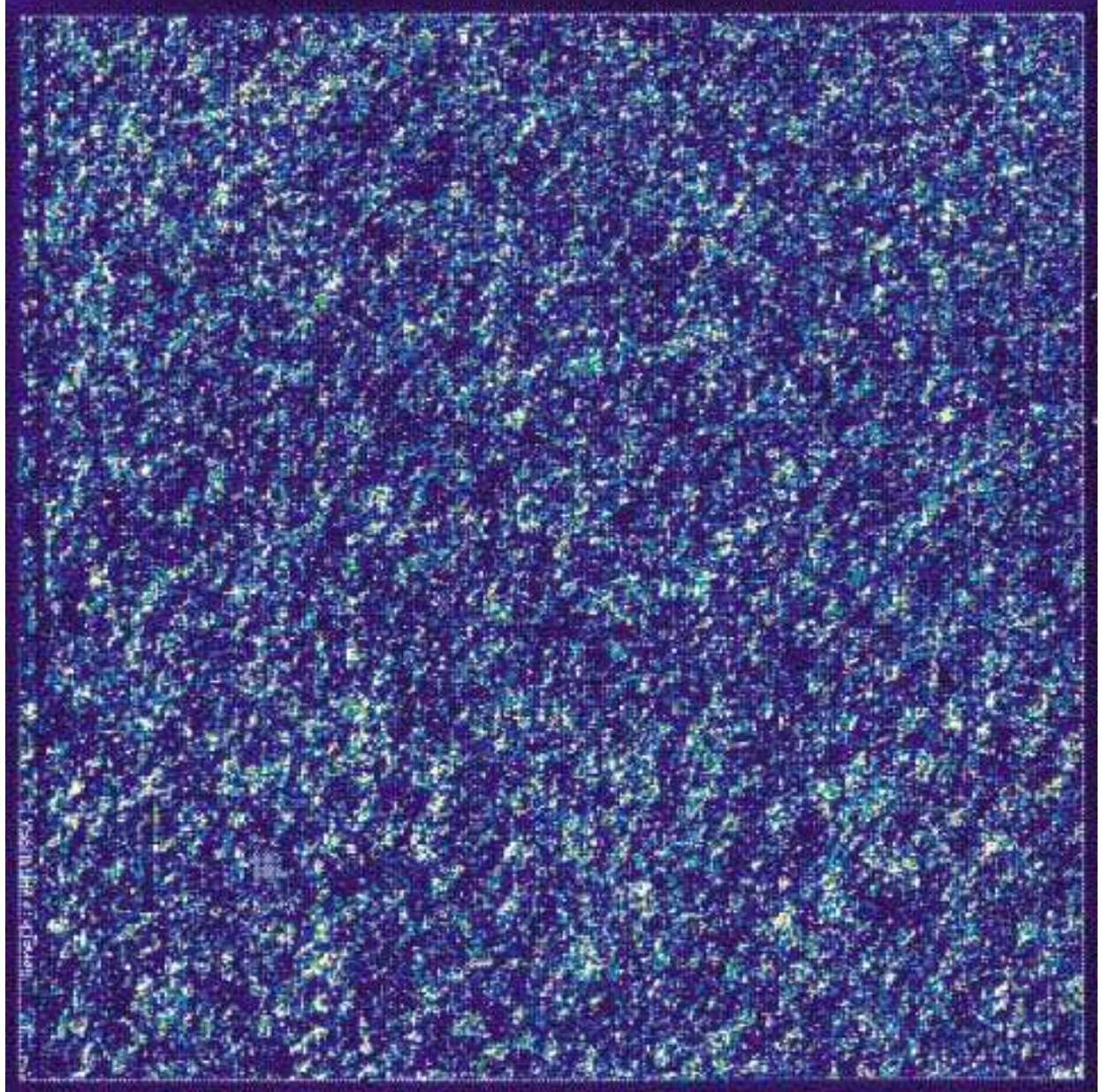
Probe on chip { *PM* : *ATCGACTGATGCATGCATCCATCAT*
MM : *ATCGACTGATGC***C***TGCATCCATCAT*

Sample Probe

TAGCTGACTACGTACGTAGGTAGTA



1. MM è più sensibile a cambiamenti nella concentrazione del target
2. MM serve come controllo per ibridazione aspecifica



SOFTWARE PER ANALISI DI DATI DA MICROARRAYS

- 1) Per disegnare sonde (oligos, primers per PCR...)
- 2) Per gestire immagini e assegnare ogni segnale ad un gene, valutare background, ecc...
- 3) Per analisi statistica (es. dopo analisi repliche esperimenti)
- 4) Per filtrare, raggruppare e dividere i dati ottenuti in modo da ottenere informazioni utili
- 5) Per estrarre informazioni su particolari geni da database pubblici e non

Spot Flag = 0
 Ch1 Net > 150
 Ch2 Net > 150
 Name cci 0
 Gene cci 0
 % > B532+1SD = 0

Display: % > B635+2SD, B532 SD, B635 SD, Blast match, Category
 Show Controls
 Hide Rank

R/G Norm: Descending
 Line: 1 to 50

Rank	NAME	GENE	LINK	CH1D	CH2DN	RATIN	RATZN	MREAT	REGR	CORR	FLAG	CAT	DESC
1	YBR072W	HSP26	SGD	YFD	540	1594	0.34	2.95	3.03	6.03	0.94	hsp	heat shock protein
2	YER106W		SGD	YFD	16	47	0.34	2.94	2.01	1.43	0.30	hypothetical protein	hypothetical protein
3	YHL028W		SGD	YFD	855	2477	0.35	2.90	3.10	5.90	0.89	similarity to mucin and other ser-thr rich protein	similarity to mucin and other ser-thr rich protein
4	YGR189W		SGD	YFD	65	174	0.37	2.68	2.92	3.65	0.64	questionable ORF	questionable ORF
5	YIL119C	RPT1	SGD	YFD	385	975	0.39	2.53	2.69	5.16	0.90	negative regulator of ras-cAMP pathway	negative regulator of ras-cAMP pathway
6	YOR186W		SGD	YFD	49	119	0.41	2.43	2.26	2.16	0.33	hypothetical protein	hypothetical protein
7	YDL181W	INH1	SGD	YFD	342	756	0.45	2.21	2.42	3.24	0.70	inhibitor of mitochondrial ATPase	inhibitor of mitochondrial ATPase
8	YDL021W	GFM2	SGD	YFD	560	1216	0.46	2.17	2.34	3.98	0.89	homology to phosphoglycerate mutase	homology to phosphoglycerate mutase
9	YLR312C		SGD	YFD	64	139	0.46	2.17	3.39	1.75	0.36	hypothetical protein	hypothetical protein
10	YFR054C		SGD	YFD	76	164	0.46	2.16	3.53	0.94	0.21	hypothetical protein	hypothetical protein
11	YOR049C		SGD	YFD	1718	3613	0.48	2.10	2.14	4.44	0.93	hypothetical protein	hypothetical protein
12	YOL104C		SGD	YFD	218	456	0.48	2.09	2.16	3.99	0.90	hypothetical protein	hypothetical protein
13	YBR297W	MAL33	SGD	YFD	649	1356	0.48	2.09	2.19	3.87	0.86	maltose fermentation regulatory protein	maltose fermentation regulatory protein
14	YGL140C		SGD	YFD	48	99	0.48	2.06	2.27	2.17	0.73	hypothetical protein	hypothetical protein
15	YHR046C		SGD	YFD	61	125	0.49	2.05	1.98	2.83	0.69	similarity to myo-inositol-1(or 4)-monophosphatase	similarity to myo-inositol-1(or 4)-monophosphatase
16	YIL111W	COX5B	SGD	YFD	764	1569	0.49	2.05	2.12	4.40	0.96	cytochrome-c oxidase chain Vb	cytochrome-c oxidase chain Vb
17	YKL097W-A	CWP2	SGD	YFD	1392	2856	0.49	2.05	2.27	4.16	0.81	cell wall mannoprotein	cell wall mannoprotein
18	YER188W		SGD	YFD	304	600	0.51	1.97	1.96	3.90	0.93	hypothetical protein	hypothetical protein
19	YFL280W		SGD	YFD	33	65	0.51	1.97	2.55	1.59	0.43	"strong homology to hypothetical proteins YOR391c, YMR322c and YDF533c"	"strong homology to hypothetical proteins YOR391c, YMR322c and YDF533c"
20	YLR012C		SGD	YFD	36	71	0.51	1.97	2.51	1.85	0.64	hypothetical protein	hypothetical protein
21	YDR278C		SGD	YFD	157	305	0.51	1.94	2.32	2.48	0.48	hypothetical protein	hypothetical protein
22	YIR042C		SGD	YFD	425	823	0.52	1.94	1.97	4.00	0.94	hypothetical protein	hypothetical protein
23	YCR102C		SGD	YFD	217	418	0.52	1.93	1.95	3.65	0.84	hypothetical protein	hypothetical protein
24	YIL015C-A		SGD	YFD	903	1720	0.53	1.90	1.93	3.65	0.86	similarity to C.carbonum tonD gene	similarity to C.carbonum tonD gene
25	YER135C		SGD	YFD	52	98	0.53	1.88	2.24	1.60	0.35	hypothetical protein	hypothetical protein
26	YFL166W		SGD	YFD	301	563	0.53	1.87	1.87	2.83	0.73	hypothetical protein	hypothetical protein
27	YBR054W	YRO2	SGD	YFD	847	1569	0.54	1.85	1.78	3.91	0.96	similarity to HSP30 heat shock protein Yro1p	similarity to HSP30 heat shock protein Yro1p
28	YDR194C		SGD	YFD	10814	10094	0.54	1.84	1.85	3.90	0.97	similarity to FLO11 protein	similarity to FLO11 protein

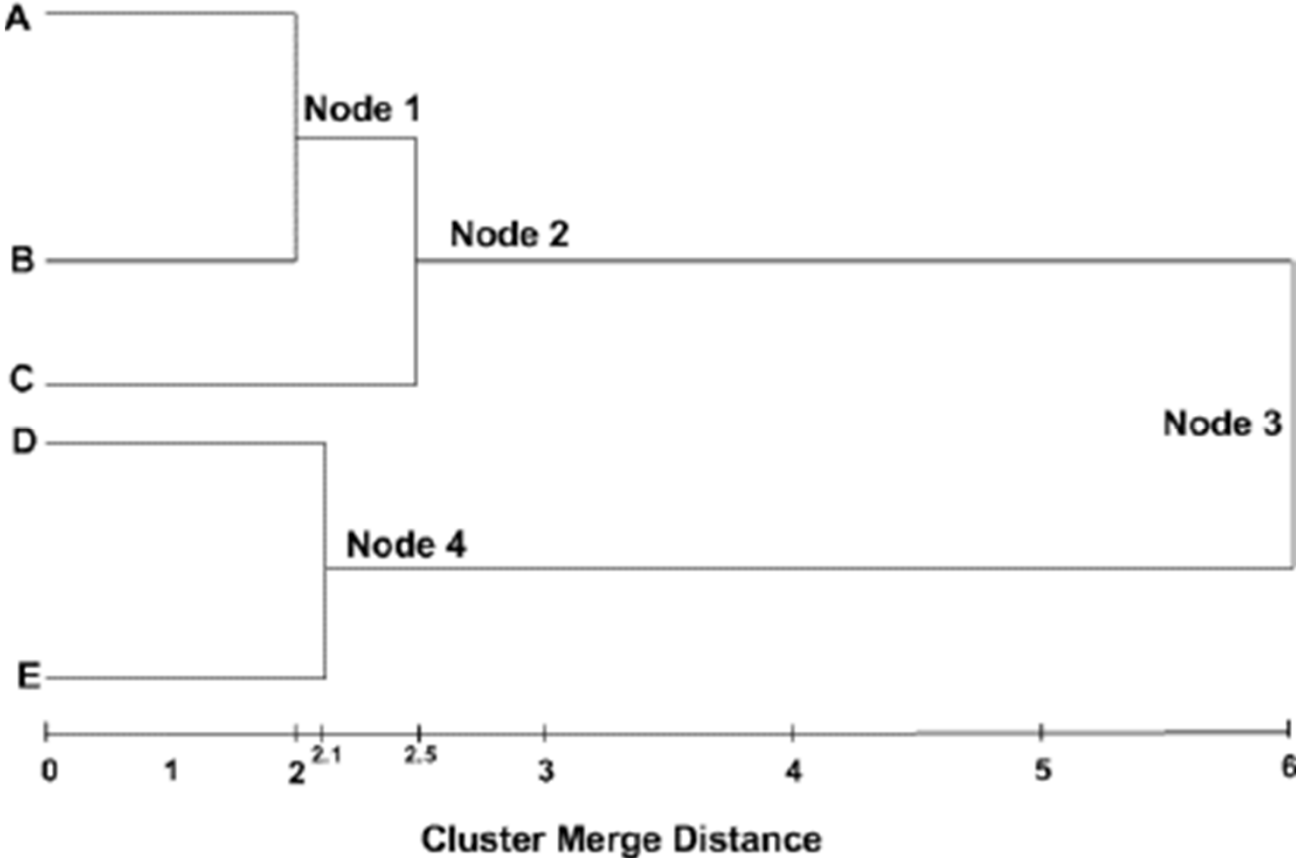
ANALISI DI CLUSTERS

- **Clustering** = analisi statistica multivariata usata per raggruppare geni o esperimenti interi in gruppi (**clusters**) separati basati sul loro comportamento statistico.
- Serve a trovare somiglianza tra **esperimenti** (in base ai dati di espressione in tutti i geni) o tra **geni** (in base all'espressione in tutti i campioni) e **raggruppare simili geni o esperimenti**.
- Si basa su metodi matematici per trovare somiglianze in gruppi di dati.

METODI PER RAGGRUPPARE DATI DI MICROARRAYS

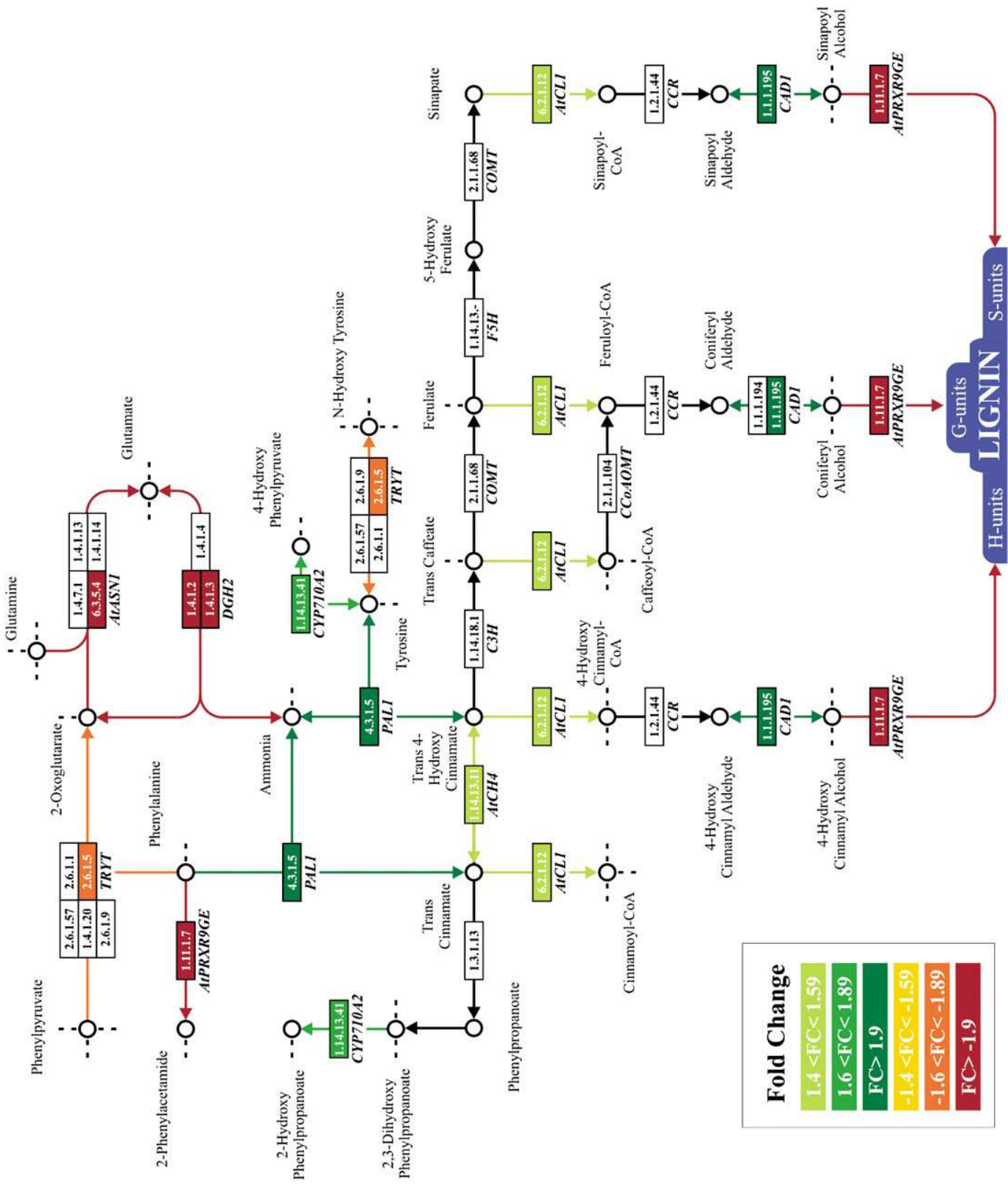
- 1) **Clustering gerarchico agglomerativo**: costruzione di un albero filogenetico, partendo da un gene e andando a distribuire gli altri in base alla loro somiglianza
- 2) **SOM** (= *Self-Organizing Maps*): basato su reti neuronali
- 3) **K-means**: raggruppa i geni in un numero predeterminato di clusters (non gerarchico)

Clustering gerarchico agglomerativo



CHE TIPO DI INFORMAZIONI DA' UN'ANALISI DEL PROFILO TRASCRIZIONALE DI UNA PIANTA?

- 1) Caratterizzazione degli effetti globali di mutazioni o espressione alterata di geni
- 2) Identificazione di geni attivati o repressi in risposta a determinati trattamenti (es. diversi patogeni)
- 3) Identificazione di sequenze regolatrici nei promotori di geni con simile pattern di espressione
- 4) Identificazione di vie metaboliche regolate da determinati trattamenti



**ANALISI DEL PROFILO TRASCRIZIONALE DI
ARABIDOPSIS DOPO INOCULO CON PATOGENI
VIRULENTI E AVIRULENTI**

Pseudomonas syringae = batterio patogeno ad ampio spettro d'ospite.

Ceppi specifici sono virulenti in specie vegetali diverse

Es.:

- *P. syringae* pv *phaseolicola* (Psp): patogeno del fagiolo
- *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst): patogeno del pomodoro
- *P. syringae* pv *maculicola* (Psm): patogeno delle crucifere

Ps. syringae pv. *tomato* (**Pst**) e pv. *maculicola* (**Psm**) sono **virulenti** su *A. thaliana*



Ps. syringae pv. *phaseolicola* (**Psp**) non è virulento su Arabidopsis (**resistenza non-ospite**)

Esistono geni di resistenza di Arabidopsis che conferiscono resistenza "gene-per-gene" contro ceppi di Psm o Pst che portano specifici geni di avirulenza:

Gene R

RPS2

RPM1

Gene Avr

AvrRpt2

AvrB e AvrRpm1

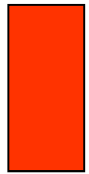
Come differiscono tra loro le risposte di difesa indotte durante interazioni compatibili ed incompatibili?

→analisi del profilo trascrizionale con microarray in piante inoculate con Psm e Pst con o senza geni avr e con Psp (Tao et al., 2003)

- Usata Affymetrix GeneChip AtGenome1 Array (circa 8,000 geni di Arabidopsis)

- Analisi effettuata a tempi diversi

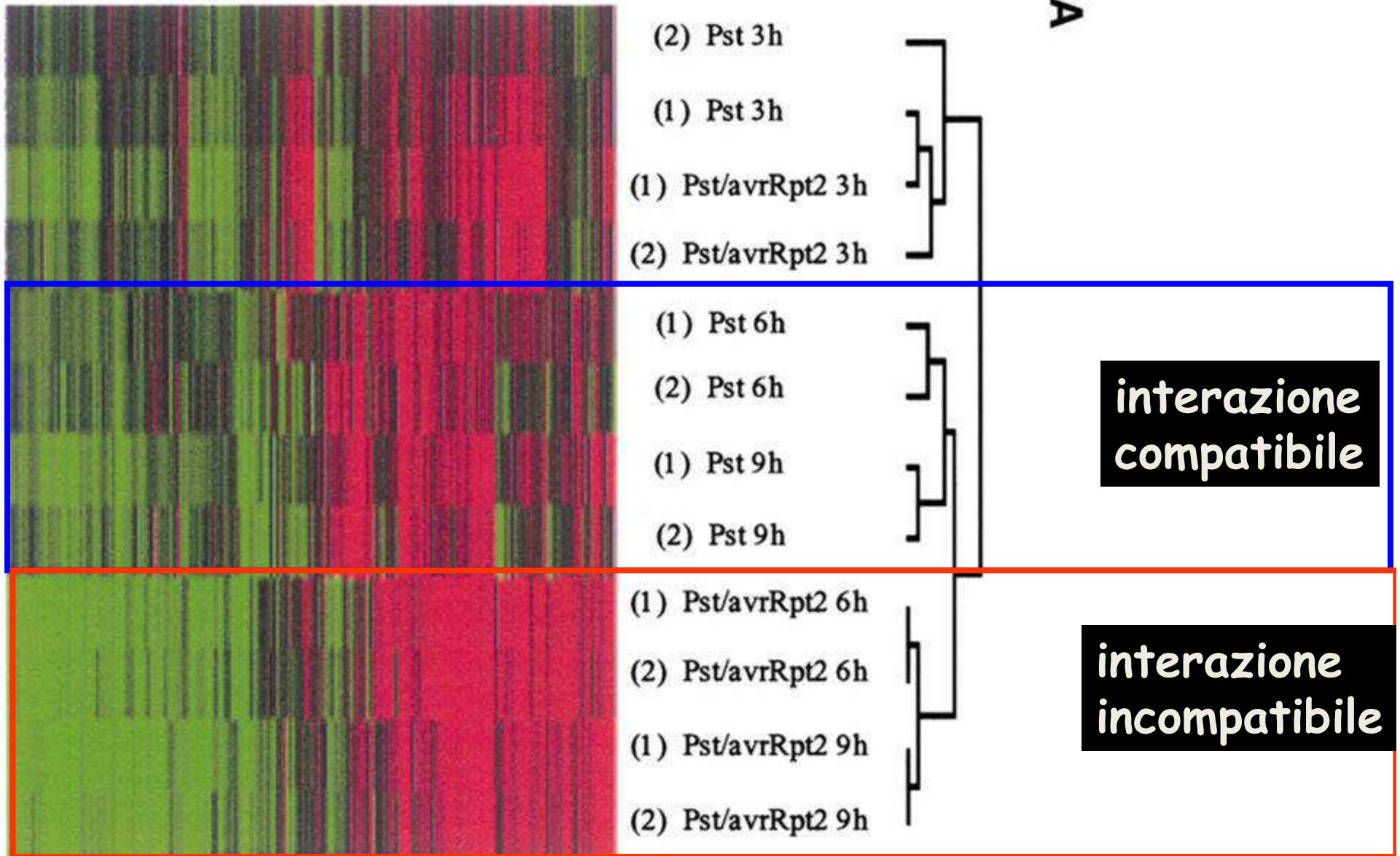
- Sviluppati algoritmi matematici per valutare somiglianze e differenze nel pattern di espressione a prescindere dal livello assoluto di espressione dei singoli geni



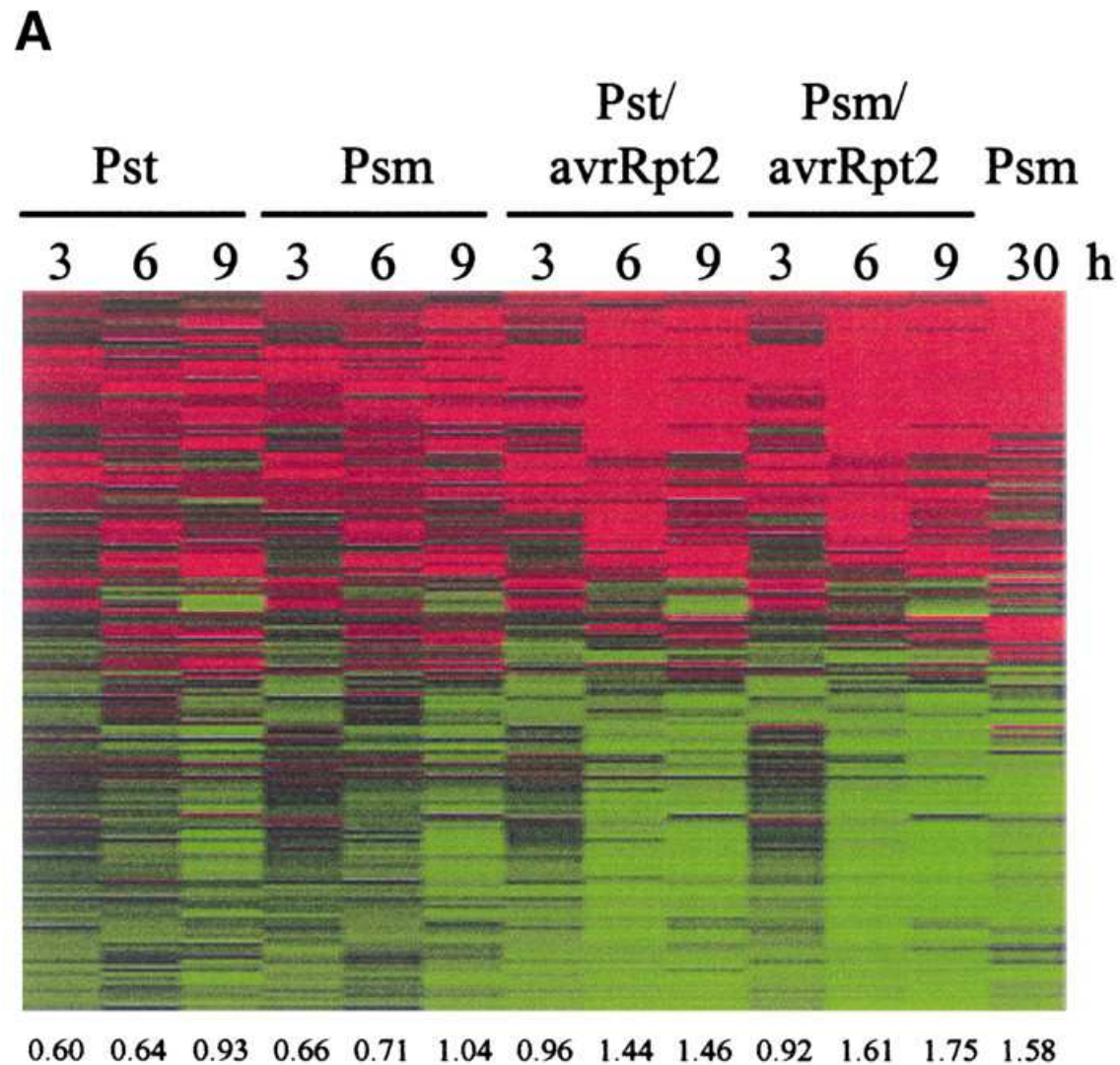
espressione > controllo



espressione < controllo



Le risposte indotte tardi durante la reazione compatibile sono simili a quelle indotte precocemente nell'interazione incompatibile



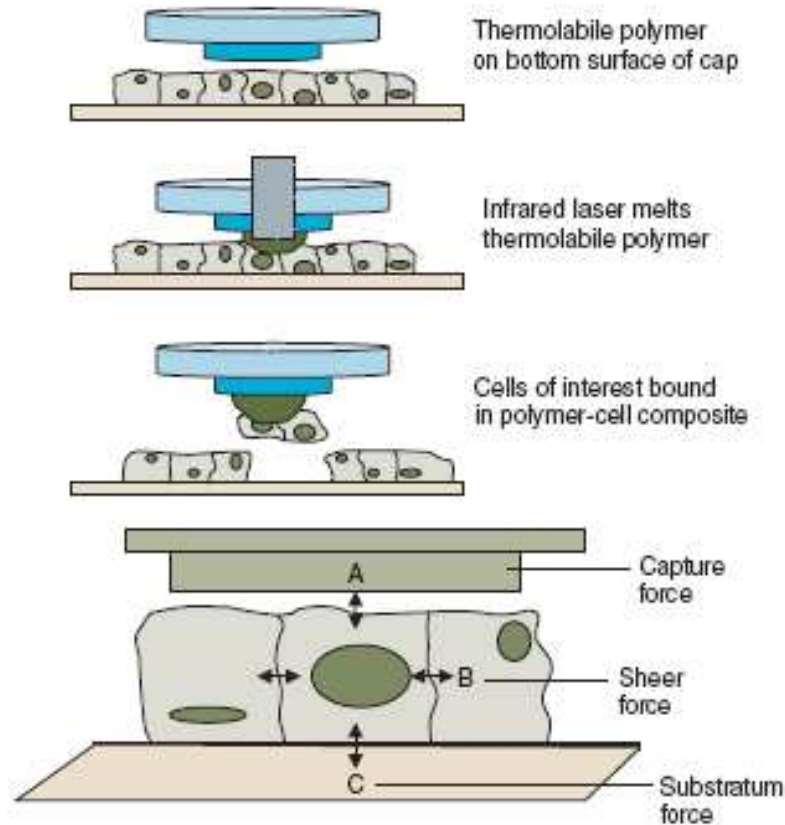
Analisi del profilo trascrizionale indotto da Psp (resistenza non ospite) ha dato risultati simili a quelli osservati durante la reazione incompatibile dovuta a resistenza gene-per-gene.

Il livello medio di induzione o repressione genica è apparso però più basso.

CONCLUSIONI

- Le differenze a livello di espressione genica tra risposta compatibile ad incompatibile sono quantitative, ma non qualitative
- Simili risposte si osservano più velocemente nella risposta incompatibile che in quella compatibile
- Risposte indotte durante la risposta incompatibile mediata da RPS2 ed RPM1 o durante l'interazione non-ospite sono simili

LCM: LASER CAPTURE MICRODISSECTION



- Visualizzazione delle cellule di interesse mediante un microscopio a luce invertita
- Trasferimento dell' energia del laser ad un polimero termolabile con formazione di un complesso polimero-cellula (sistema IR) o fotovolatilizzazione delle cellule che circondano l'area selezionata (sistema UV)
- Rimozione delle cellule di interesse dalla sezione di tessuto eterogeneo rimuovendo la pellicola
- Lo strumento è interfacciato con tubi da centrifuga in cui le cellule vengono recuperate per ulteriori analisi

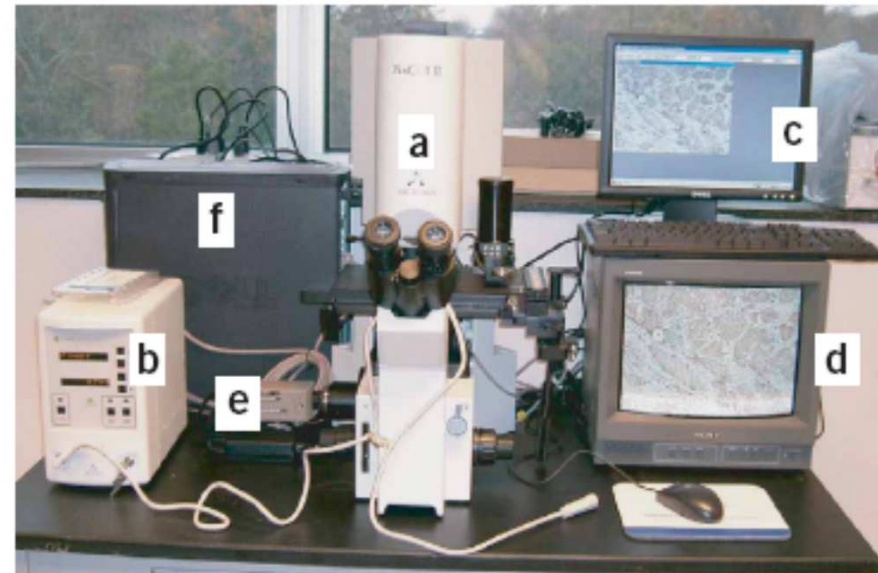
DIVERSI TIPI DI STRUMENTI LCM

SISTEMI CON RAGGIO IR

SISTEMI CON RAGGIO UV

SISTEMI COMBINATI IR/UV

Esistono sistemi manuali (es. PixCell) o automatizzati (es. AutoPix) che utilizzano software che forniscono supporto nel riconoscimento morfologico dei diversi tipi cellulari



LCM in pianta

- Se i tessuti vegetali sono congelati prima del fissaggio i grandi cristalli di ghiaccio tra i tessuti e le cellule danneggiano la morfologia delle cellule
- le cellule vegetali sono connesse da una rigida parete vegetale che le costringe a rimanere attaccate alle altre cellule durante l' LCM
- per risolvere questi problemi trattamento delle cellule vegetali con agente crioprotettore sotto vuoto prima del congelamento
- Plasmolisi per evitare contaminazione con cellule non di interesse

LCM e amplificazione dell'RNA

Utilizzo di due tipi di fissanti chimici per preservare i tessuti:

•fissativi coagulanti (alcol, acetone...)



Migliore resa di RNA

75% etOH 25% acido acetico

•fissanti cross-linking

37-40% formaldeide, 95% alcol etilico
(10%:5%:50%)



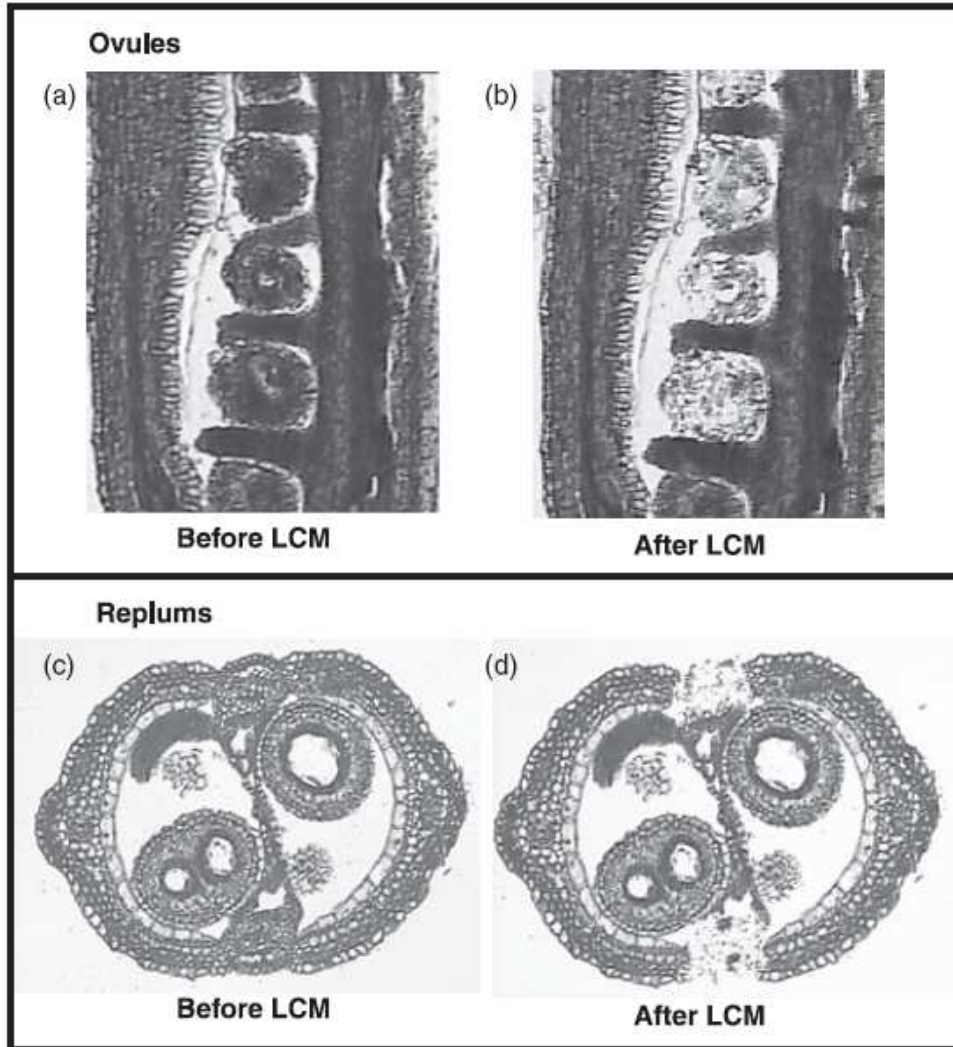
Migliore morfologia dei tessuti

Laser capture microdissection of plant cells from tape-transferred paraffin sections promotes recovery of structurally intact RNA for global gene profiling

Plant Journal 48, 628, 2006

*Protocollo modificato di **LCM** basato su fissazione con paraffina per ottenere una maggiore resa e qualità dell'mRNA cellulare*

Tessuto in paraffina fissato con acido acetico ed etanolo



LCM ovuli

LCM cellule del replo

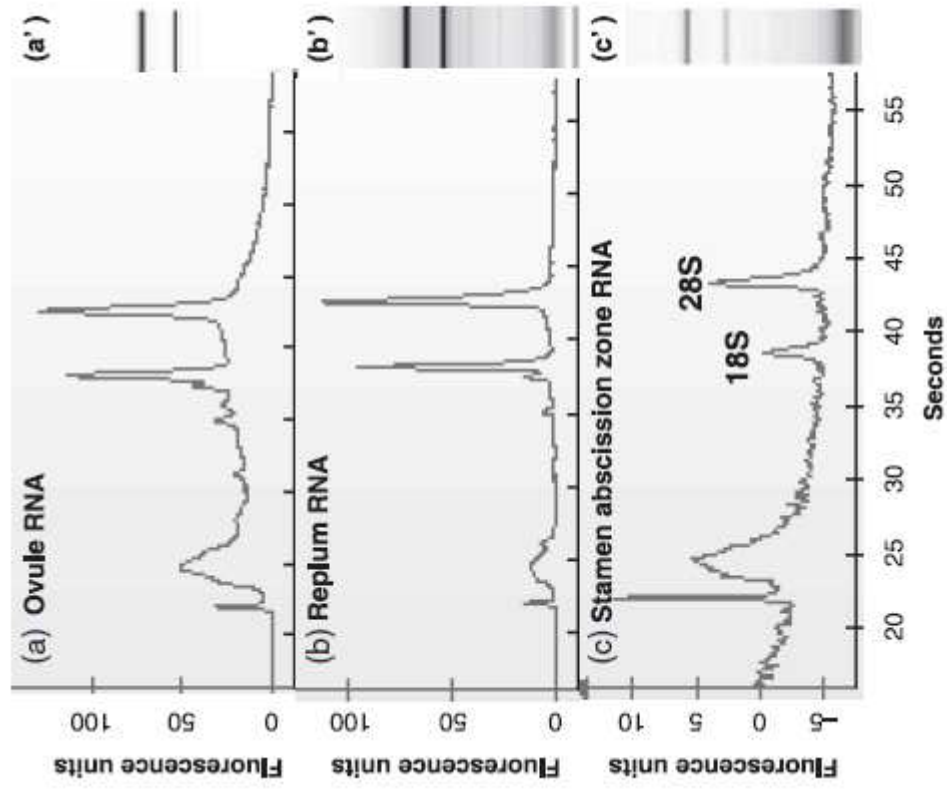
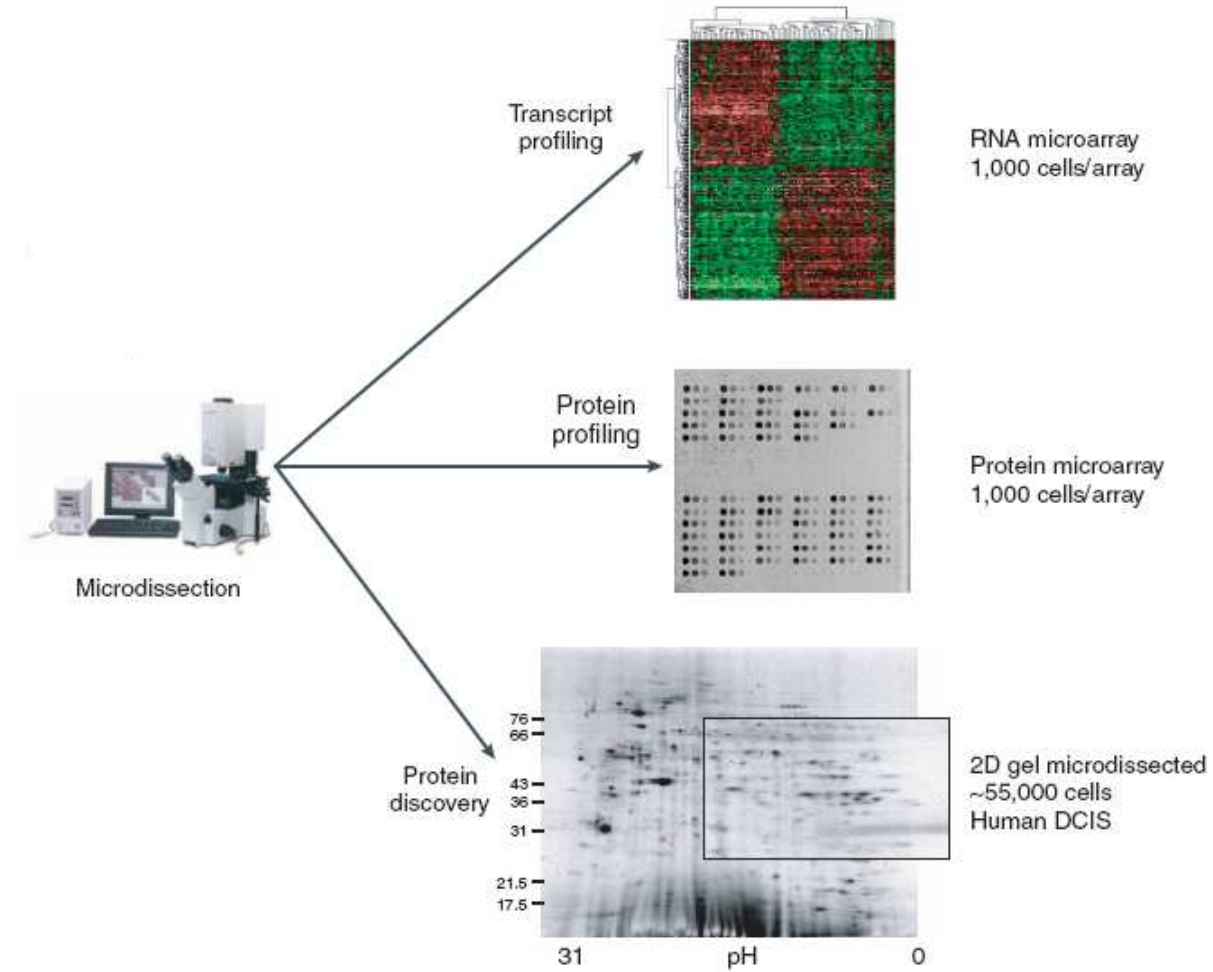


Figure 3. Qualitative assessment of RNA integrity from cells laser-captured from paraffin sections transferred to slides with tape.
 (a) Fluorescence profile and (a') gel-like image of total RNA from laser-captured ovules.
 (b, b') Total RNA from replums.
 (c, c') Total RNA from stamen abscission zones.

ANALISI SUCCESSIVE ALL' LCM



GENOMICS ARTICLE

Laser-Capture Microdissection, a Tool for the Global Analysis of Gene Expression in Specific Plant Cell Types: Identification of Genes Expressed Differentially in Epidermal Cells or Vascular Tissues of Maize^(W)

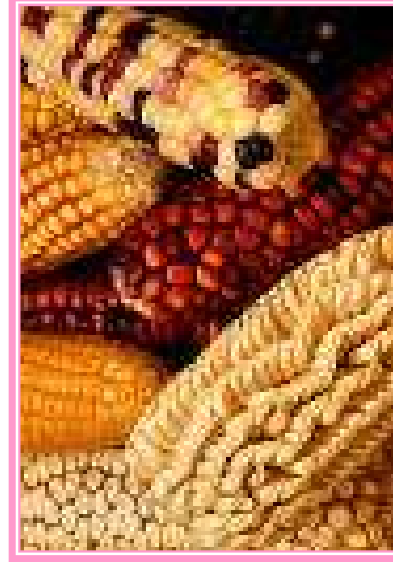
Mikio Nakazono,^{a,b,1} Fang Qiu,^{a,c,1} Lisa A. Borsuk,^d and Patrick S. Schnable^{a,c,d,2}

^aDepartment of Agronomy, Iowa State University, Ames, Iowa 50011

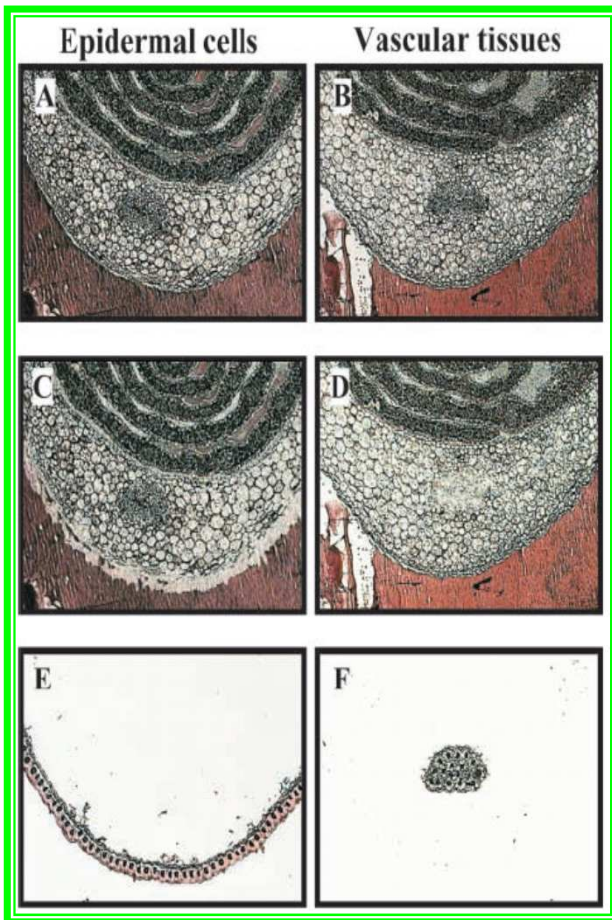
^bGraduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo, 1-1-1 Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8657, Japan

^cCenter for Plant Genomics, Iowa State University, Ames, Iowa 50011

^dDepartment of Zoology and Genetics, Iowa State University, Ames, Iowa 50011



LCM e amplificazione dell'RNA



Ottenuti 2 set di cellule epidermiche e vascolari contenenti ciascuno più di mille cellule portando a isolare circa 40 ng di RNA

Table 1. Yields of Amplified RNA from Laser-Captured Maize Coleoptile Cells

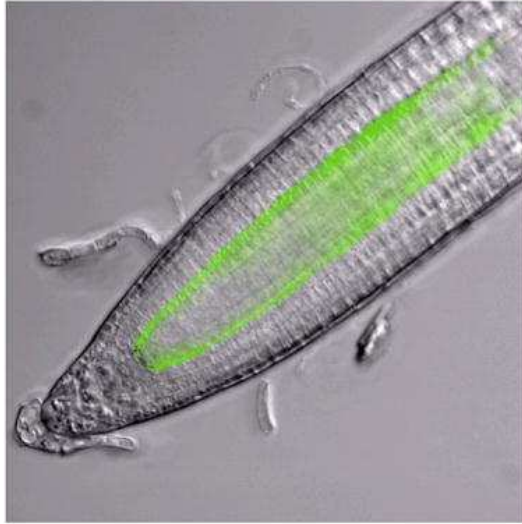
Experiment	Cell Source	Estimated No. of Captured Cells	RNA Yield (ng)	RNA per Cell (pg)	Second-Round Amplification	
					Yield (μ g)	Amplification ^a
1	Epidermis	11,100	39.5	3.56	24.5	$\times 62,000$
	Vascular tissues	11,700	43.0	3.67	46.9	$\times 109,000$
2	Epidermis	16,100	35.2	2.19	28.6	$\times 81,300$
	Vascular tissues	18,700	39.0	2.08	25.4	$\times 65,100$

^a Calculated based on the assumption that poly (A⁺) RNA is 1% of total RNA (Sugiura and Takeda, 2000).

QUANTE CELLULE SONO NECESSARIE?

Molecule	Methodology/assay	Cellular yield/area of microdissection
DNA	Loss of heterozygosity	100–1,000 cells
DNA	Imprinting/DNA methylation	200 cells
gDNA	Genetic mosaic analysis	2,000 cells
RNA	cDNA library construction	25,000 cells (93 ng total RNA)
		5,000 cells (14.7–18.6 ng total RNA)
RNA	Gene-expression arrays	100 cells from FFPE
RNA	Real-time RT-PCR	1,400 cells
		0.8–1.0 × 10 ⁶ μm ²
		200 and 1,000 cells
		22,000 cells/37.5 ng RNA
		10,000 cells/40 ng RNA from maize
		single cell
RNA	QRT-PCR	100 cells/1 reaction or 2,000 cells/200 μl
		4,000–5,000 cells
Protein	Western blot	500 cells (optimized blotting procedure)
		2,500 cells
		8,000–10,000 cells
Protein	2D gel electrophoresis	50,000–100,000 cells
		3.7 mm ² area
		10,000 cells (100–200 μg in 350 μl)
		20,000–25,000 cells
		50,000 cells
Protein	2D-DIGE	30,000 cells/40 μl
Protein	Molecular profiling: reverse-phase protein microarray	5,000–30,000 cells
Protein	Mass spectrometry: MALDI or LC/MS-MS	50,000–100,000 cells (ICAT and LC/MS)
		10,000–15,000 cells
		25,000 μm ²
		300 microvessels
Protein	Mass spectrometry: SELDI	1,500 cells
		3,000–5,000 cells

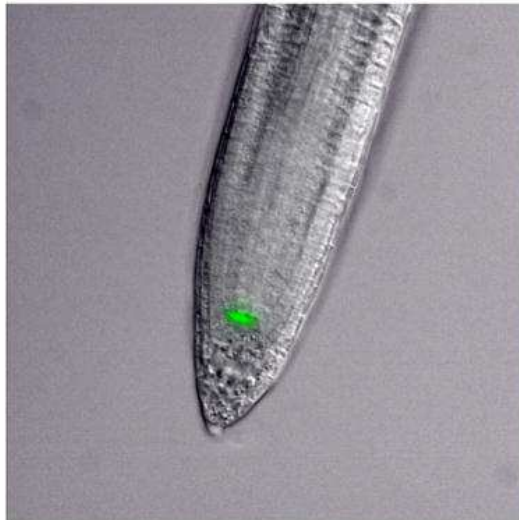
1a



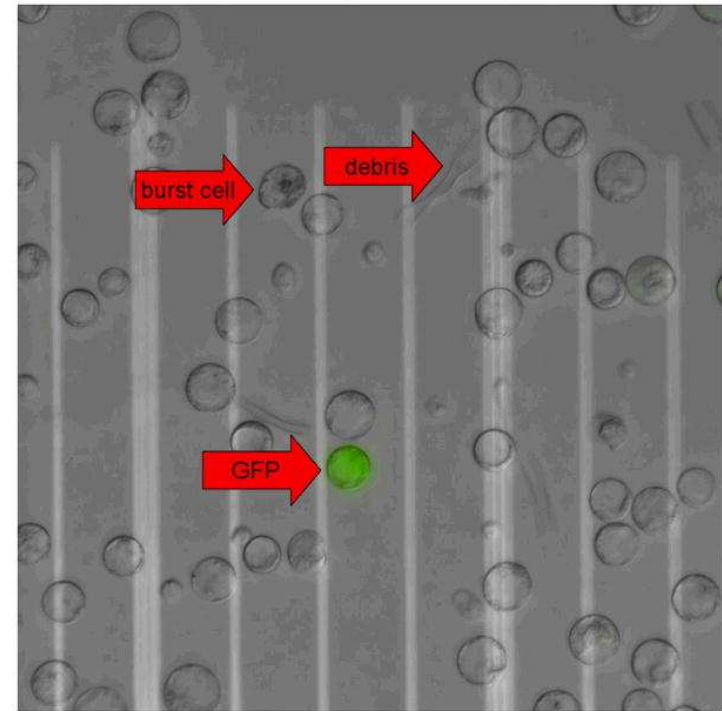
Cell type-specific GFP marker lines in the *Arabidopsis* root

- a) $P_{SCR}::GFP$
- b) $P_{WOX5}::GFP$

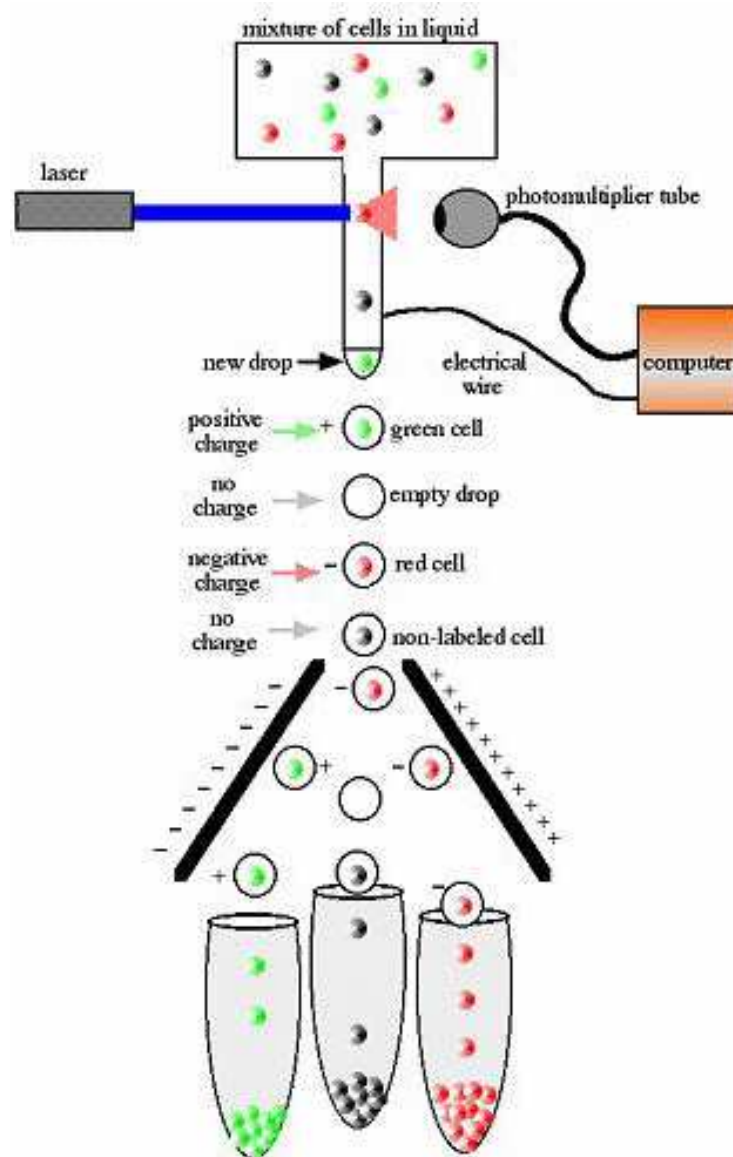
1b



Protoplasting



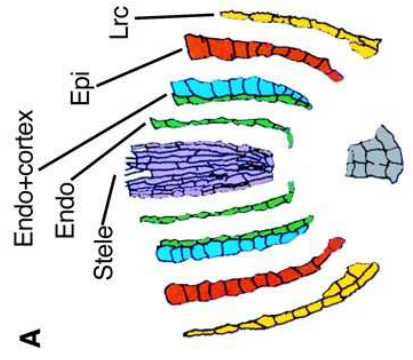
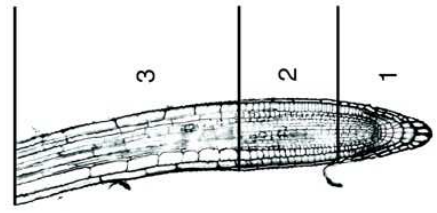
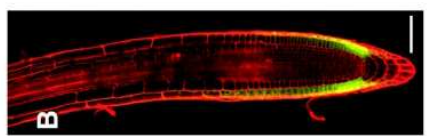
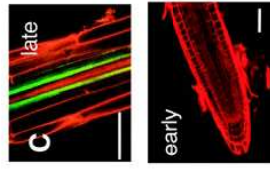
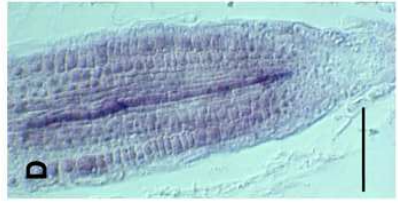
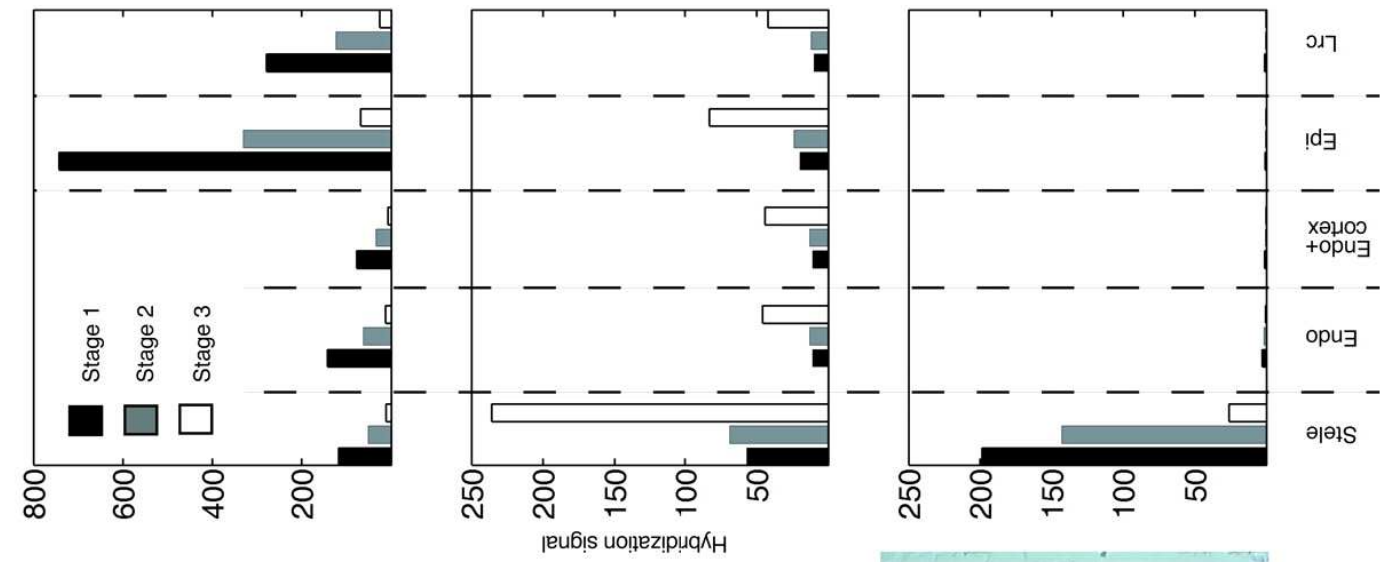
FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTING (FACS)



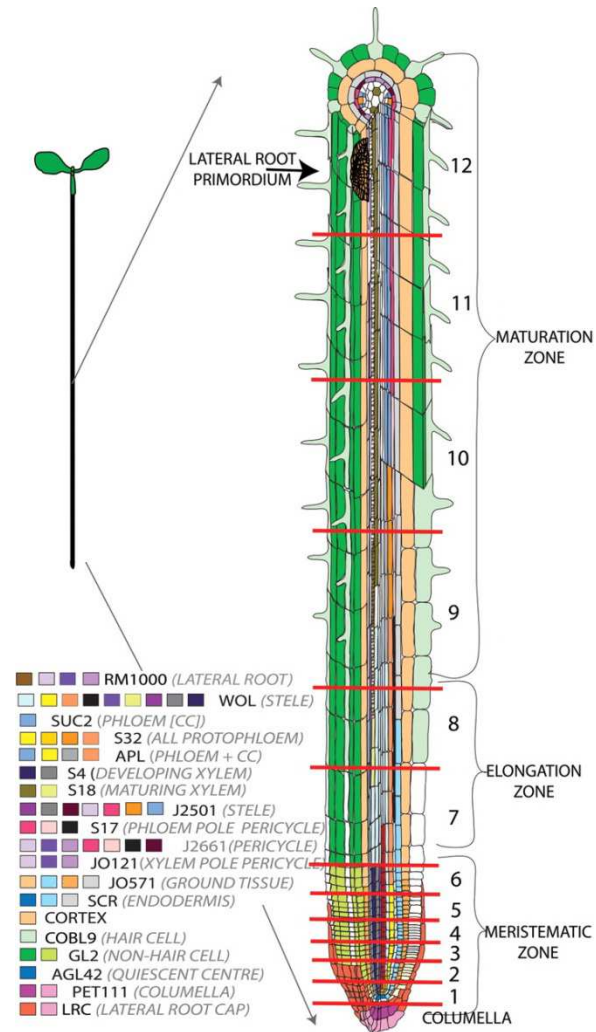
A Gene Expression Map of the *Arabidopsis* Root

Kenneth Birnbaum,¹ Dennis E. Shasha,² Jean Y. Wang,³
Jee W. Jung,¹ Georgina M. Lambert,⁴ David W. Galbraith,⁴
Philip N. Benfey^{3*}

12 DECEMBER 2003 VOL 302 SCIENCE www.sciencemag.org

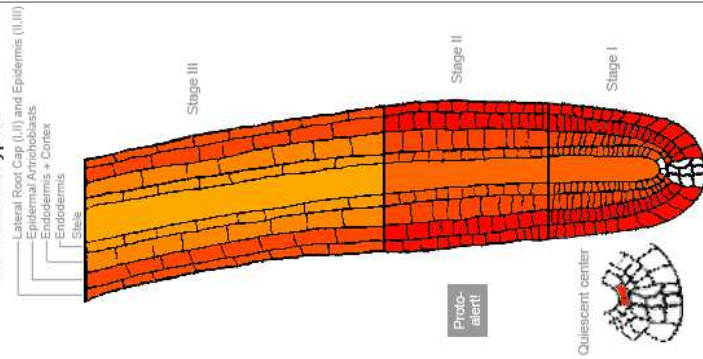


Microarray expression profiles of 19 fluorescently sorted GFP-marked lines were analyzed



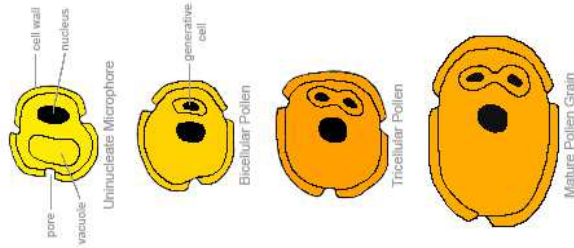
S M Brady et al. Science 2007;318:801-806

Root Cells Types



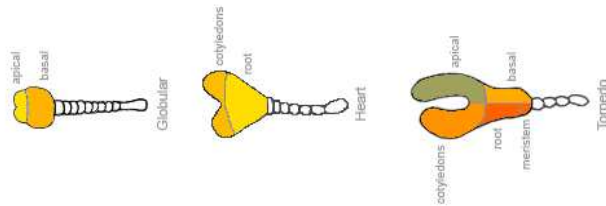
- Material from the roots of 6 day old wild-type Col-0 *Arabidopsis thaliana* plants was analyzed
- Plants grown under 16/8 hour light/dark conditions on MS + 4.5% sucrose media
- Root cell types were isolated by protoplasting and fluorescence-activated cell sorting. RNA was extract-

Microgametogenesis (Pollen Development)



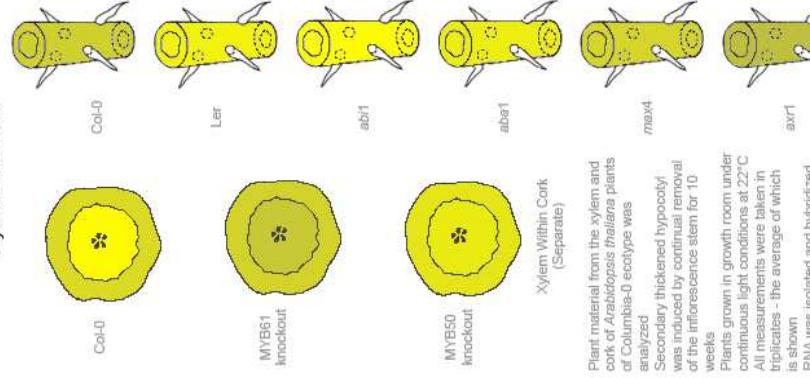
- Plant material from the pollen of 5, 10 growth stage wild-type *Arabidopsis thaliana* plants of Ler-0 ecotype was analyzed
- Plants grown under 16/8 hour light/dark conditions at 21°C
- All measurements were taken in triplicates - the average of which is shown

Embryo Development



- Plant material from embryos of wild-type Col-0 *Arabidopsis thaliana* plants of was isolated by laser capture microdissection
- Plants grown under 16/8 hour light/dark conditions
- RNA was amplified and hybridized to the ATH1 GeneChip. Note: 3' bias! is shown

Xylem and Cork



- Plant material from the xylem and cork of *Arabidopsis thaliana* plants of Columbia-0 ecotype was analyzed
- Secondary thickened hypocotyl was induced by continual removal of the inflorescence stem for 10 weeks
- Plants grown in growth room under continuous light conditions at 22°C
- All measurements were taken in triplicates - the average of which is shown

LIMITI DELLA TRASCRITTOMICA

- Un gene può codificare per più proteine (modificazioni post-trascrizionali)
- I livelli di trascritto non sempre corrispondono ai livelli di proteina
- L'attività delle proteine è regolata a diversi livelli (es. fosforilazione, ubiquitinazione, legame di cofattori...)

Altri approcci: proteomica, metabolomica...