

Genoma umano: illusioni, realtà, prospettive

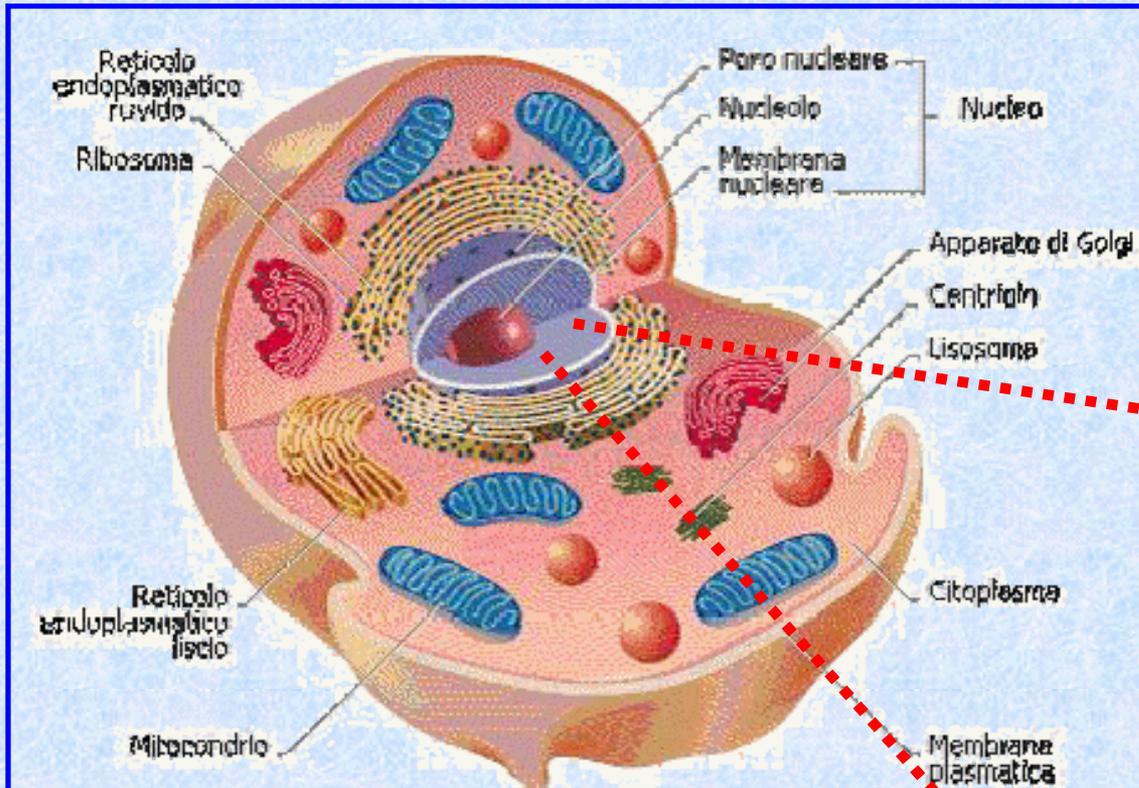
Giovedì 15 Marzo 2007 - ore 17.30

Istituto Veneto di Scienze, Lettere ed Arti - Venezia

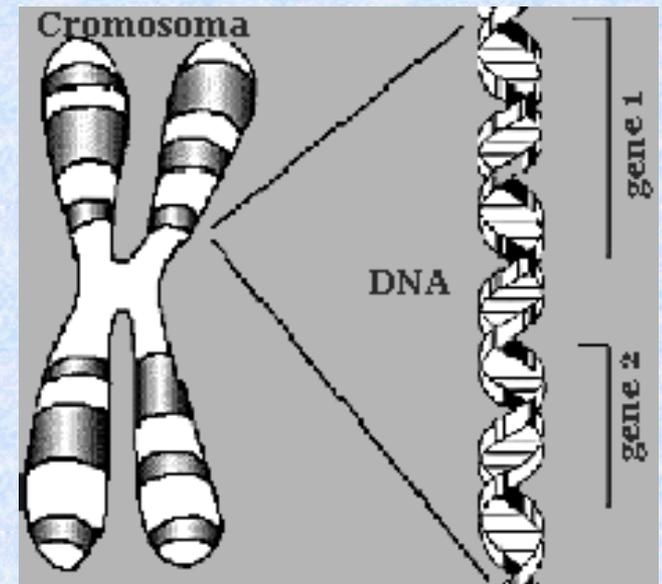
Giuseppe Borsani e Gerolamo Lanfranchi, coordina Fabio Pagan



Il flusso dell'informazione dai geni alle proteine



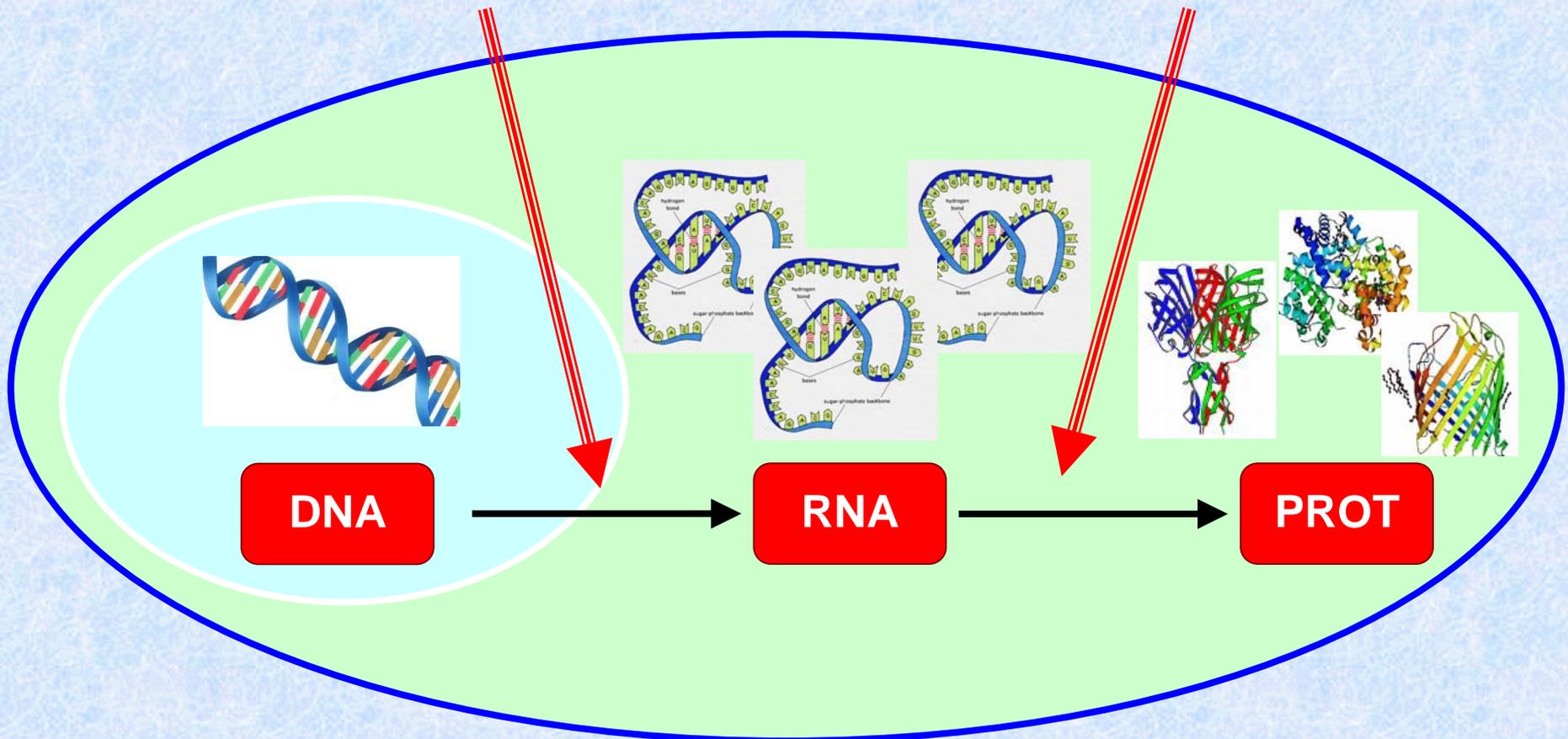
I geni stanno nel nucleo delle cellule (DNA, cromosomi)



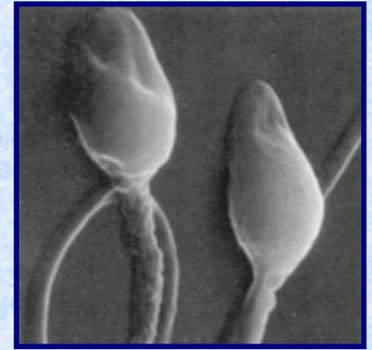
Il flusso dell'informazione dai geni alle proteine

L'informazione che ciascuno gene contiene viene copiata in molecole di RNA che escono nel citoplasma (TRASCRIZIONE)

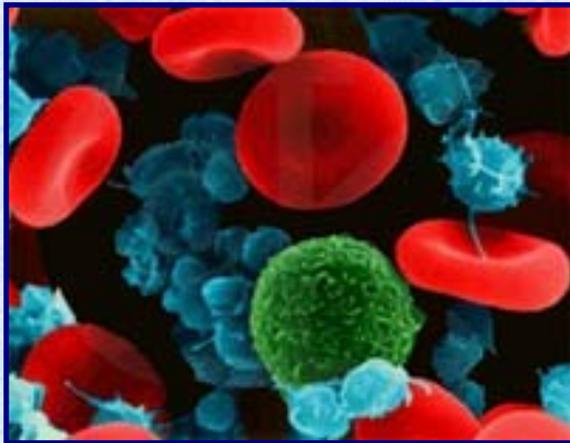
L'informazione della maggior parte degli RNA viene tradotta in proteine (TRADUZIONE)



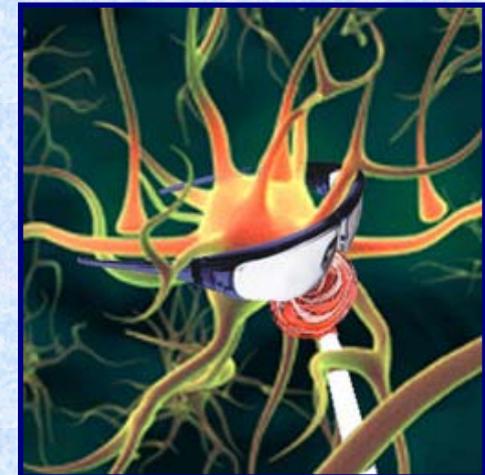
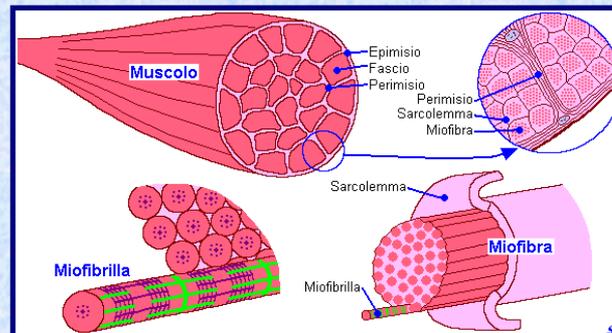
Il messaggio dei geni viene espresso negli RNA e proteine



Il corpo umano è composto da tantissimi tipi di cellule che fanno lavori molto diversi, ma pure contengono sempre gli stessi 25.000 geni.



Perché sono diverse?



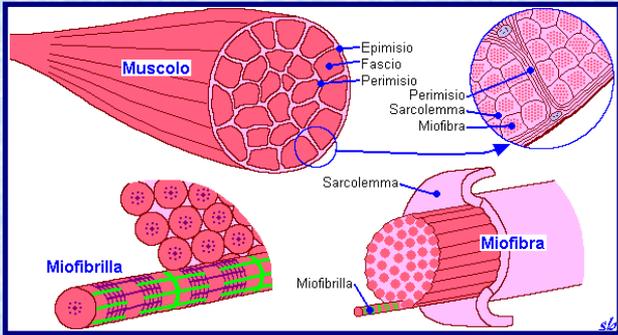
Dipende da quali geni vengono copiati (GENI ACCESI) e non vengono copiati (GENI SPENTI) in molecole di RNA e poi proteine

***Più precisamente:
dal livello di accensione dei 25.000 geni
ESPRESSIONE DIFFERENZIALE DEI GENI NELLE
CELLULE DEL CORPO UMANO***

La REGOLAZIONE dell'espressione genica nelle cellule:

- durante lo sviluppo, differenziamento, invecchiamento, morte***
- durante il lavoro***
- durante i cambiamenti patologici***

L'espressione differenziale dei geni nelle cellule

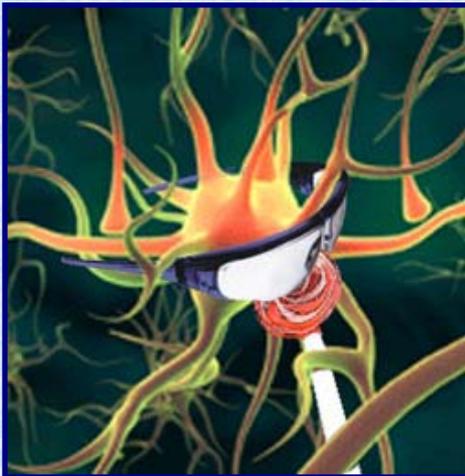


**Cellula del muscolo scheletrico
(miofibrilla):**

~ 10.000 geni accesi

Cellula del fegato (epatocita)

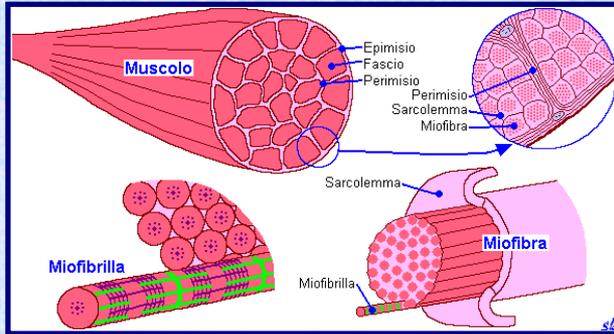
~ 15.000 geni accesi



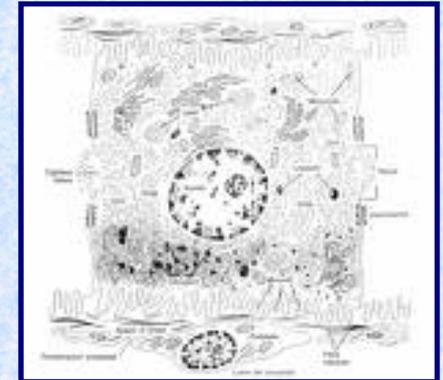
Cellula del cervello (neurone)

~ 20.000 geni accesi

L'espressione differenziale dei geni nelle cellule



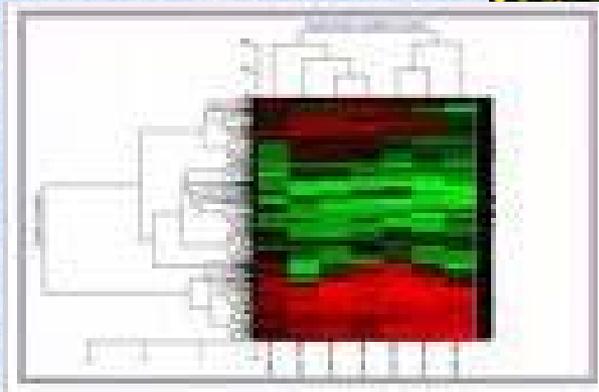
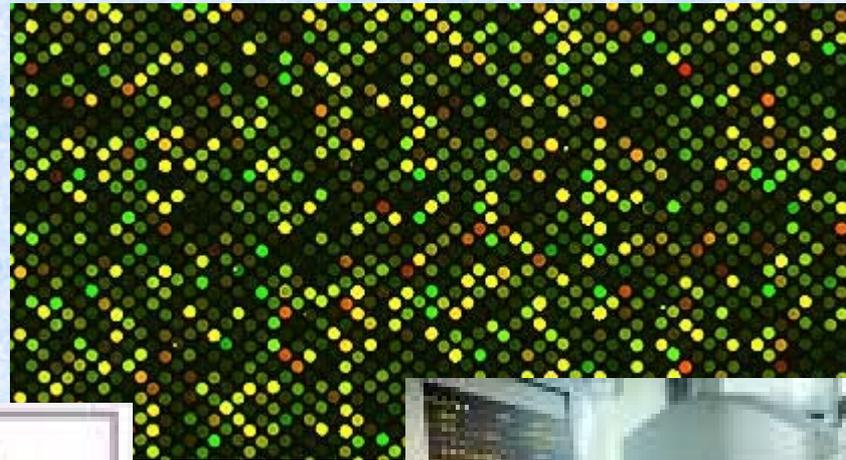
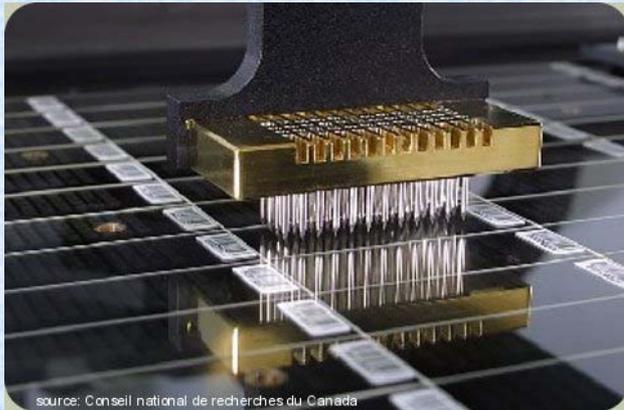
***Geni accesi in comune ma
con livelli d'espressione
diversi tra i tipi di cellule***



Studio dell'espressione genica globale

E' possibile conoscere, con un singolo test "semplice", quali sono i geni accesi in una cellula

TECNICA DEI MICROARRAY DI DNA



Studio dell'espressione genica globale

Grazie al sequenziamento del Genoma Umano sono state costruite collezioni di DNA sintetici corrispondenti a tutti i 25.000 geni umani.

Ciascuno di essi è un elica singola di DNA (SONDA) che può legare in modo specifico l'RNA (elica singola) derivato da uno specifico gene umano

gene 1 . . . CAGTCGTAGCTGATCGTCGTCGTCGGCTAGTCGTGATCGTCTT . . .

sonda 1 AGCAGCAGCCGATCAGCACTAG

gene 2 . . . GCTCGAGAGTCGTAGCCAGGCTTGCTGACCAGCCAGTCGATG . . .

sonda 2 GTCCGAACGACTGGTCGGGTCA

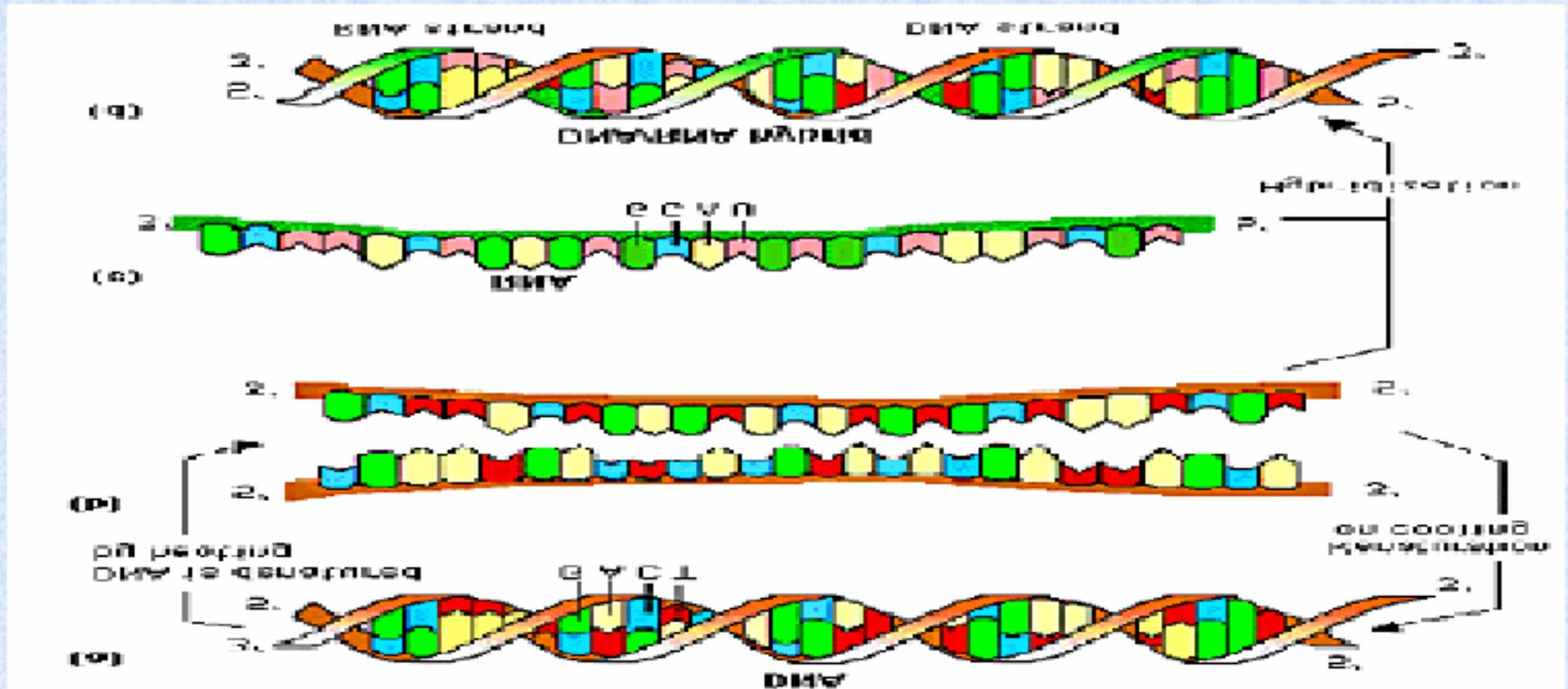
gene 3 . . . CTCGTAACCTGTCGTACGTCTGACCATGGTTGCACAAGCATTG . . .

sonda 3 GCAGACTGGTACCAACGTGTTT

gene N . . . TGTACTTACGTTTCGTTACGCTTCACGTTTCGGTGTCAACCATGT . . .

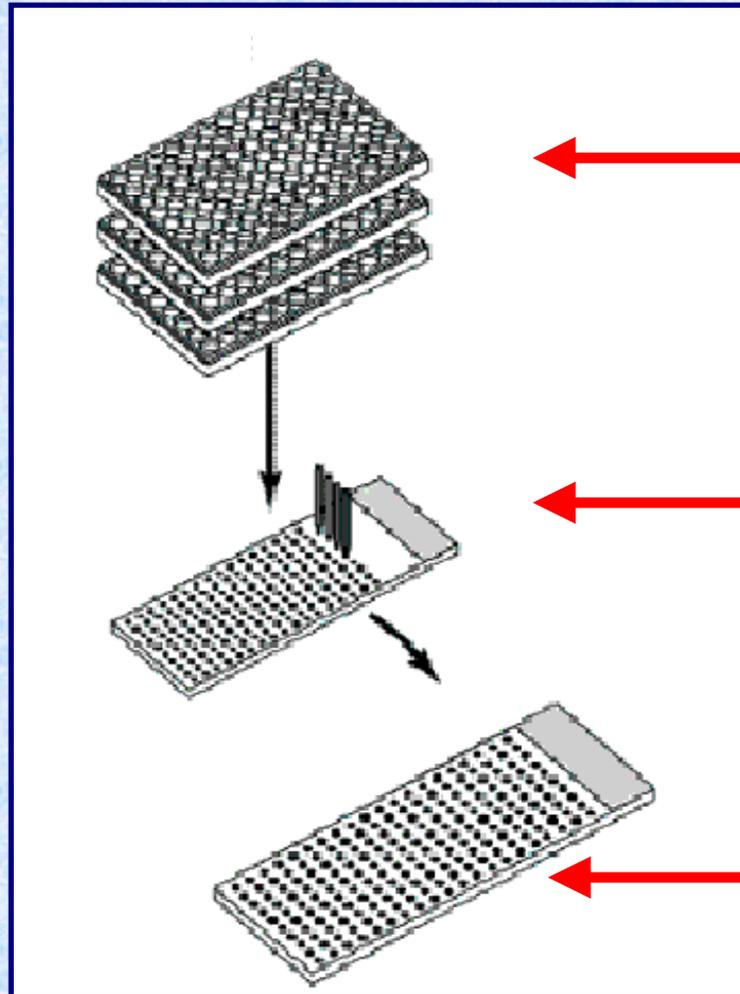
sonda N TGC GAAGTGCAAGCCACAGTTG

Studio dell'espressione genica globale



Questi DNA sintetici (SONDE) si depositano in griglie densissime di macchie circolari su semplici vetrini da microscopio con robot precisi e veloci.

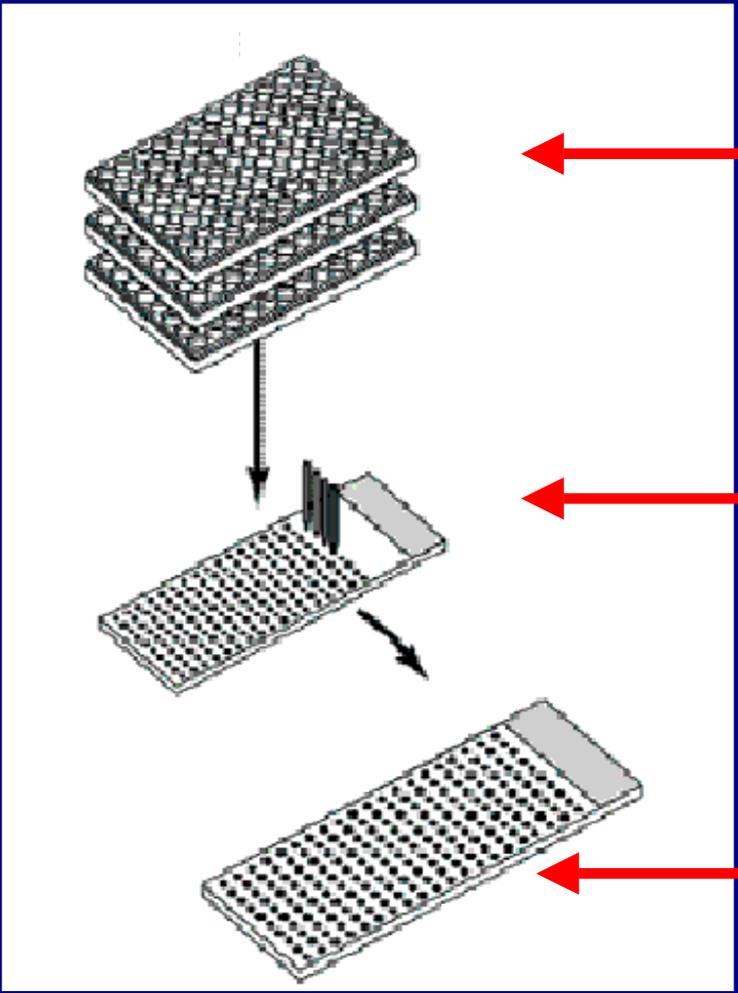
Ogni macchia è una sonda per un gene



**Collezione di sonde
per i 25.000 geni umani**

**Deposizione
robotizzata delle sonde**

**Un microarray con sonde
per tutti i geni umani**



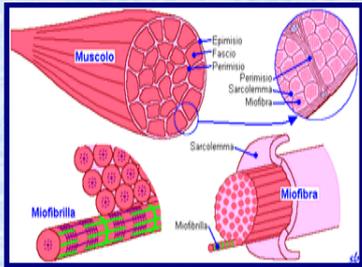
The diagram illustrates the three-step process of microarray construction. At the top, a stack of three rectangular substrates is shown, each with a grid of small squares representing spots. A vertical arrow points down to the middle stage, where a robotic arm with a vertical needle is positioned over a single substrate. A horizontal arrow points to the right, indicating the deposition of a probe. At the bottom, the final stage shows a single substrate with a grid of spots, representing a complete microarray. A horizontal arrow points to the right, indicating the final product.

**Costruire microarray
dei geni umani è facile**

**La deposizione
robotizzata delle sonde**

**Un microarray con sonde
per tutti i geni umani**

Quali geni sono accessi in un tipo di cellule umane ?



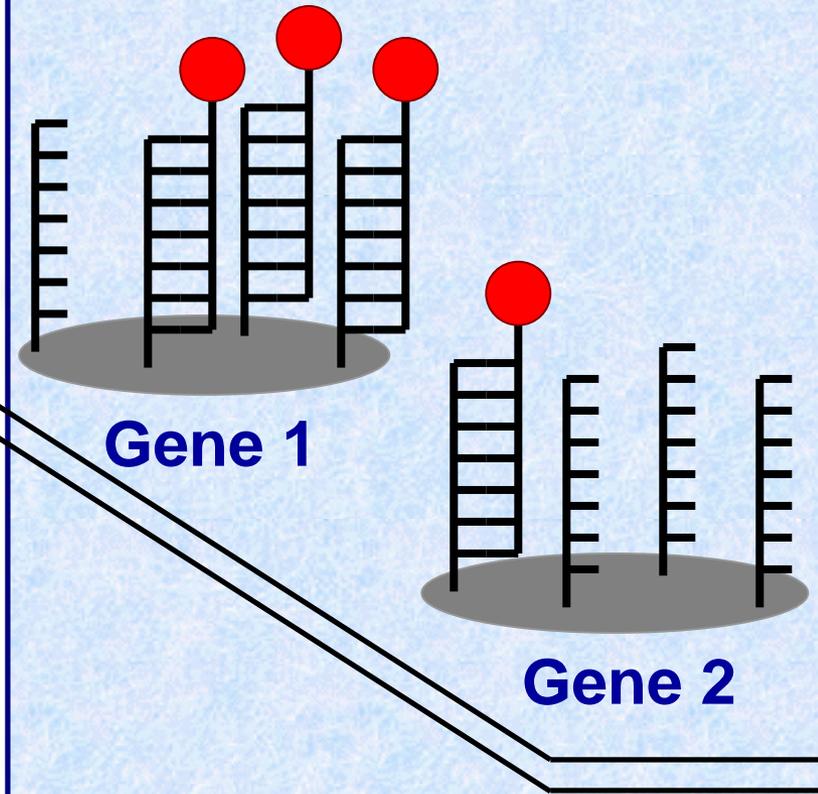
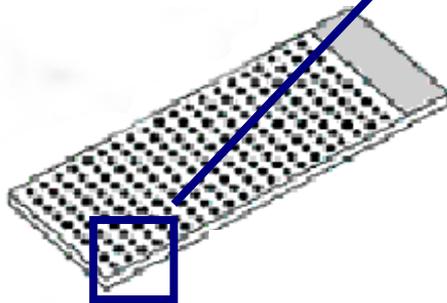
Estrazione dell'RNA



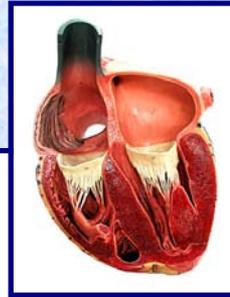
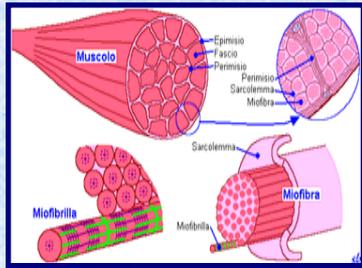
Marcatura dell'RNA con colore rosso



Ibridazione dell'RNA sul microarray

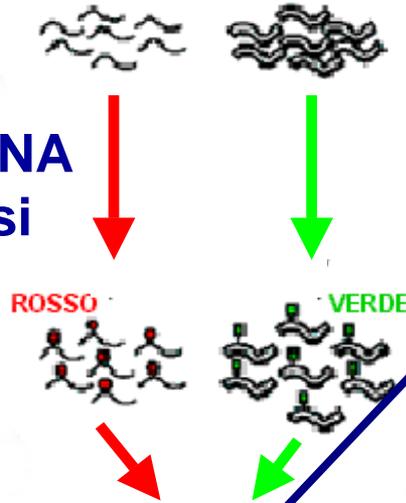


Quali geni sono differenzialmente accesi in due cellule molto simili

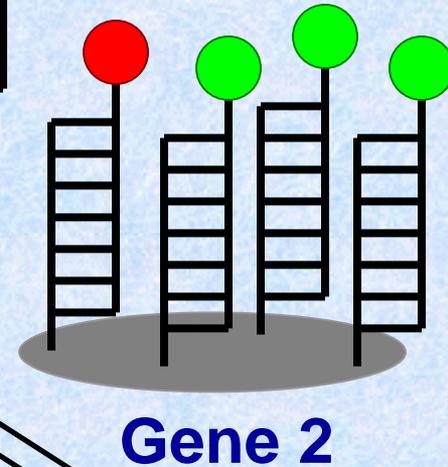
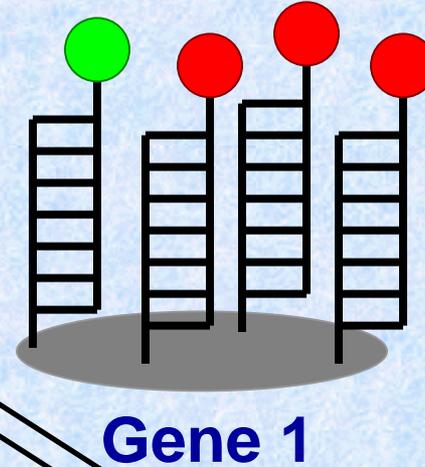
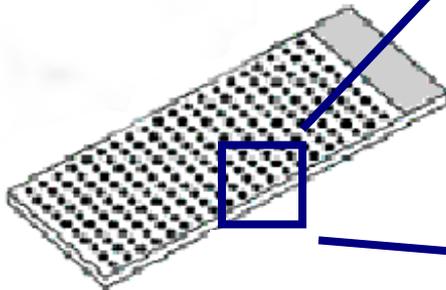


● = muscolo
● = cuore

Marcatura degli RNA con colori diversi



Ibridazione dei due RNA



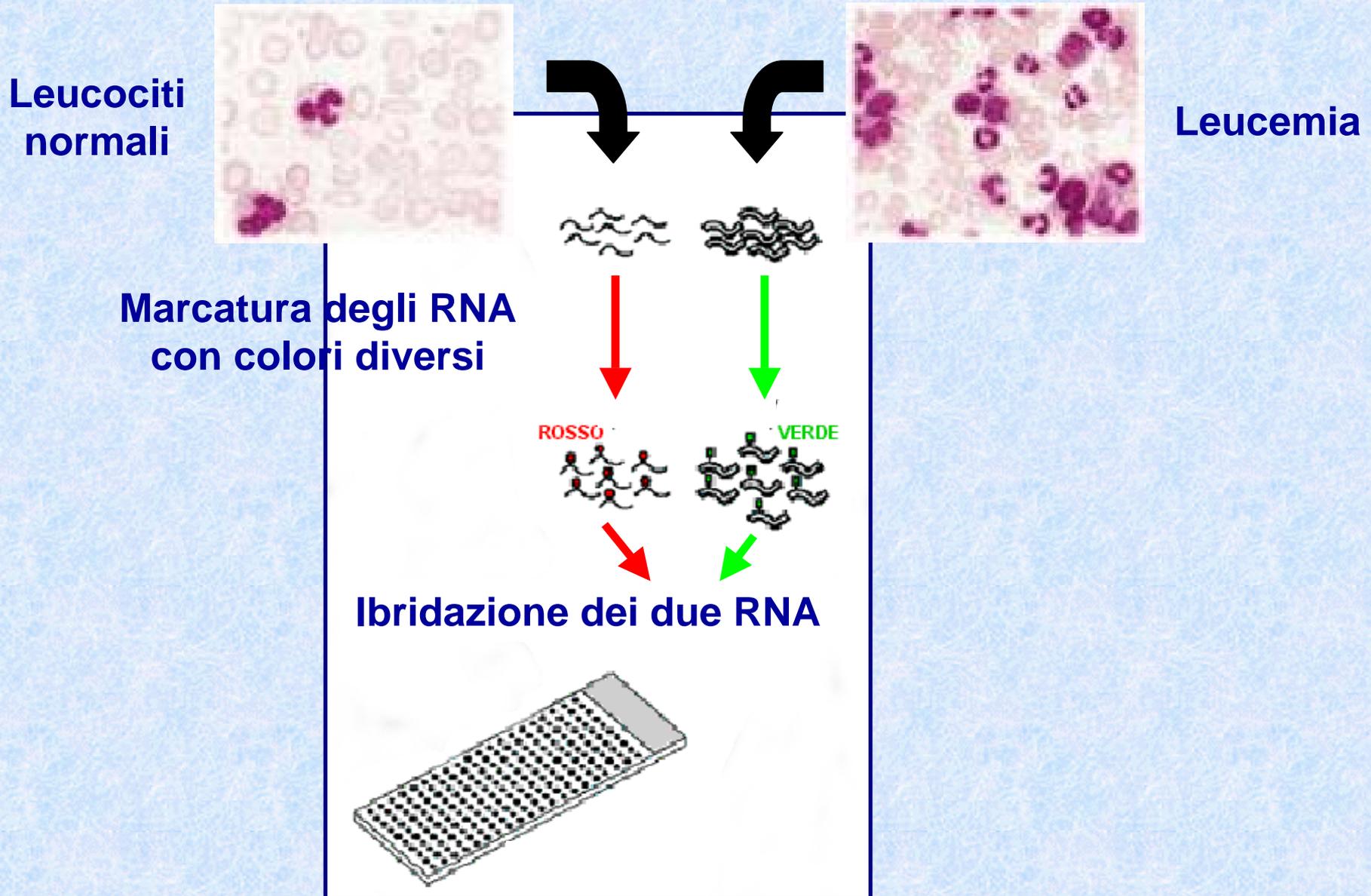
Studio dell'espressione genica globale

TECNICA DEI MICROARRAY DI DNA

Per ogni macchia sul microarray paragono l'intensità del rosso e del verde e scopro i geni che sono differenzialmente accesi nel muscolo e nel cuore e che mi possono spiegare la differenza della forma e funzione dei due tipi di cellule. Risultato:

I geni accesi differenzialmente sono centinaia !!!

Quali geni sono differenzialmente espressi nei tumori



Profilo d'espressione genica nella leucemia

Da questo profilo posso ricavare tutti geni con espressione alterata nella leucemia che mi potranno aiutare a capire:

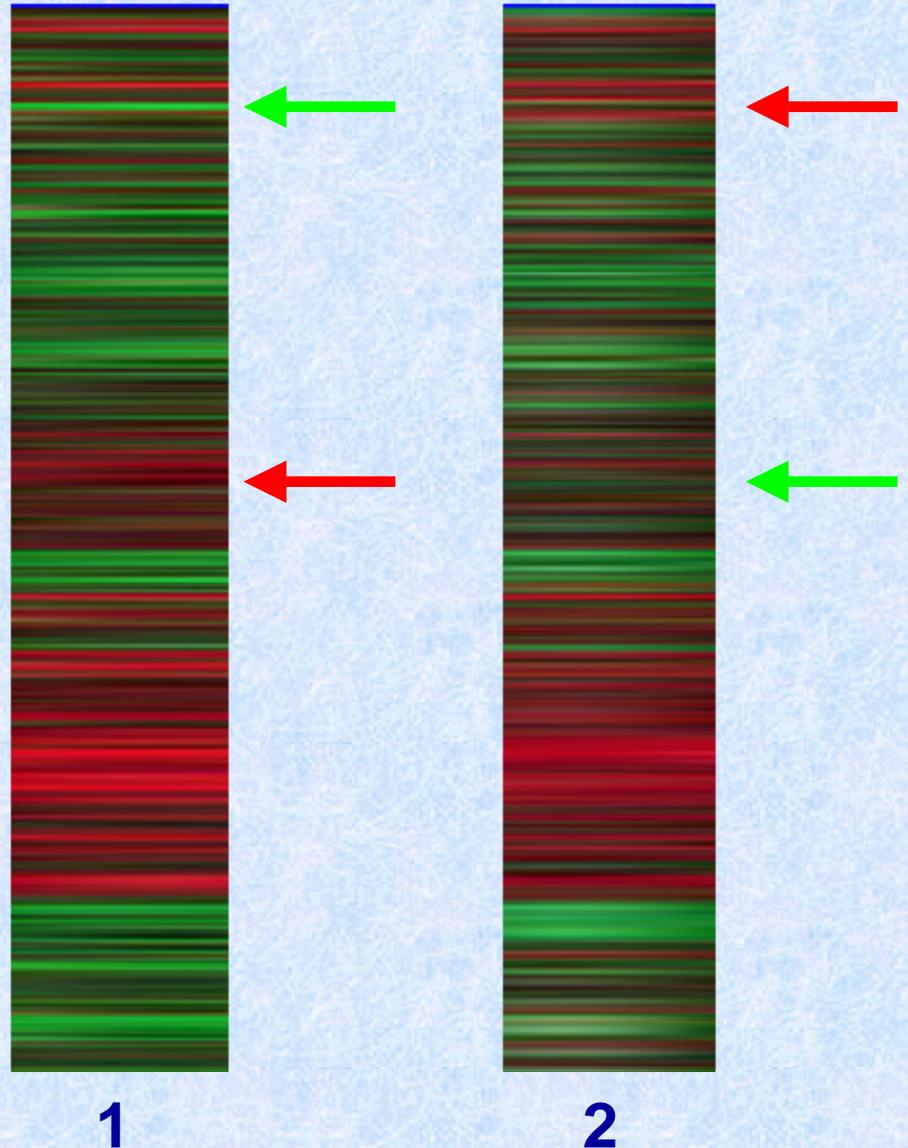
- *perché le cellule leucemiche non funzionano come linfociti normali*
- *perché si dividono in modo incontrollato*
- *perché invadono i tessuti*
- *quali bersagli (proteine) posso considerare per sviluppare nuovi farmaci*



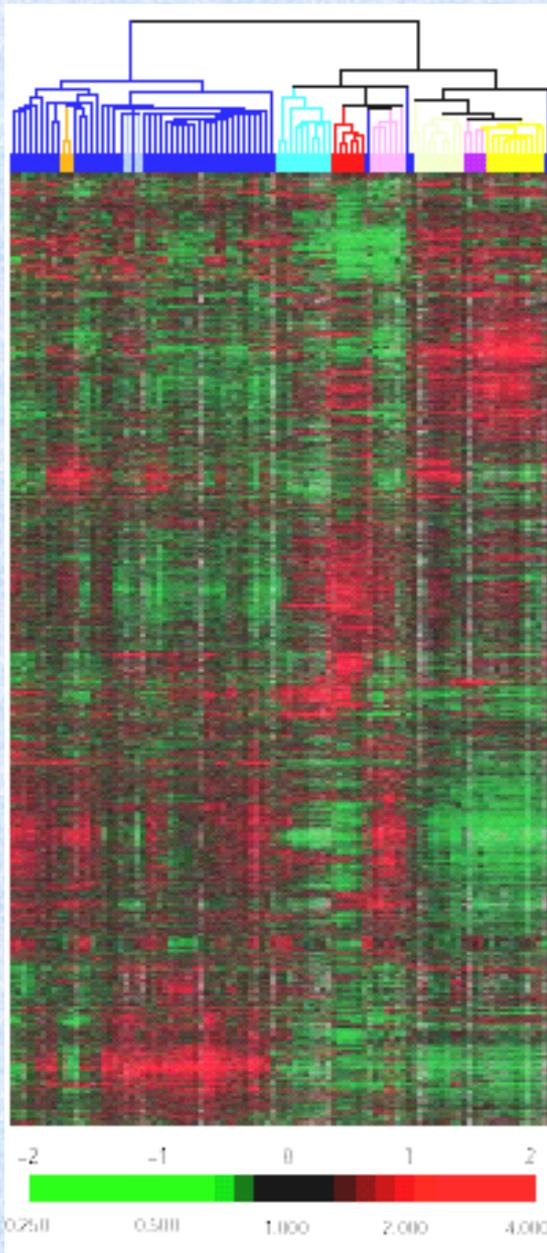
Profilo d'espressione genica nella leucemia

Profilo d'espressione genica nella leucemia 1

Profilo d'espressione genica nella leucemia 2



Profili d'espressione genica nelle leucemie



Posso confrontare i profili d'espressione di tanti pazienti con leucemie di tipo diverso e capire:

quali geni hanno un'alterazione dell'espressione uguale nelle leucemie studiate

quali geni sono espressi in modo diverso gruppi di pazienti con leucemie diverse

quali geni sono espressi in modo diverso in pazienti diversi con la stessa leucemia

quali geni cambiano l'espressione durante la progressione della leucemia

quali geni si accendono o si spengono dopo trattamento farmacologico

quali geni sono differenzialmente espressi nelle leucemie che resistono all'azione di farmaci antitumorali

Il messaggio

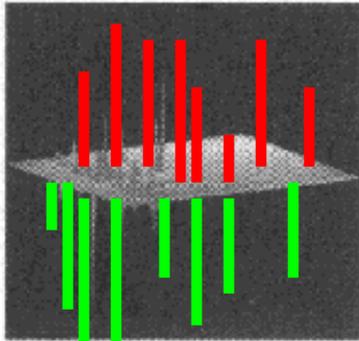
Il sequenziamento del genoma umano ha permesso la costruzione dei microarray per l'analisi dell'espressione genica globale con test relativamente semplici e veloci

Con i microarray di DNA si può misurare l'espressione differenziale di tutti i geni umani in qualsiasi cellula normale o patologica

I microarray di DNA sono una tecnica indispensabile per la ricerca di base sulla funzione dei geni

I microarray di DNA potranno divenire test diagnostici e prognostici estremamente sensibili e precisi

CHIP diagnostico



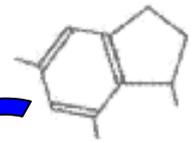
... ATCGCTTGCATTC ...
... GTCATTCGCAAG ...
... GTCATCGAGTTCT ...
... CTATTCGAGGGTG ...
... GTCATCGAGTTCT ...
... ATCGCTTGCATTC ...

➔ **Geni alterati
nella patologia**



CHIP specifico

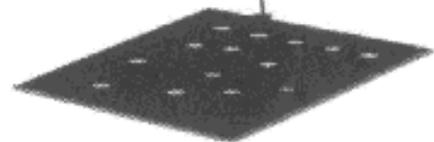
**Migliaia di molecole
generate casualmente**



TEST



mRNA



**Geni riportati
alla normalità**

**CHIP di DNA e farmacologia
= la farmacogenomica**

**NUOVO
FARMACO**



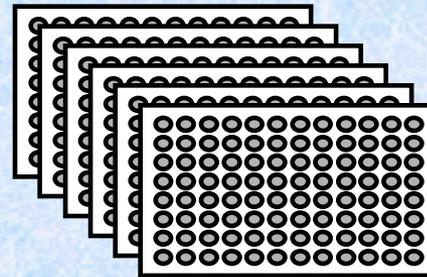
I chip di geni per lo studio dell'inquinamento ambientale



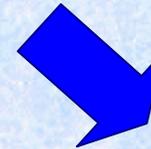
Mitilo

M. galloprovincialis

Un organismo sensibilissimo
all'inquinamento ambientale



Archivio
di geni
di mitilo

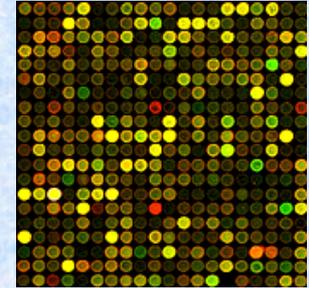


CHIP di
geni di mitilo

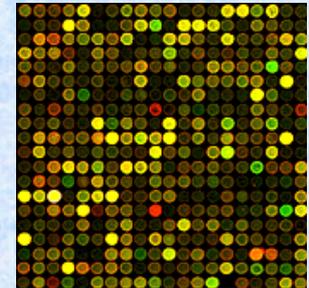
Profili d'espressione di mitilo trattato in laboratorio con inquinanti ambientali



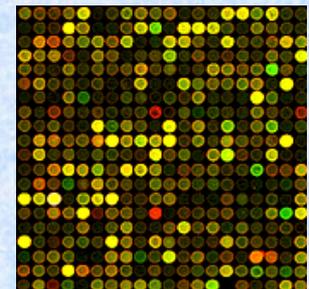
+ diossina



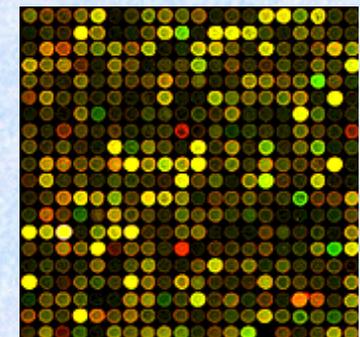
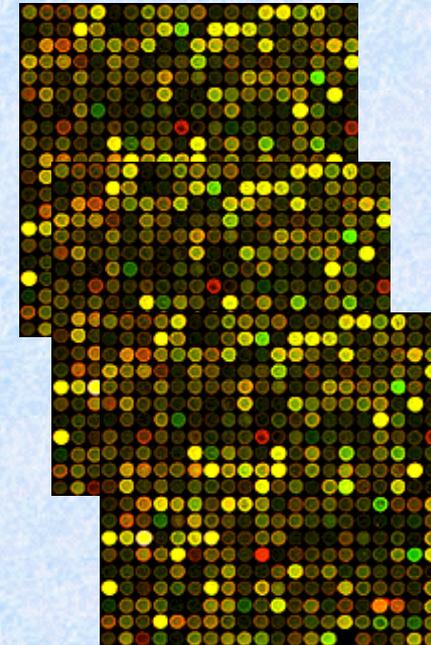
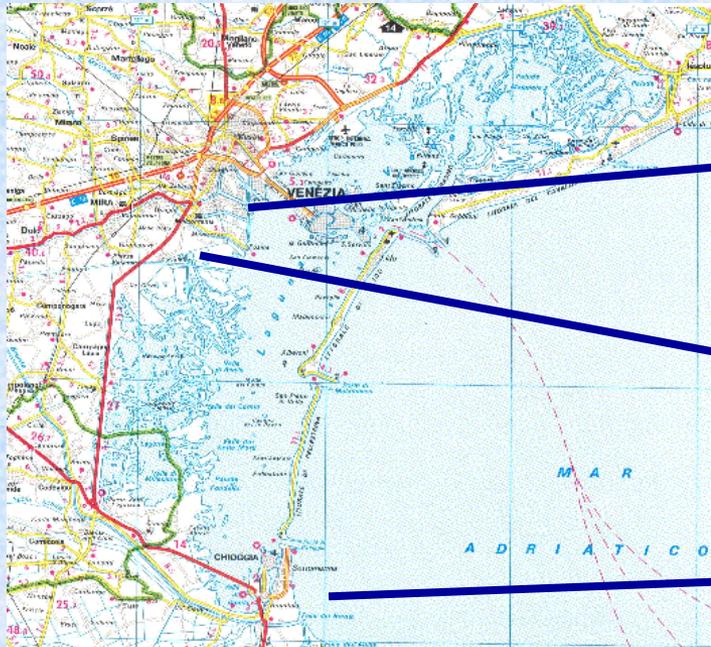
+ metalli pesanti



+ residui del petrolio



I chip di geni per lo studio dell'inquinamento ambientale e il controllo della qualità degli alimenti



Genoma umano: illusioni, realtà, prospettive

Giovedì 15 Marzo 2007 - ore 17.30

Istituto Veneto di Scienze, Lettere ed Arti - Venezia

Giuseppe Borsani e Gerolamo Lanfranchi, coordina Fabio Pagan



**La sequenza del genoma umano è solo
una tappa importantissima.**

Ma il lavoro non si ferma

**Sequenziare tantissimi genomi umani
diversi**

Per rispondere ad alcune domande:

Quanto si differenzia il genoma di popolazioni diverse? nei geni o nel DNA intergenico?

Quali variazioni nel genoma sono associate a individui o popolazioni più soggette a particolari malattie?

Come cambia il genoma di una cellula che si trasforma da:

Normale



Tumorale benigna



Tumorale maligna con bassa capacità metastatica



Tumorale maligna ad alta attività metastatica



Tumorale resistente ai chemioterapici?

**Occorre sequenziale tantissimi genomi
velocemente e a costi ridotti**

**L'avanzamento della produttività delle tecniche
di sequenziamento del genoma**

**100.000.000
basi in 8 ore**



2006

**300.00 basi
in 3 ore**



2000

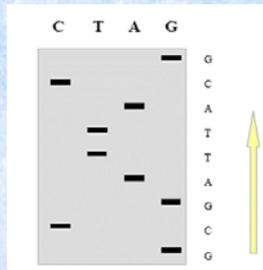
1990

**2.400 basi
in 6 ore**



1980

**300 basi
in 6 ore**



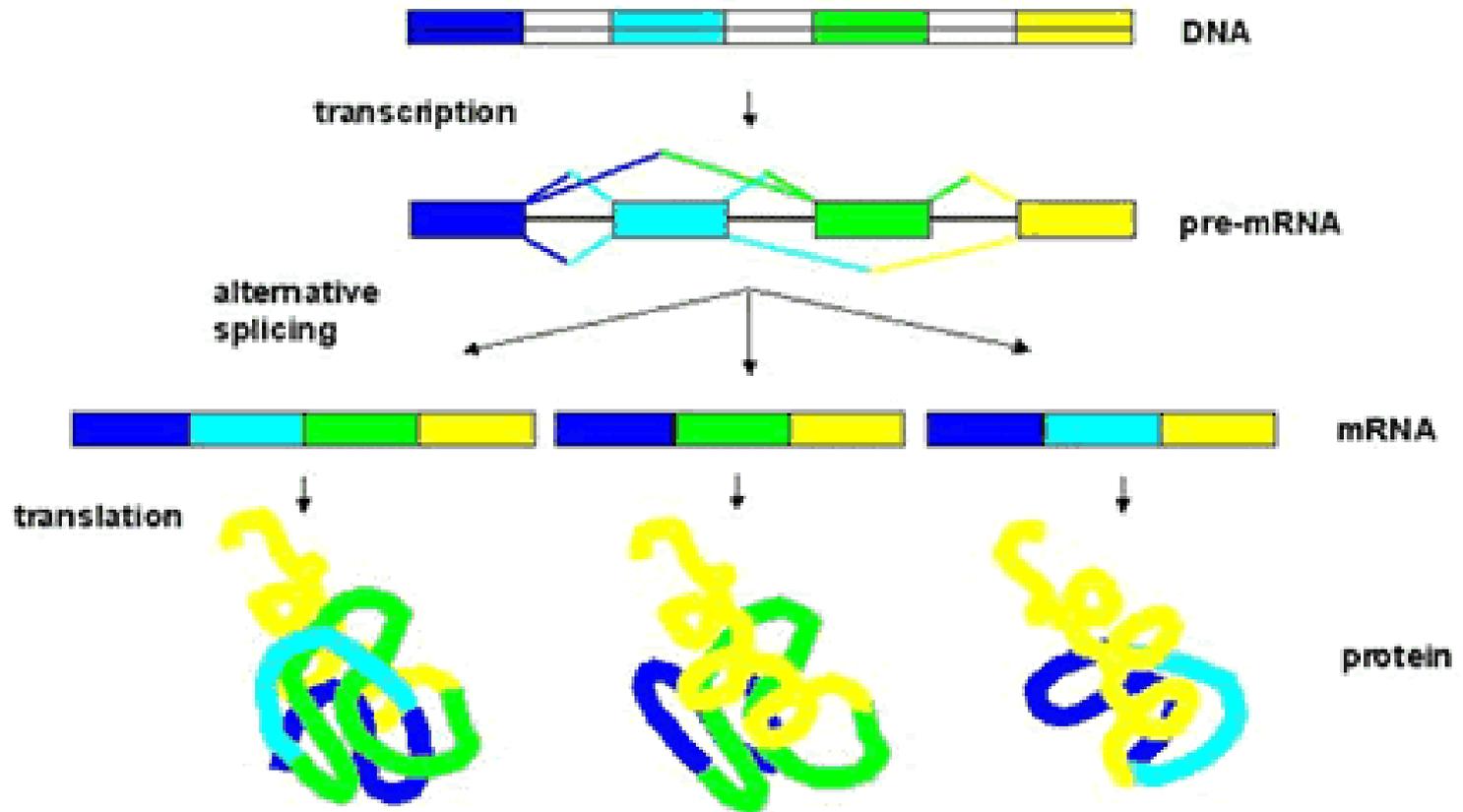
La sequenza del genoma umano è solo una tappa importantissima (ma piccola)

Basta la conoscenza del numero, della sequenza e del livello di espressione dei geni per capire il funzionamento delle cellule, dei tessuti e degli organismi?

Livelli di complicazione del messaggio contenuto dai geni:

- **I geni sono composti da blocchi (ESONI) dispersi nel genoma**
- **I blocchi possono essere letti in modi differenti per formare RNA diversi (MATURAZIONE)**
- **Ogni gene può formare di media 12 diversi RNA per maturazione alternativa**
- **Ogni forma alternativa codifica per un proteina diversa**
- **Una stessa proteina può essere modificata con diversi gruppi chimici in punti diversi.**
- **Ogni proteina modificata diversamente può avere funzioni differenti**

Maturazione alternativa dell'RNA



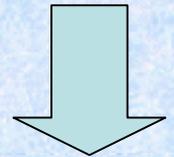
Quindi diamo i numeri:

25.000 geni x 12 = 300.000 RNA-PROTEINE

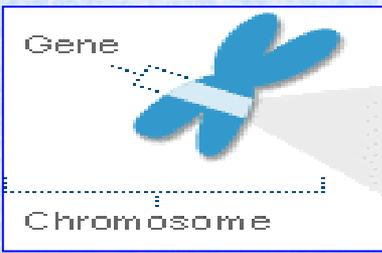
**300.000 PROTEINE X 15 (?) modificazioni =
4.500.000 PROTEINE**

Il futuro della genomica funzionale

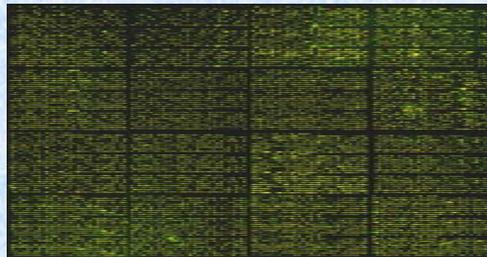
Informazioni
integrate



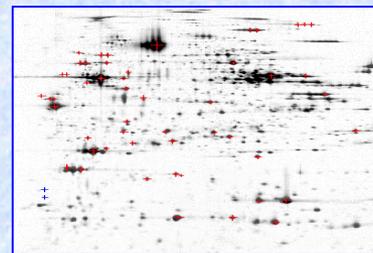
Quadro
genomico
molecolare
completo



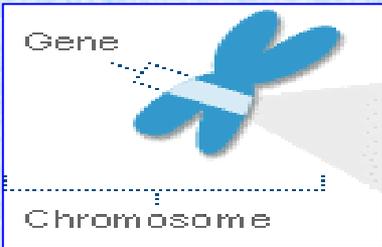
genoma 1



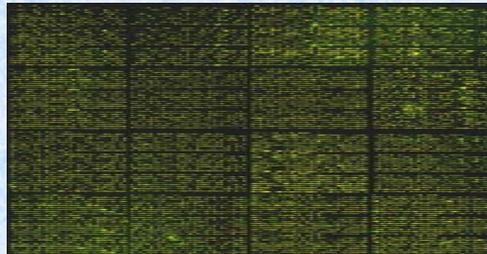
trascrittoma 1



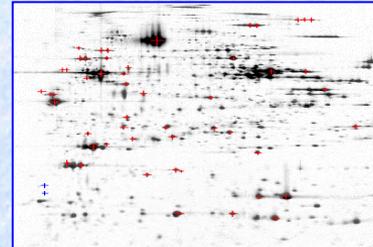
proteoma 1



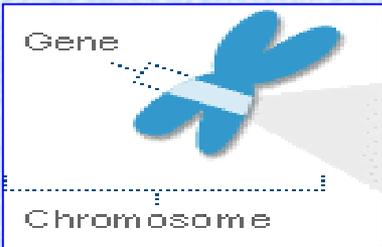
genoma 2



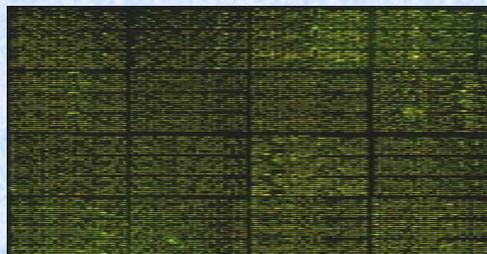
trascrittoma 2



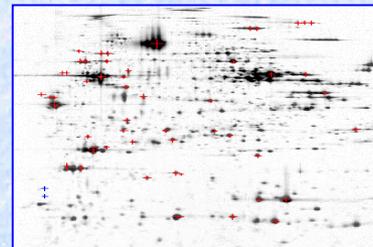
proteoma 2



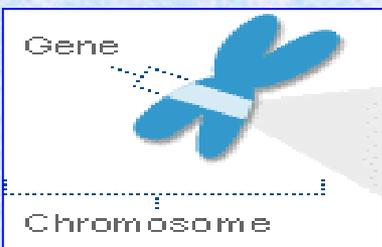
genoma 3



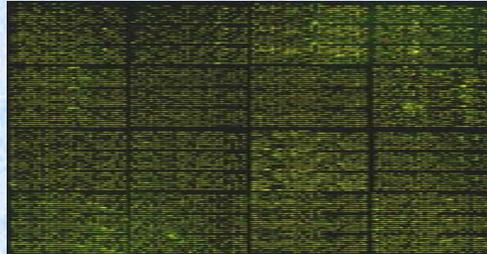
trascrittoma 3



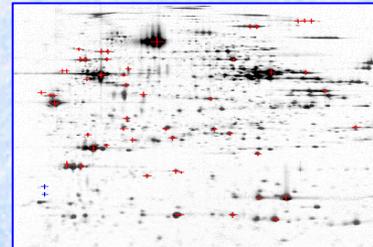
proteoma 3



genoma 4



trascrittoma 4



proteoma 4

Un gene ha più funzioni

**Ogni funzione cellulare è controllata
dall'interazione di diversi geni**

**Per capire qualsiasi funzione della cellula
occorre scoprire quali geni interagiscono per
regolarla**

Reti d'interazione

Le reti di interazioni sono collegate

Genoma umano: illusioni, realtà, prospettive

Giovedì 15 Marzo 2007 - ore 17.30

Istituto Veneto di Scienze, Lettere ed Arti - Venezia

Giuseppe Borsani e Gerolamo Lanfranchi, coordina Fabio Pagan



La sequenza del genoma umano è solo una tappa importantissima (ma piccola)

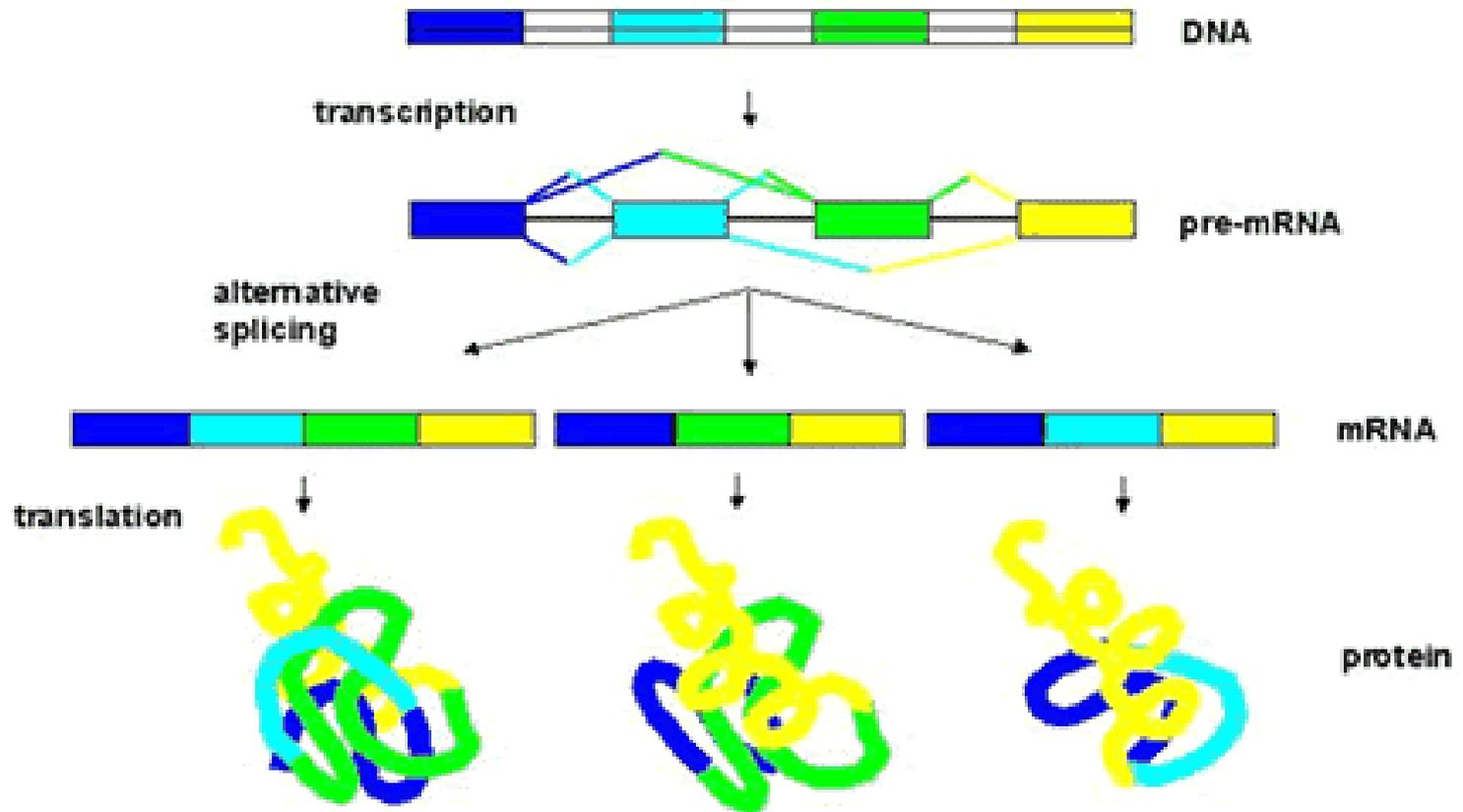
Ma il lavoro non si ferma

Basta la conoscenza del numero, della sequenza e del livello di espressione dei geni per capire il funzionamento delle cellule, dei tessuti e degli organismi?

Livelli di complicazione del messaggio contenuto dai geni:

- I geni sono composti da blocchi (ESONI) dispersi nel genoma
- I blocchi possono essere letti in modi differenti per formare RNA diversi (MATURAZIONE)
- Ogni gene può formare di media 12 diversi RNA per maturazione alternativa
- Ogni forma alternativa codifica per un proteina diversa
- Una stessa proteina può essere modificata con diversi gruppi chimici in punti diversi.
- Ogni proteina modificata diversamente può avere funzioni differenti

Maturazione alternativa dell'RNA

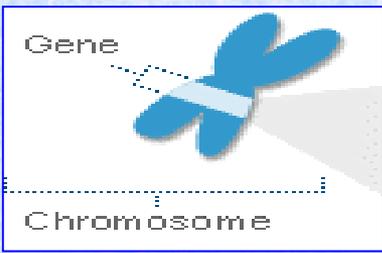


Quindi diamo i numeri:

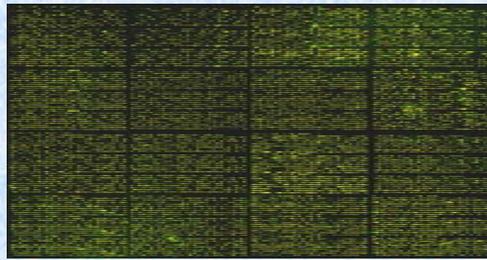
25.000 geni x 12 = 300.000 RNA-PROTEINE

**300.000 PROTEINE X 15 (?) modificazioni =
4.500.000 PROTEINE**

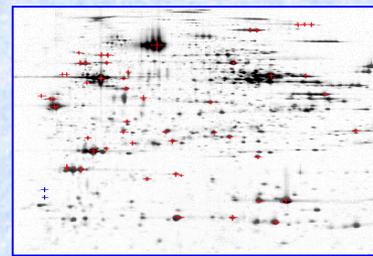
Il futuro della genomica funzionale



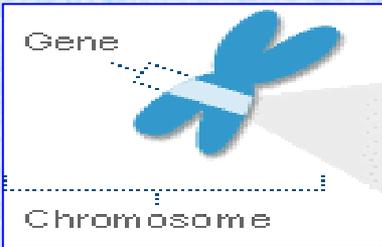
genoma 1



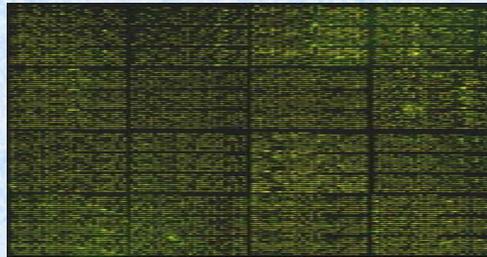
trascrittoma 1



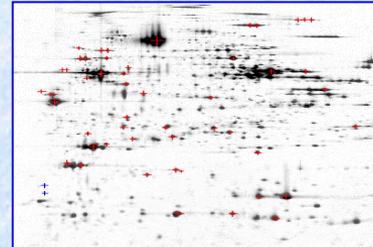
proteoma 1



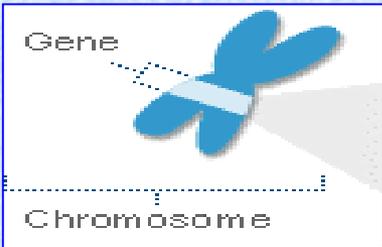
genoma 2



trascrittoma 2



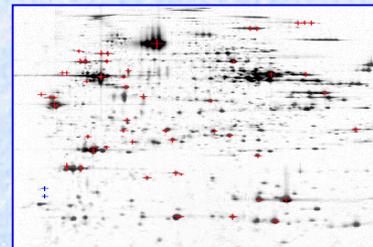
proteoma 2



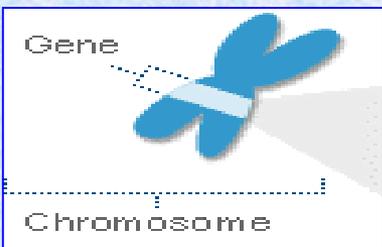
genoma 3



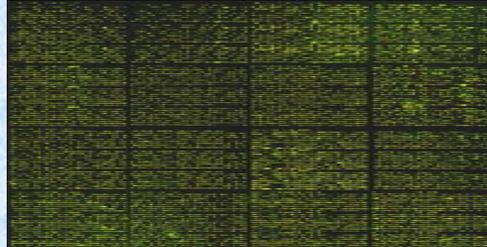
trascrittoma 3



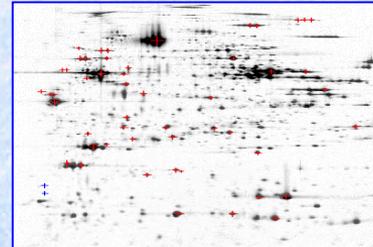
proteoma 3



genoma 4

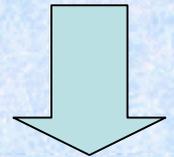


trascrittoma 4



proteoma 4

**Informazioni
integrate**



**Quadro
genomico
molecolare
completo**

Un gene ha più funzioni

**Ogni funzione cellulare è controllata
dall'interazione di diversi geni**

**Per capire qualsiasi funzione della cellula
occorre scoprire quali geni interagiscono per
regolarla**

Reti d'interazione

Le reti di interazioni sono collegate

