



Università di Pisa

Utilizzo dei microarray per lo studio
dell'espressione genica e della variabilità genetica
individuale

Silvia Pellegrini, Erika Melissari

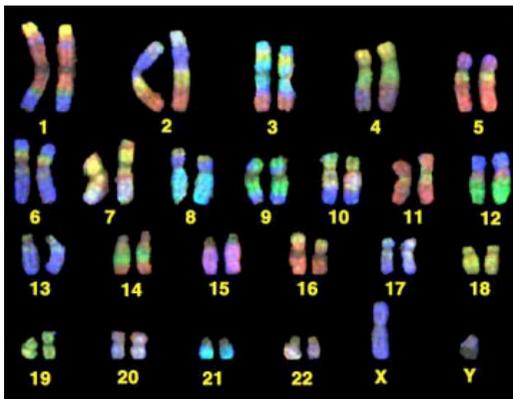
Dipartimento di Patologia Sperimentale, BMIE
Laboratorio Microarray



Genoma

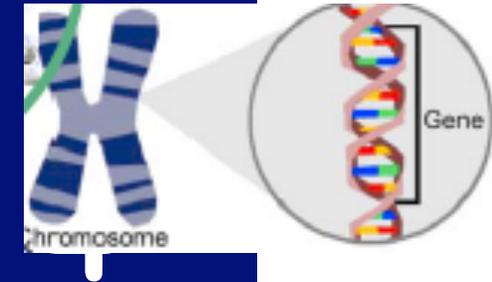
L'insieme di tutte le molecole di DNA presenti nel nucleo di ogni cellula

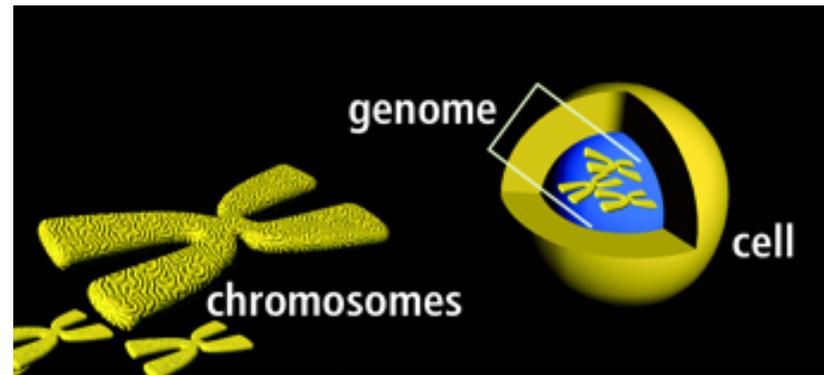
Nell'uomo: 44 cromosomi autosomici
2 cromosomi sessuali



Il contenuto di
informazioni del DNA
umano è dato
dall'alternanza di
lettere

A, G, T, C





DNA → RNA → Proteine

In ogni istante della propria vita ogni cellula umana contiene:

- 20.000 geni
- 10-15.000 mRNA diversi
- >100.000 proteine diverse



Il codice genetico

GCA	AGA									UUA					AGC						
GCC	AGG						GGA		AUA	UUG				CCA	AGU	ACA				GUA	
GCG	CGA						GGC	AUA	AUC	CUA				CCC	UCA	ACC				GUC	UAA
GCU	CGC	GAC	AAC	UGC	GAA	CAA	GGG	CAC	AUC	CUC	AAA		UUC	CCG	UCG	ACG	UAC			GUG	UAG
	CGU	GAU	AAU	UGU	GAG	CAG	GGU	CAU	AUU	CUU	AAG	AUG	UUU	CCU	UCU	ACU	UGG	UAU		GUU	UGA
Ala	Arg	Asp	Asn	Cys	Glu	Gln	Gly	His	Ile	Leu	Lys	Met	Phe	Pro	Ser	Thr	Trp	Tyr	Val	stop	
A	R	D	N	C	E	Q	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V		



Trascrittoma

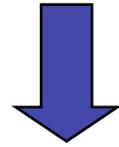
Insieme degli RNA messaggeri che la cellula sta esprimendo

Proteoma

Collezione completa delle proteine che la cellula sta esprimendo



Analisi del trascrittoma



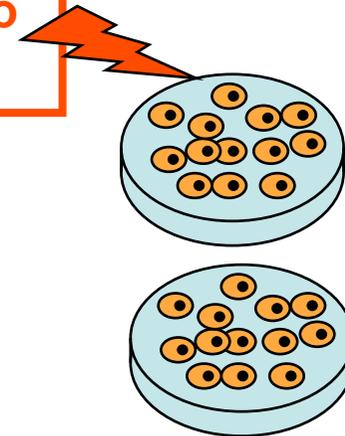
analisi dei profili globali di
espressione genica a livello di
mRNA



Espressione genica differenziale: valuta le differenze nell'espressione genica tra due trascrittomi

cellule trattate con un composto
esogeno a confronto
con cellule non trattate

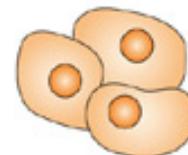
Composto
esogeno



un tessuto tumorale
a confronto
con uno sano



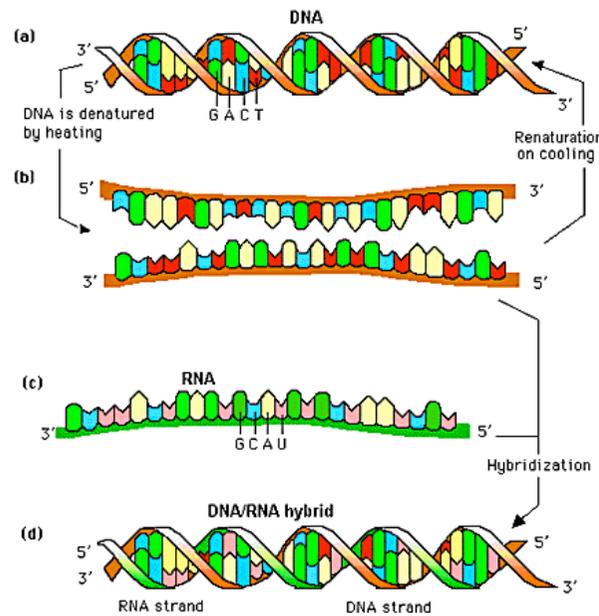
Normal cells



Tumour cells

Tecnologia dei microarray

Sfrutta la capacità di una data molecola di mRNA di ibridizzare con il DNA stampo da cui è stata generata



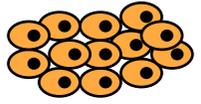
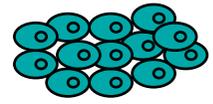
<http://www.accessexcellence.org/AB/GG/nucleic.html>

Nucleic Acid Hybridization



campione

controllo



RNA



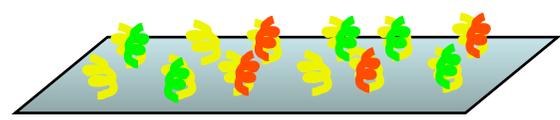
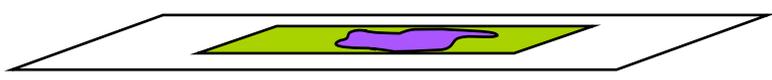
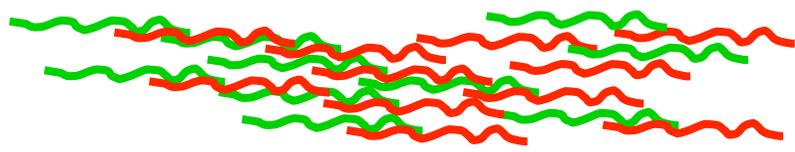
Cy5



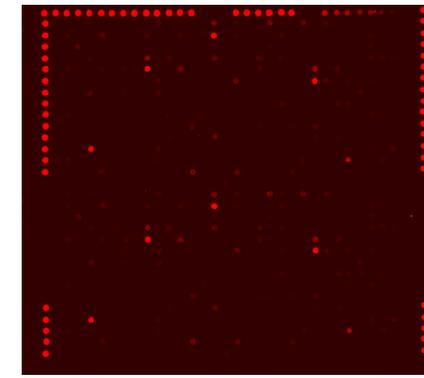
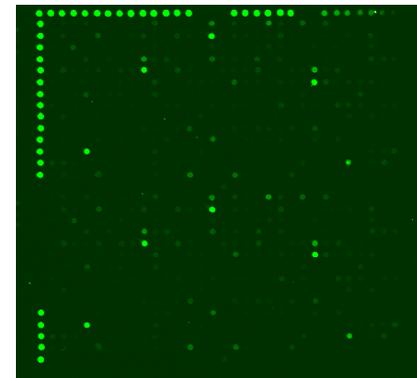
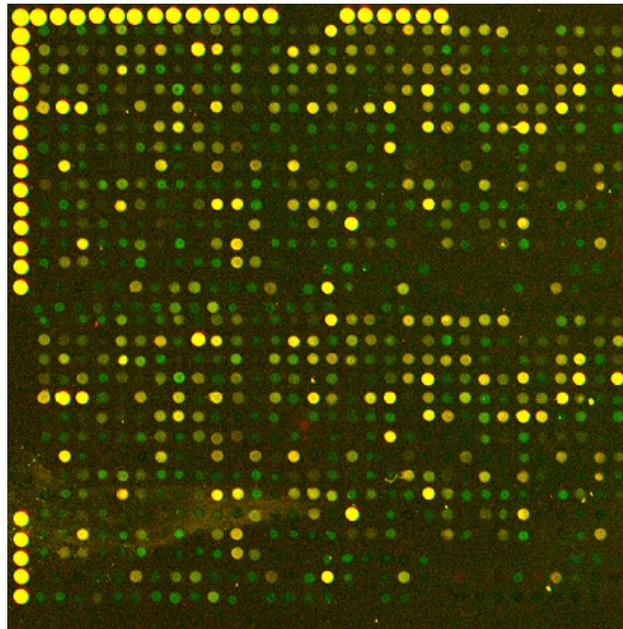
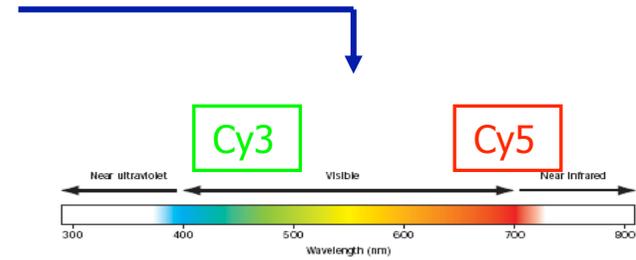
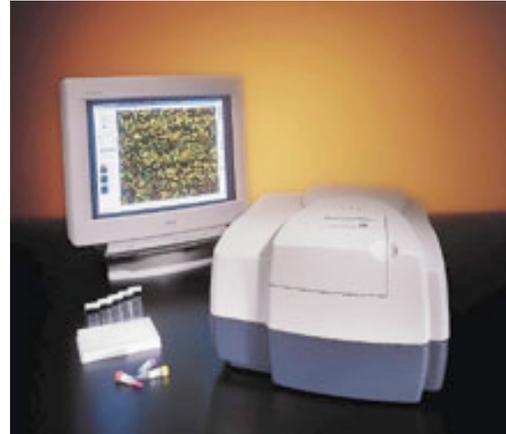
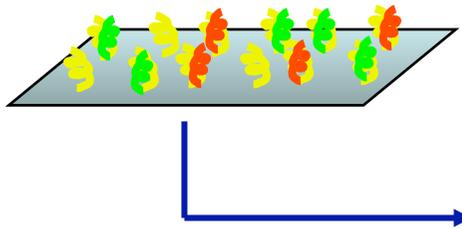
cDNA



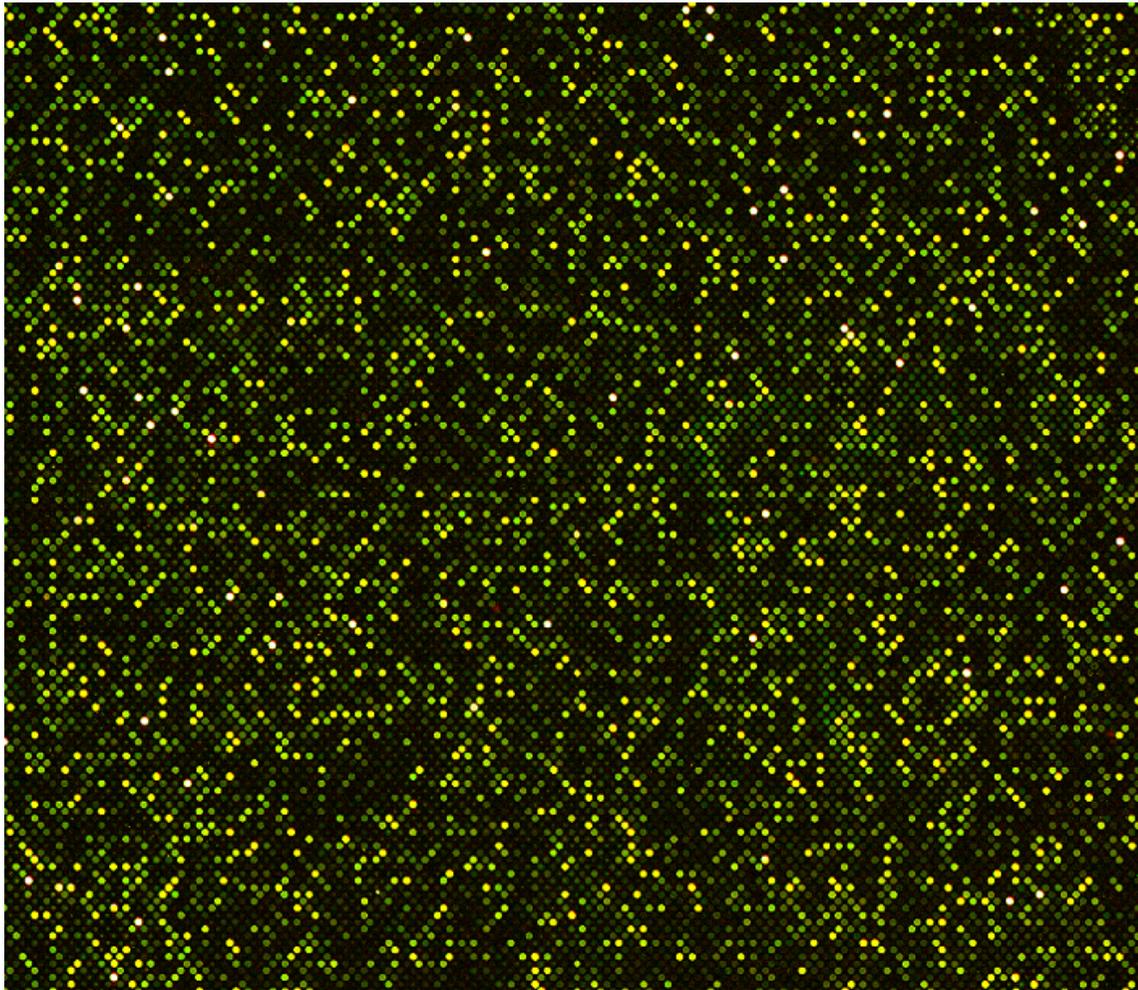
Cy3



Acquisizione dell'immagine mediante scanner



Microarray ad oligonucleotidi Agilent Whole Genome



Human

44k 60meri sintetizzati
sul vetrino mediante ink-
jetting

41000 trascritti

Rat

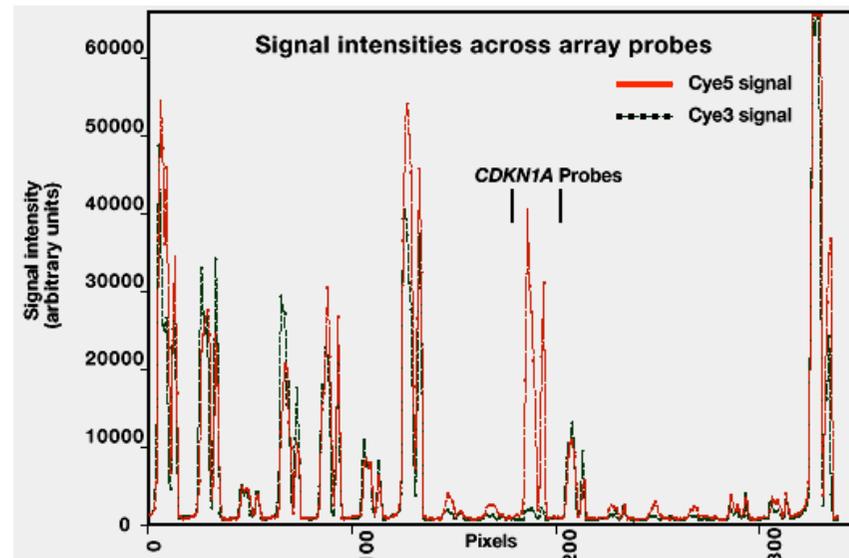
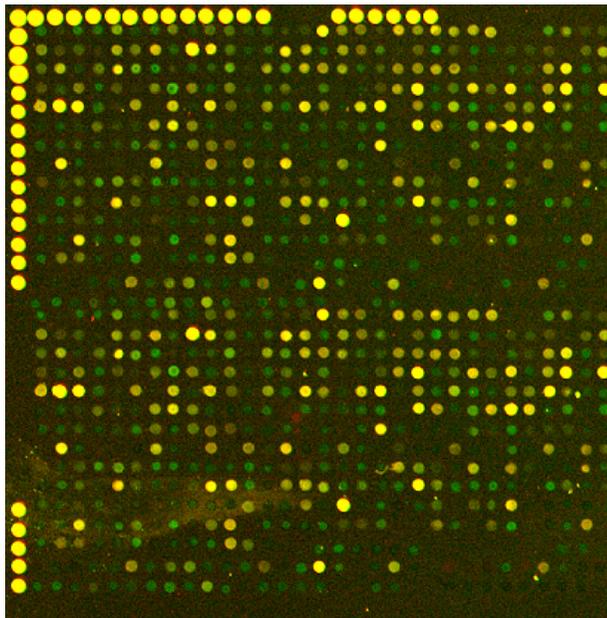
44k 60meri
41000 trascritti

Yeast (*S. cerevisiae*)

2x44k 60meri
6256 trascritti



L'intensità della fluorescenza è proporzionale alla quantità di molecola target nella soluzione e, quindi, costituisce una stima della quantità di RNA espresso dalla cellula.

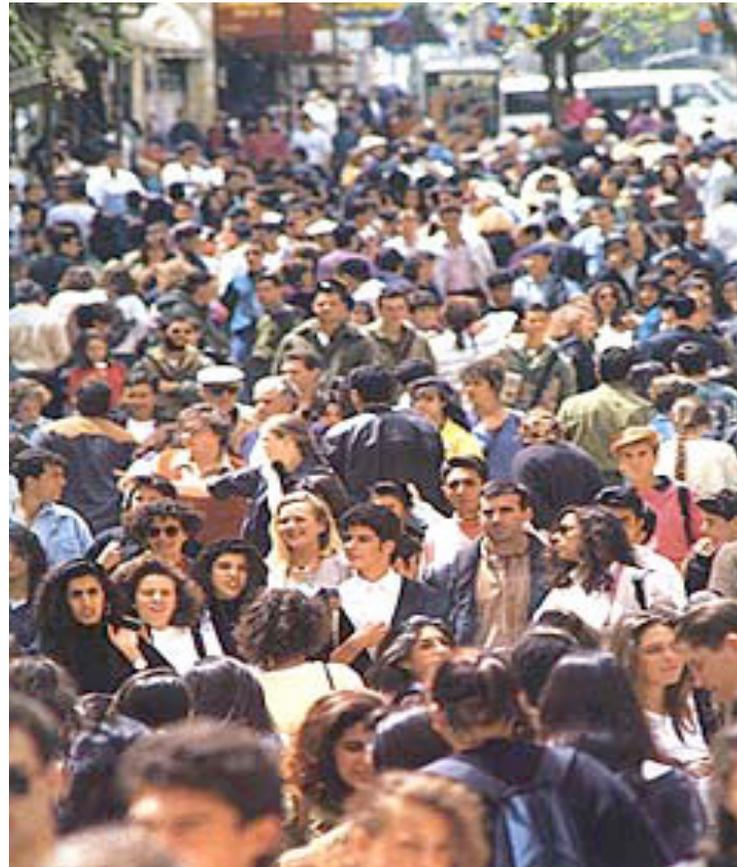


A caccia di geni nell'uomo

Ricerca di alleli di suscettibilità su geni candidati



Non siamo tutti uguali...



Non esiste un'unica sequenza
del genoma umano, ma
più di 10 milioni dei 3 miliardi di
paia di basi

che compongono il genoma
umano variano da individuo a
individuo e costituiscono dei
polimorfismi genetici.



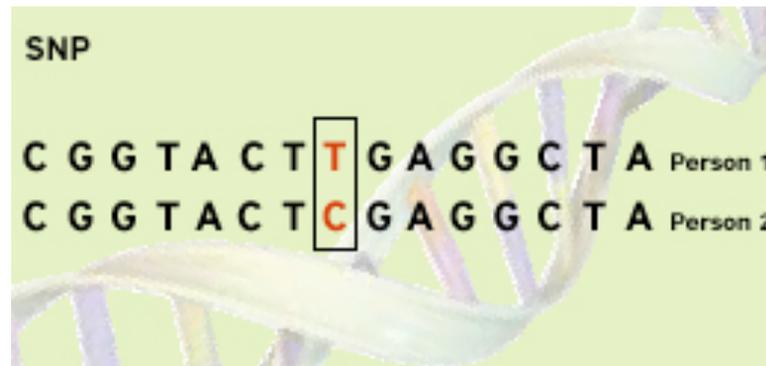
Polimorfismi genetici

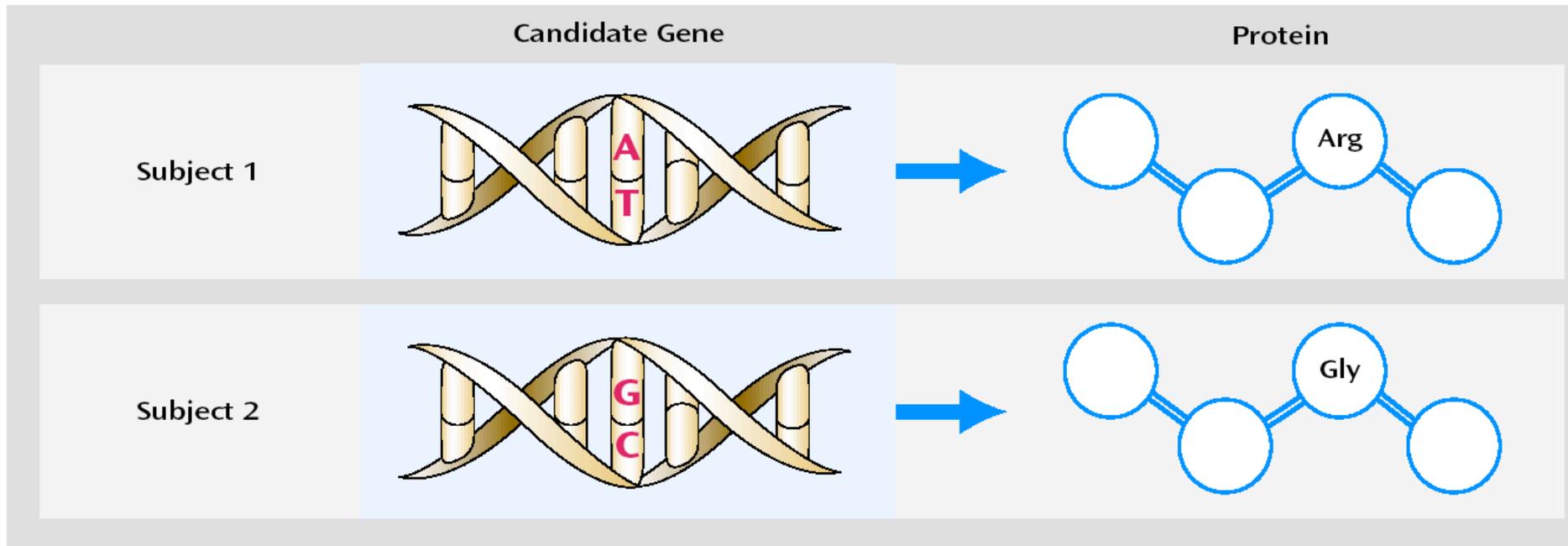
Forme alleliche diverse di una stessa sequenza presenti in più dell'1% degli individui di una popolazione

SNP

(Single Nucleotide Polymorphism)

Polimorfismi a singolo nucleotide
ovvero cambiamenti di una base





Variazioni di una base nella regione codificante di un gene portano ad un'alterazione della sequenza aminoacidica della proteina corrispondente con possibile cambiamento funzionale



I polimorfismi possono essere responsabili di una diversa suscettibilità alle malattie...



...come pure della variabilità
individuale nella risposta alla
terapia farmacologica



I polimorfismi rappresentano
fattori di suscettibilità, ciascuno
dei quali contribuisce in una certa
misura al fenotipo



Come si fa ad identificare gli
alleli di suscettibilità?



studi di associazione casi-controlli

Popolazione con malattia



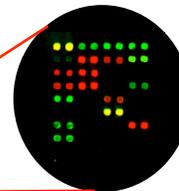
ATTGCATGCCAGTAGG

Popolazione senza malattia

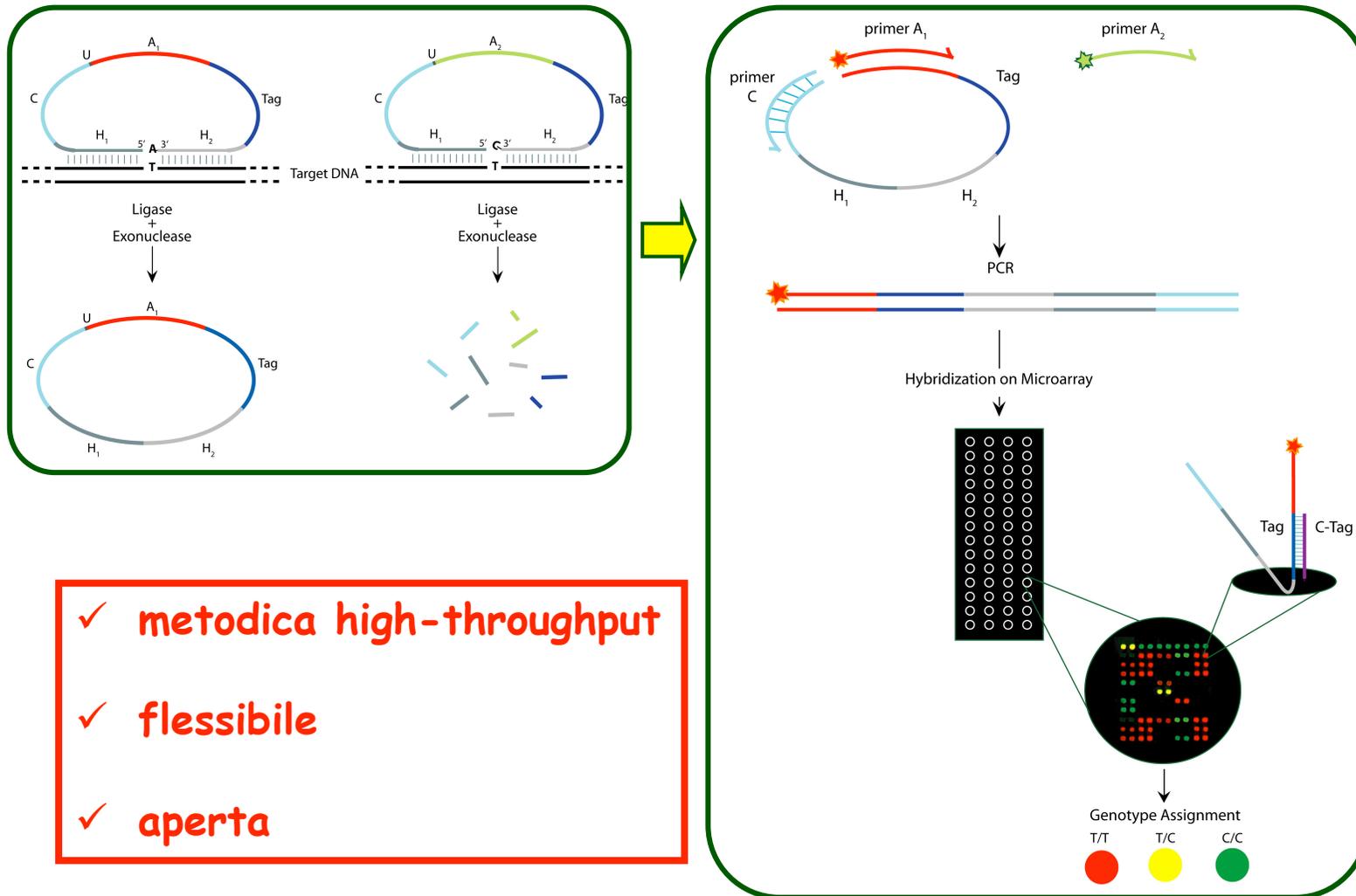


TATGATTGCCGCTAGG

Genotipizzazione di
SNP in geni candidati



Molecular Inversion Probes (MIP) on tagged array-of-arrays



Trattamento con antidepressivi

solo il 60-65% dei pazienti risponde al trattamento con i farmaci antidepressivi



il 35-40% dei pazienti non risponde e in alcuni casi si verificano reazioni avverse anche gravi



STEP DEL PROGETTO

>> Individuare **geni** candidati ad essere associati al metabolismo o al meccanismo di azione degli antidepressivi

PubMed

OMIM

>> Individuare **polimorfismi** su questi geni da utilizzare per lo studio di associazione

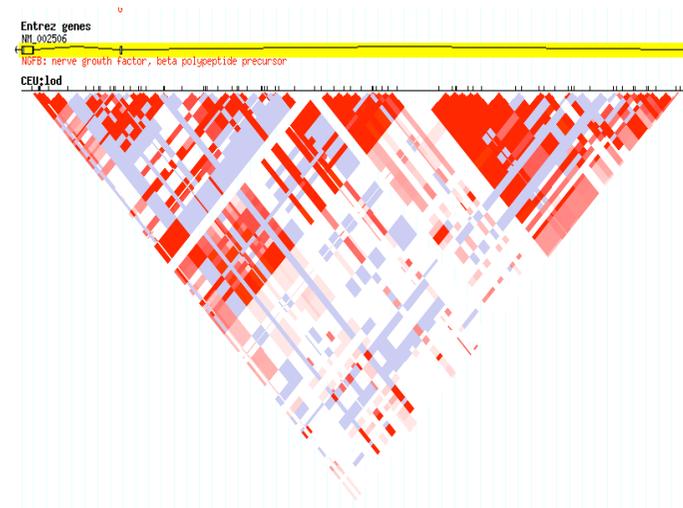
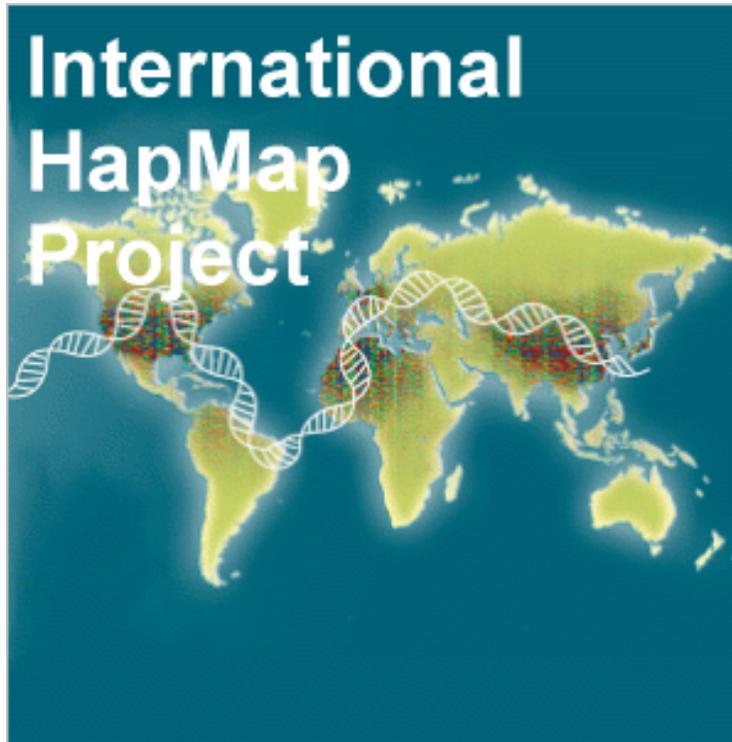
PubMed

SNP database NCBI

HapMap



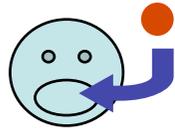
HapMap project



<http://www.hapmap.org>



Selezione dei geni candidati



Metabolismo epatico (4 geni)



Trasporto (1 gene)



Interazione con molecole bersaglio (9 geni)



Regolazione della sopravvivenza neuronale, neurogenesì e arborizzazione dendritica (7 geni)

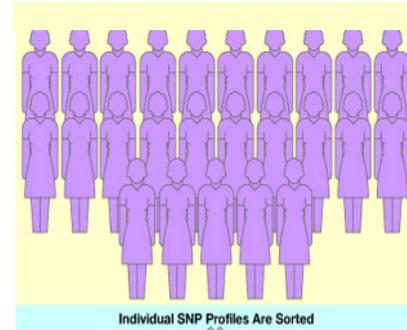
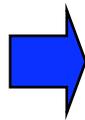
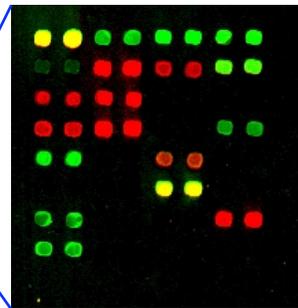
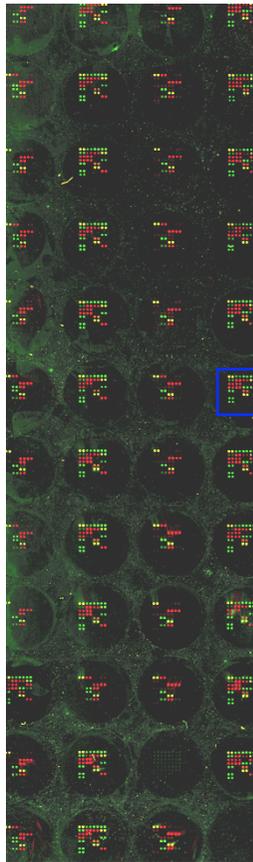


Array farmacocinetico (42 SNP)

Array farmacodinamico (100 SNP)



Creazione di un test molecolare



Individual SNP Profiles Are Sorted

