

**METODI
DI MARCATURA
DEGLI ACIDI NUCLEICI**

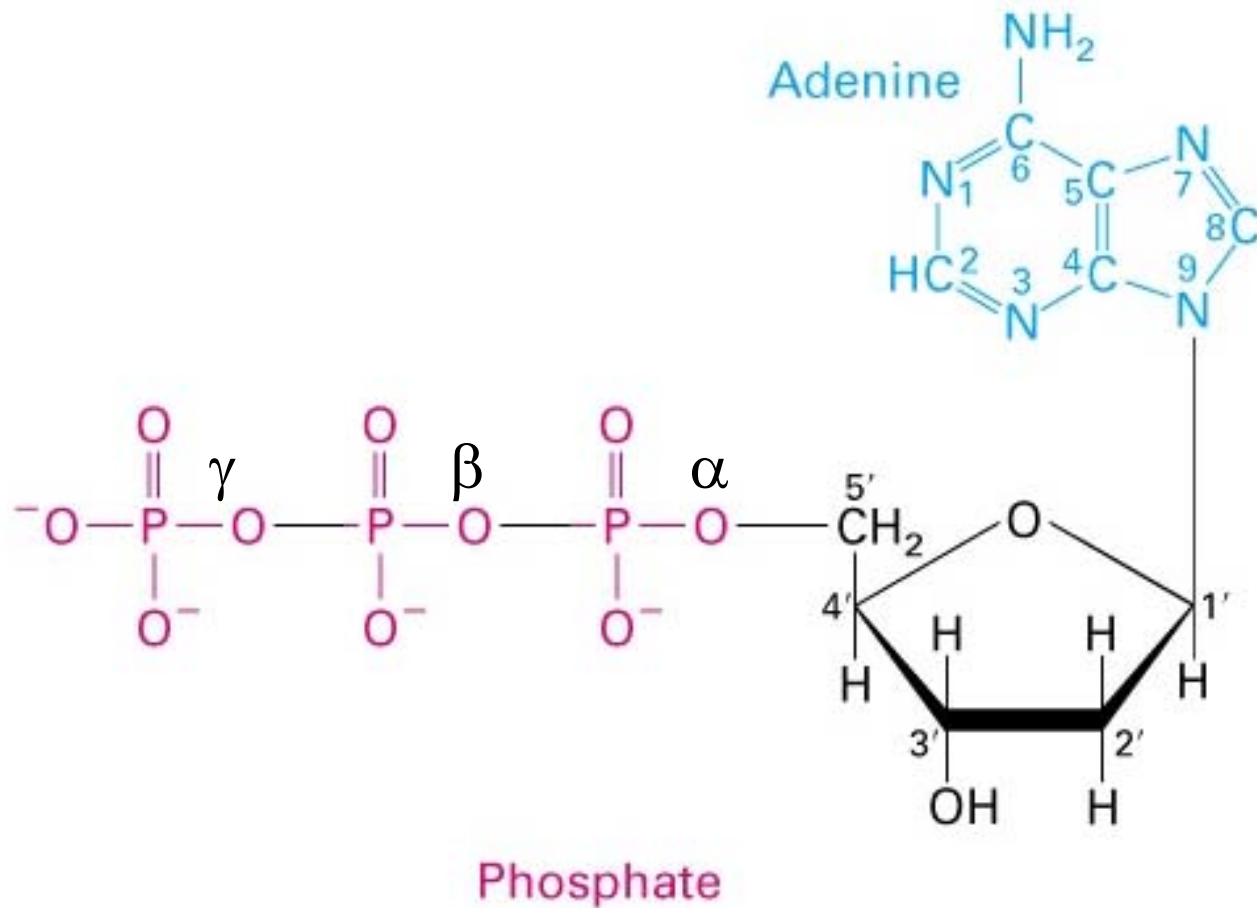
Marcatura di acidi nucleici

Una sonda per ibridazione è una molecola di DNA marcata, con una sequenza complementare al DNA bersaglio da individuare. Poiché la sonda e il DNA bersaglio sono complementari, esse possono appaiarsi ed **ibridare**. Naturalmente sia il DNA trasferito su filtro sia il DNA sonda devono essere denaturati a filamenti singoli. La marcatura di una sonda può essere ottenuta utilizzando traccianti radioattivi sotto forme di dNTP o NTP radioattivi o, più recentemente, traccianti fluorescenti, enzimatici o chemiluminescenti.

Nella marcatura radioattiva, i radioisotopi generalmente usati sono P^{32} dNTP, o S^{35} dNTP. In tutti i casi si pone il problema di incorporare il dNTP modificato, di solito radioattivo, in un frammento di DNA; dobbiamo, cioè, preparare una sonda da utilizzare in esperimenti di ibridizzazione molecolare.

I principali metodi di marcatura sono:

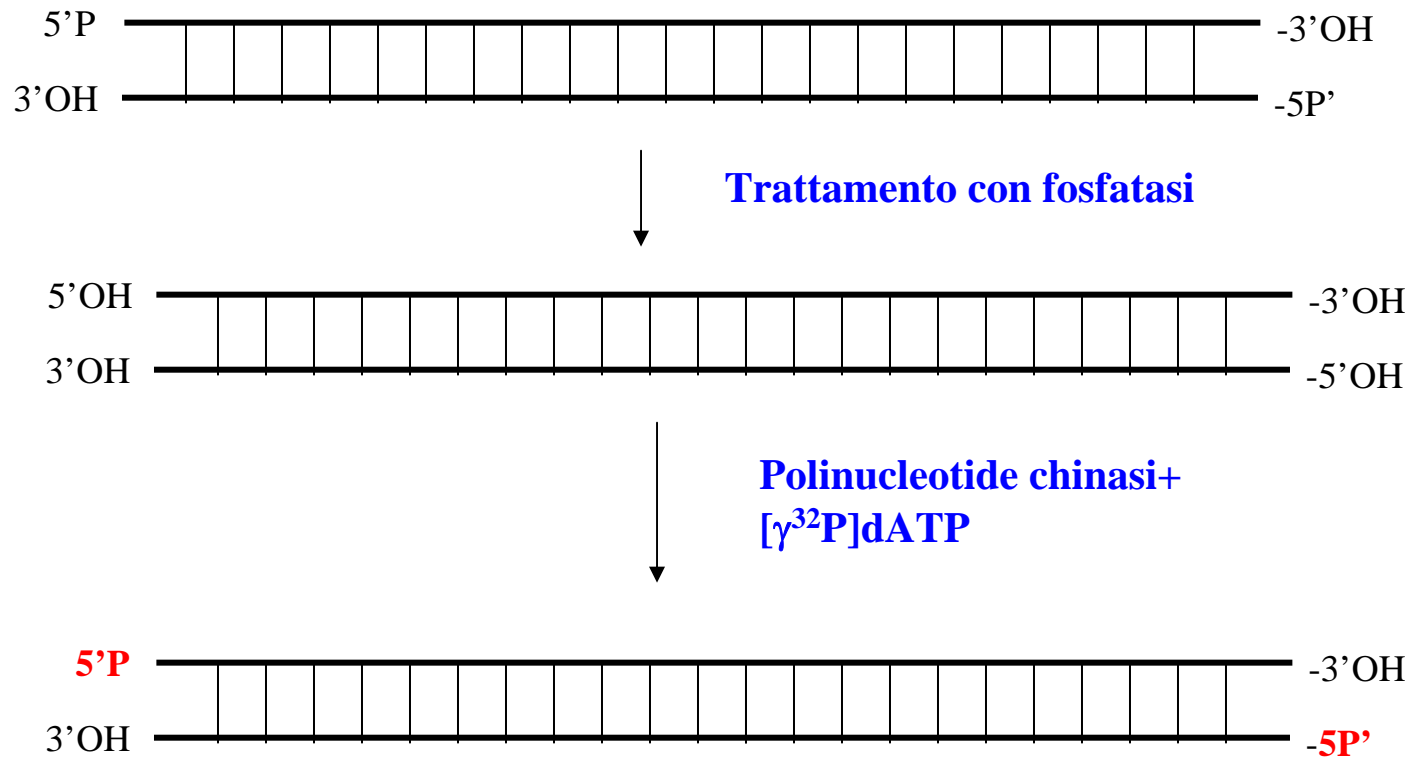
- Marcatura terminale al 5' utilizzando la polinucleotide chinasi
- Marcatura terminale al 3' utilizzando la terminal transferasi
- Nick translation
- Random priming



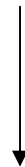
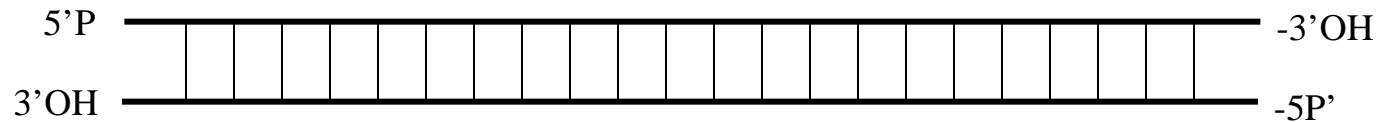
Deossiadenosina trifosfato (ATP)

La struttura di un deossiribonucleoside trifosfato. Le unità di fosfato si designano α , β e γ . Il fosfato α si fissa direttamente al 5' dello zucchero deossiribosio. Durante la sintesi del DNA il fosfato α prende parte alla formazione del legame fosfodiesterico, mentre i gruppi β e γ vengono rilasciati come unità di pirofosfato

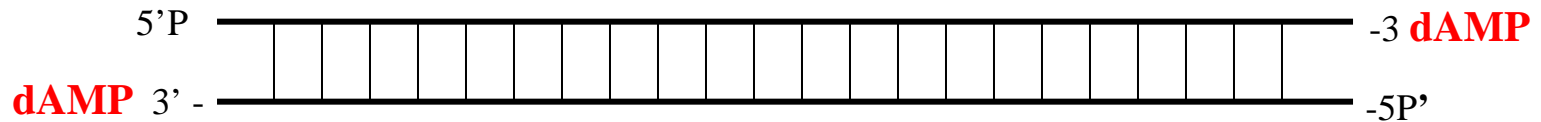
Marcatura terminale al 5' utilizzando la polinucleotide chinasi



Marcatura terminale al 3' utilizzando la polinucleotide chinasi



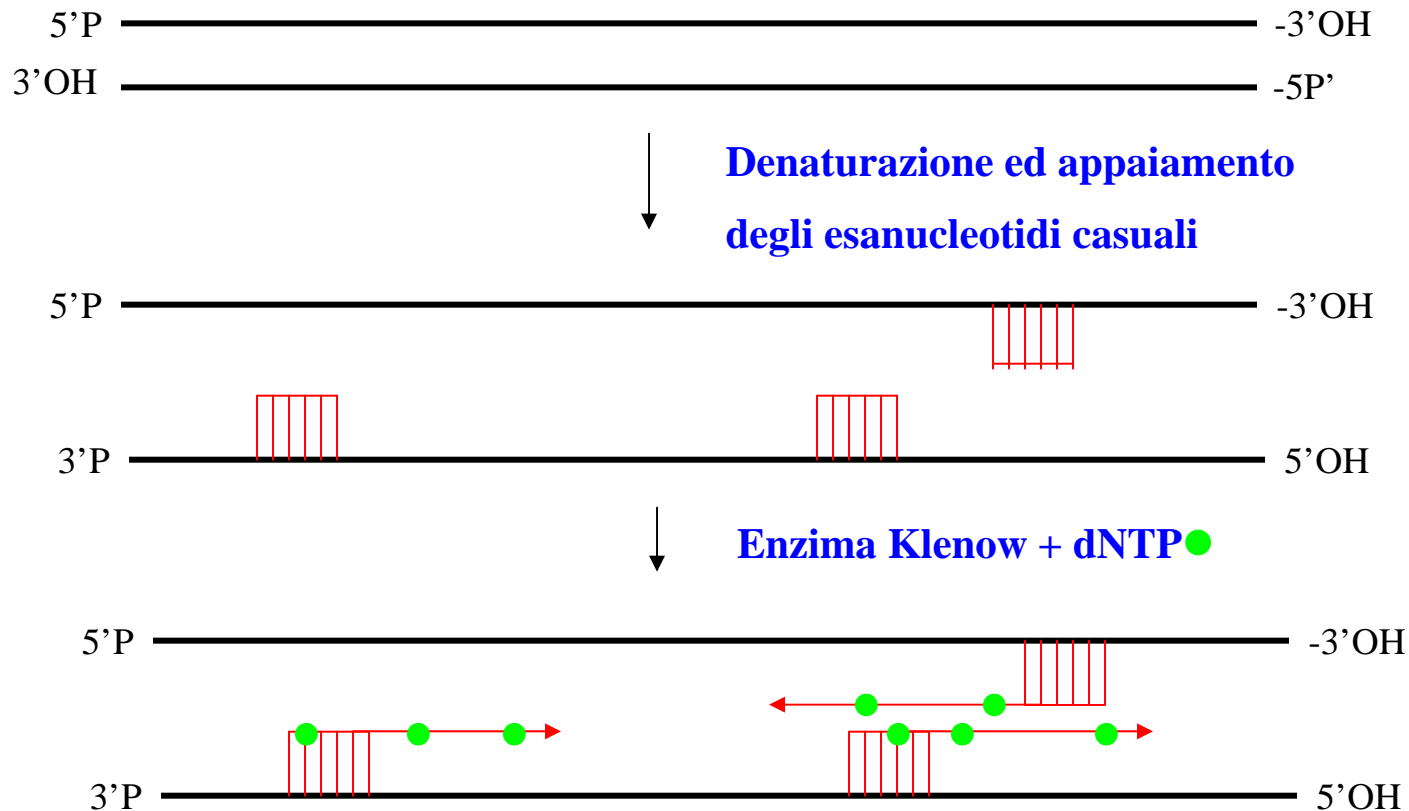
Terminal trasferasi +
[$\alpha^{32}\text{P}$]dATP



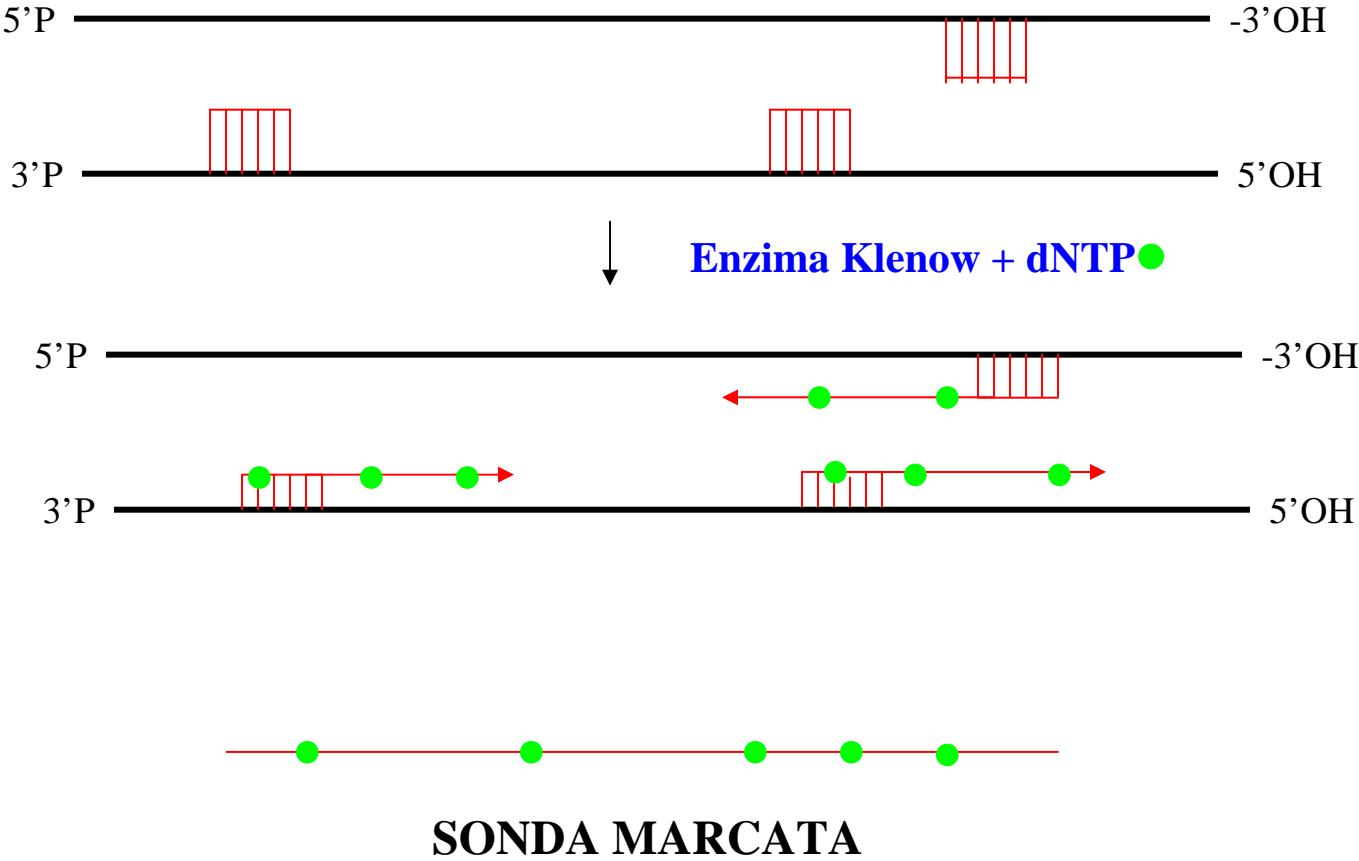
Marcatura del DNA con Random priming

Si basa sulla ibridizzazione casuale di una miscela di tutti i possibili esanucleotidi alla forma a singola elica di un frammento di DNA sonda

Il filamento complementare è sintetizzato a partire dall'estremità -3'OH degli esanucleotidi che riescono ad appaiarsi alla sonda utilizzando la attività polimerasica del frammento di Klenow della DNA polimerasi. Per la marcatura si utilizzano $[\alpha^{32}\text{P}]\text{dNTP}$, in genere $[\alpha^{32}\text{P}]\text{dATP}$.



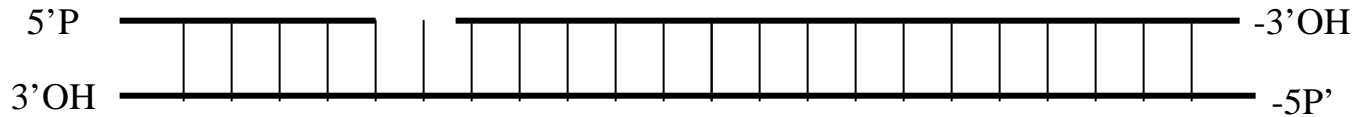
Marcatura del DNA con Random priming



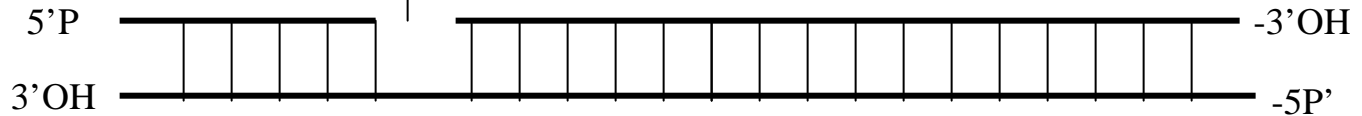
Marcatura del DNA mediante Nick translation

Questo tipo di marcatura si effettua utilizzando le proprietà 3'→5' esonucleasica della **DNA polimerasi I**. A bassa concentrazione enzimatica e in presenza di Mg⁺⁺, la DNasi I introduce interruzioni a singolo filamento (nicks).. La presenza di un “nick” fornisce alla DNA polimerasi I l'estremità -OH su cui innescare la reazione di sintesi. L'attività 5'→3' esonucleasica dell'enzima rimuove contemporaneamente nucleotidi, in direzione di sintesi sostituendoli con i dNTP, in largo eccesso, forniti nella reazione. Per la marcatura si utilizzano **[α³²P]dNTP**, in genere [α³²P]dATP.

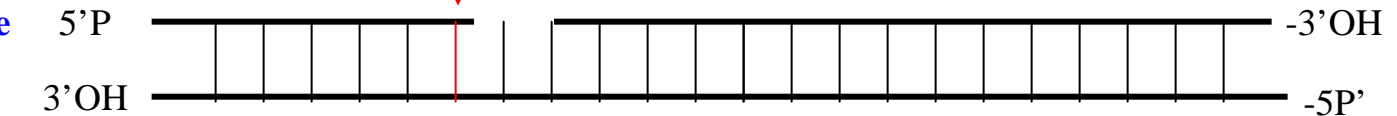
nick con un -OH disponibile



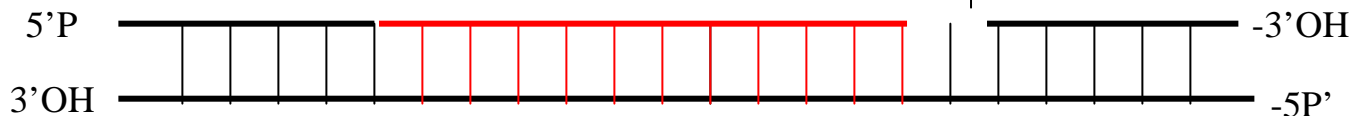
**L'attività 3'→5' esonucleasica
rimuove il nucleotide**



**L'attività 5'→3' polimerasica
sostituisce il nucleotide**



**L'attività 5'→3' esonucleasica
sposta il nick verso il 3'**



Southern blotting

Nella tecnica del 'Southern blot', così chiamata in onore del suo ideatore E.M.Southern, il DNA viene digerito con enzimi di restrizione, risolto per elettroforesi su gel di agarosio e trasferito per capillarità (blotting) ad una membrana di nitrocellulosa o nylon dove i frammenti in esame vengono identificati per ibridazione con una sonda radioattiva.

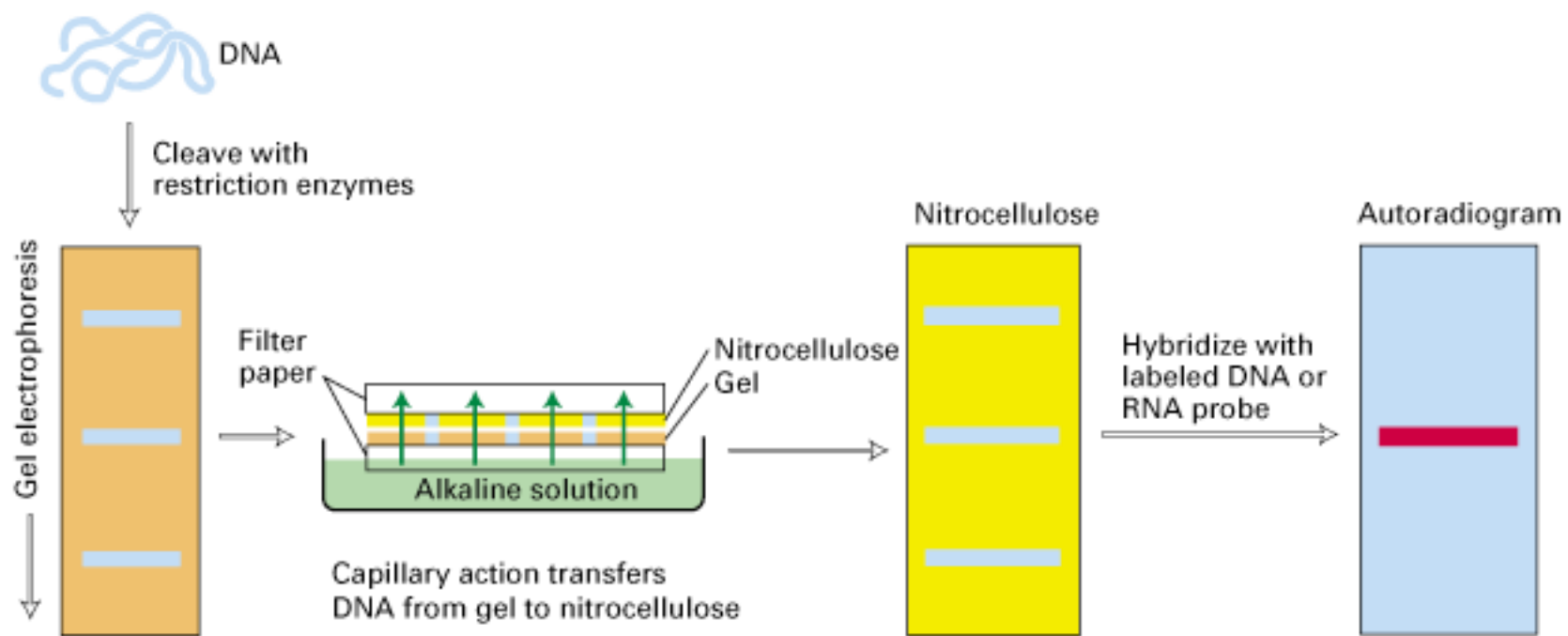
La sonda viene di solito marcata con ^{32}P dATP per random priming o nick translation anche se si stanno diffondendo metodi di marcatura non radioattivi, per esempio quelli basati sulla digossigenina.

Le condizioni di ibridizzazione prevedono condizioni severe, alte temperature (65°C) e alta forza ionica, che permettono ibridazioni solo tra molecole omologhe. La posizione del frammento di restrizione bersaglio sulla membrana è quindi identificata grazie al segnale del marcatore associato alla sonda.

Modulando la temperatura e la forza ionica, cioè la **stringenza** dell'ibridazione, è possibile utilizzare sonde eterologhe, soltanto parzialmente omologhe al DNA bersaglio da identificare. Per esempio utilizzando come sonda un gene isolato in tabacco, possiamo cercare di identificare in altre specie vegetali geni omologhi.

Per effettuare l'ibridazione, la membrana viene messa in una bottiglia di vetro con la sonda marcata e una soluzione tampone; la bottiglia viene fatta ruotare delicatamente per parecchie ore per permettere alla sonda di ibridare con il DNA bersaglio. La membrana viene poi lavata per rimuovere la sonda in eccesso e il segnale della sonda viene identificato.

Nell'esempio mostrato qui di seguito, la sonda è marcata radioattivamente e il segnale viene identificato tramite **autoradiografia**.



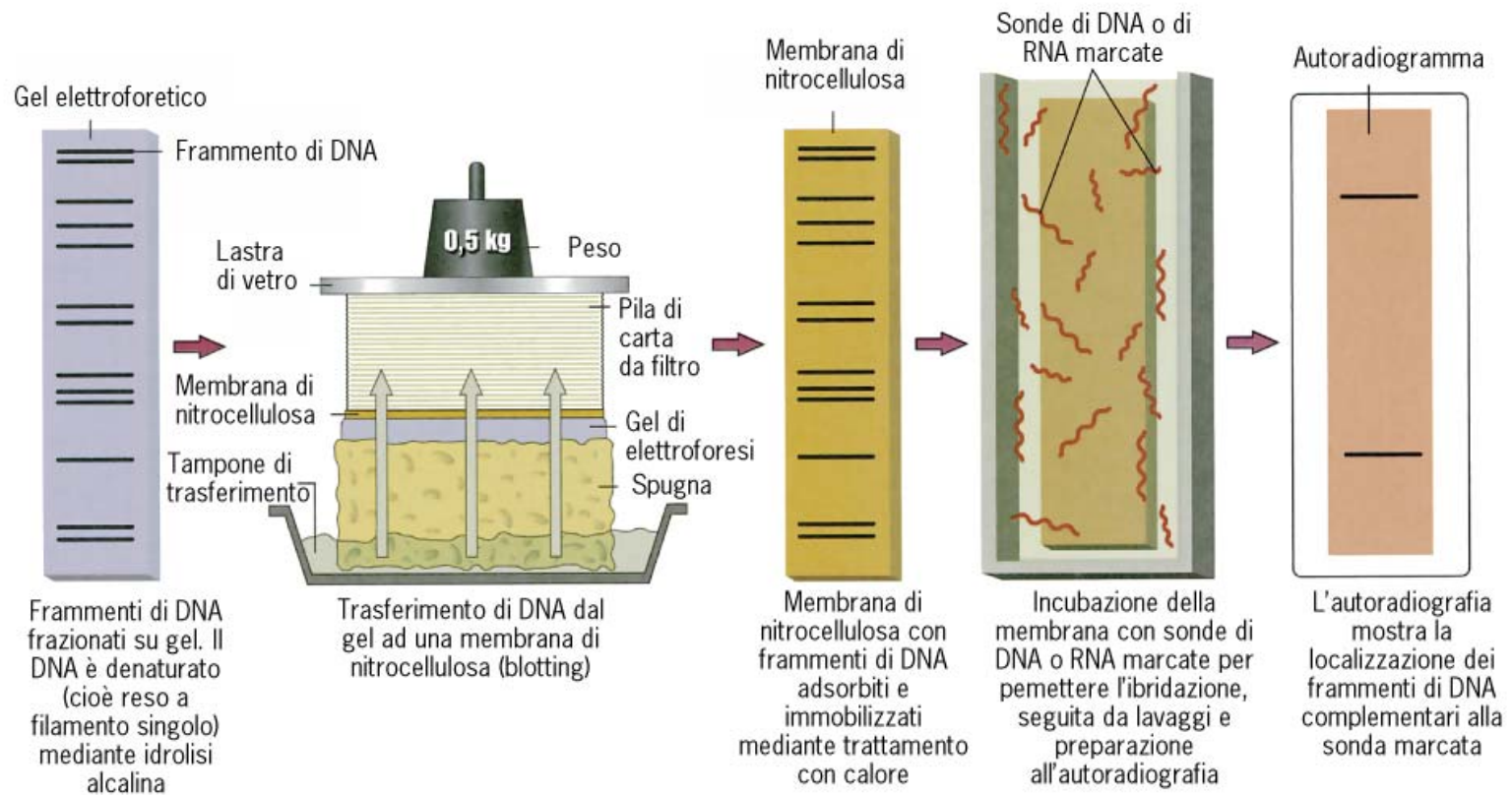


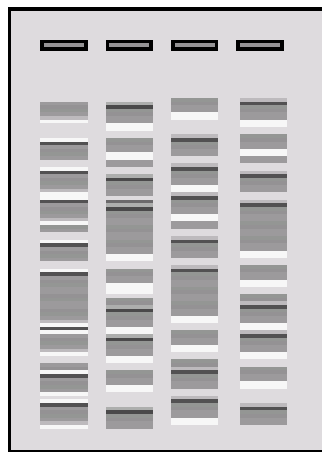
Figura 18.35 Determinazione della localizzazione di frammenti specifici di DNA in un gel elettroforetico per mezzo del Southern blot. Frammenti di DNA frazionati sono denaturati e trasferiti (blottati) su una membrana di nitrocellulosa, che viene incubata con sonde di DNA (o RNA) marcate radioattivamente, e la localizzazione degli ibridi molecolari è rile-

vata tramite autoradiografia. Durante il blotting l'azione di forze capillari spinge il tampone di trasferimento a risalire verso tovaglioli di carta da filtro. Mentre il tampone attraversa il gel, i frammenti di DNA si dissolvono e vengono trascinati verso la superficie della membrana adagiata sul gel.

Southern Blotting (DNA)

Restriction Enzyme
Digested DNA

Electrophoresis to
separate DNA fragments
based on size



Agarose Gel

Denature &
Transfer DNA

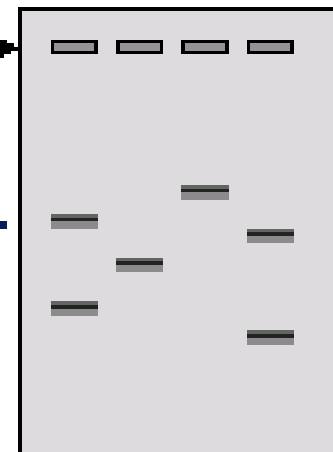
Hybridization of
probe to immobilized
DNA on blot



Nitrocellulose Blot

Identification of specific
DNA fragments with
homology to the probe

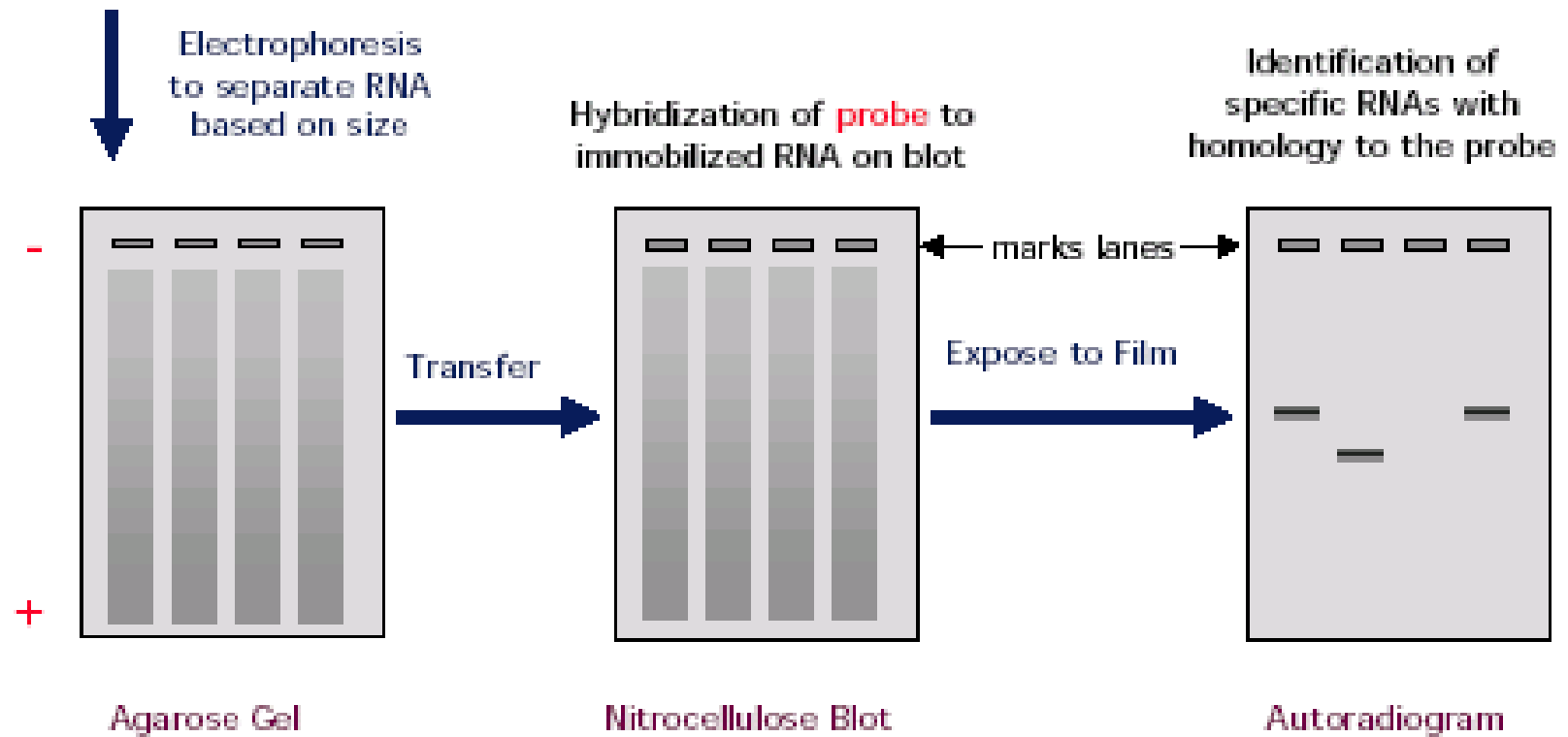
Expose to Film



Autoradiogram

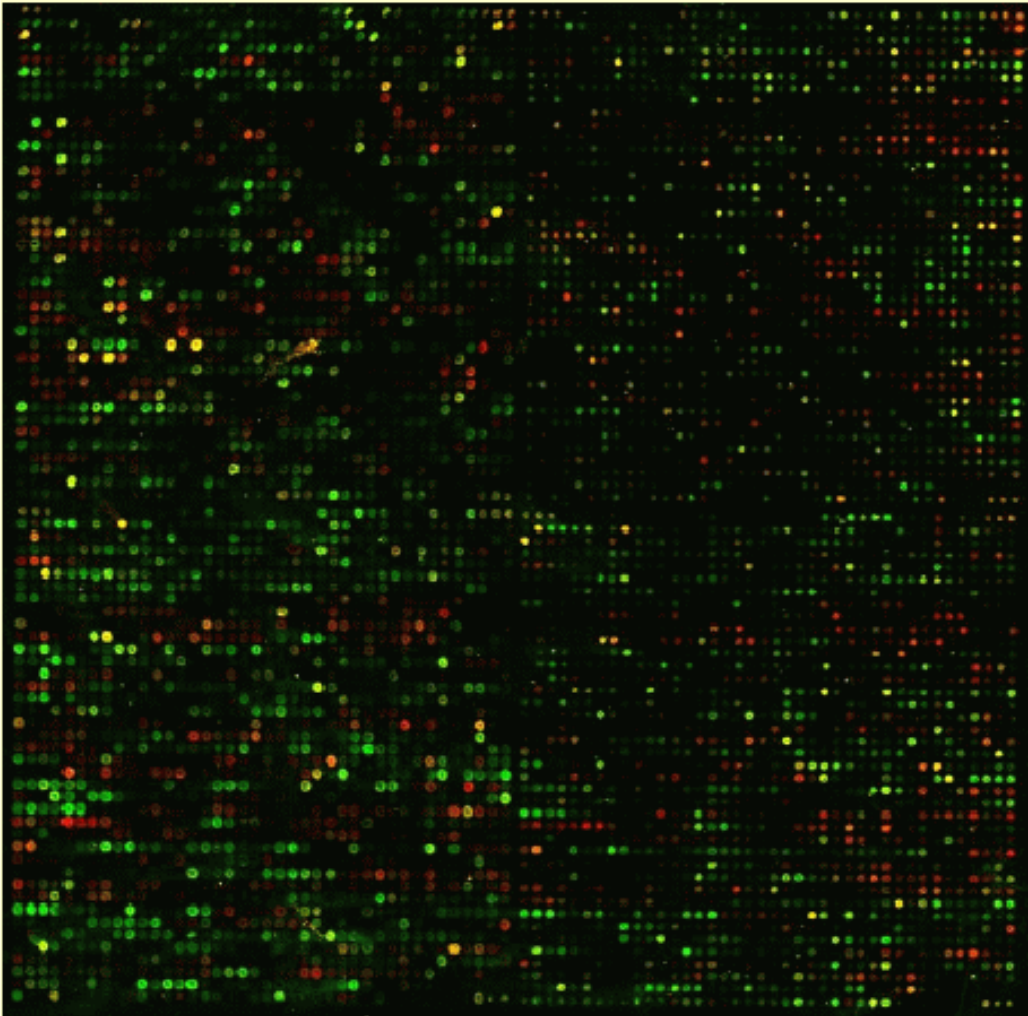
Northern Blotting (RNA)

Total RNA or poly A⁺ RNA

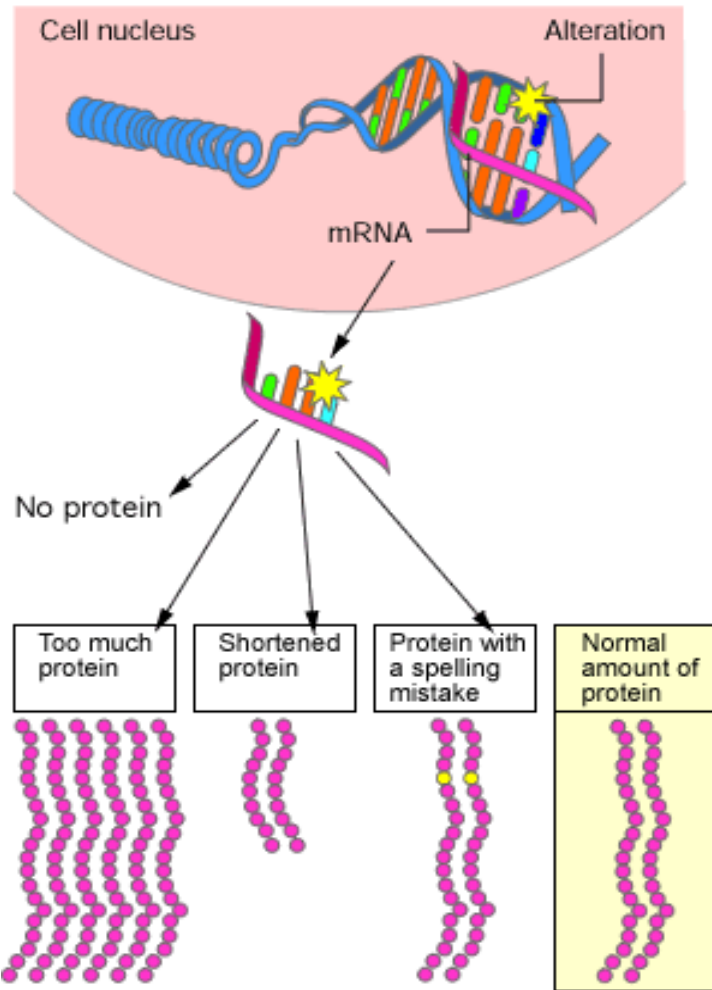


Il “Northern blot” è una tecnica usata per determinare in quale tessuto o tipo cellulare è espresso un gene, ed anche la lunghezza e la quantità di mRNA. I livelli di mRNA sono spesso correlati ai livelli di proteina presente nel tessuto.

Esperimenti di Microarray



*Permettono l'analisi
dell'espressione
genica di migliaia di
geni simultaneamente*



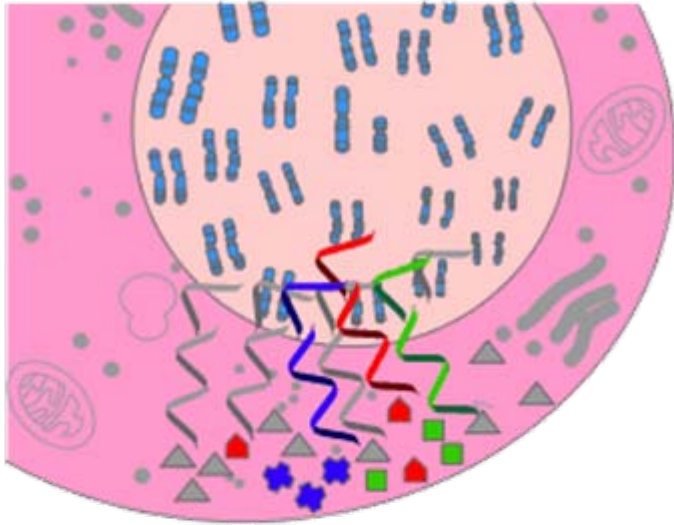
Artwork by Joanne Kelly © 2001.

Geni tumorali

Nei tessuti normali i geni contengono informazioni corrette, mentre nel tumore insorgono dei cambiamenti a livello del DNA. Alcuni dei geni, e di conseguenza le proteine da loro prodotte, non sono assemblati in modo corretto. Ad esempio, una proteina può non essere prodotta, essere prodotta in misura troppo elevata, contenere un numero diverso di aminoacidi o presentare delle alterazioni.

Tali alterazioni possono contribuire ad una crescita incontrollata ed allo sviluppo di un tumore.

Cellula di mammella, normale

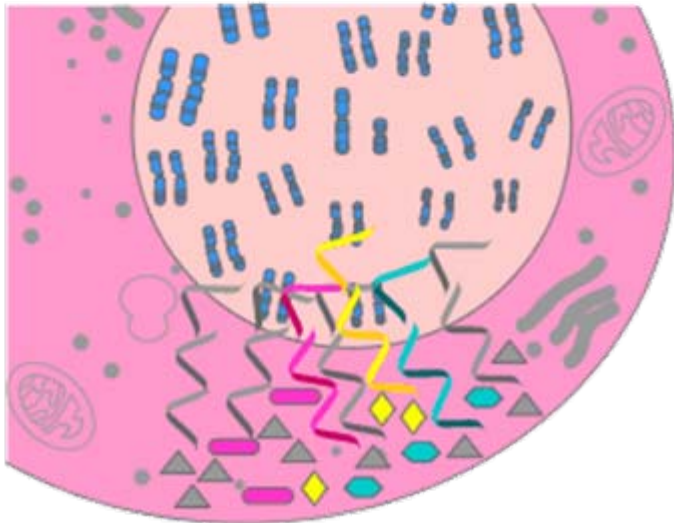


Profili di espressione genica

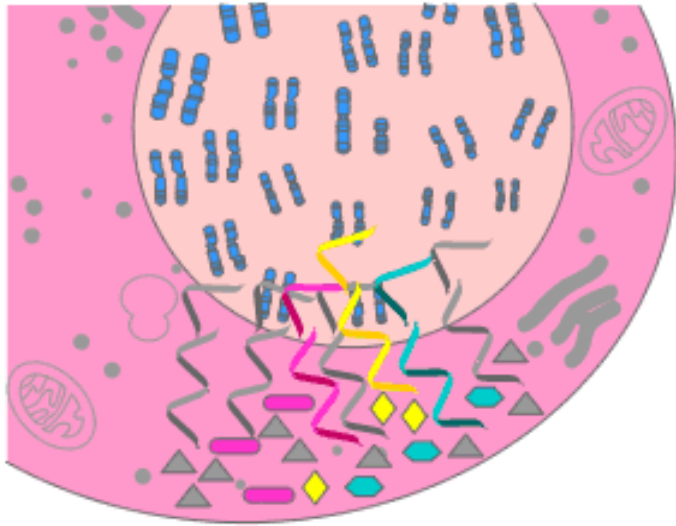
Nella cellula di un tessuto sono presenti tutti i geni del genoma, ma solo i geni caratteristici di quel tessuto sono attivati. Il profilo di espressione genica o “pattern di espressione” è l’insieme dei geni attivati in un tessuto.

In figura è riportato un esempio di due cellule normali appartenenti a tessuti diversi: sebbene contengano mRNA e proteine comuni, ciascuna di esse ha mRNA e proteine peculiari (rappresentate con colori diversi).

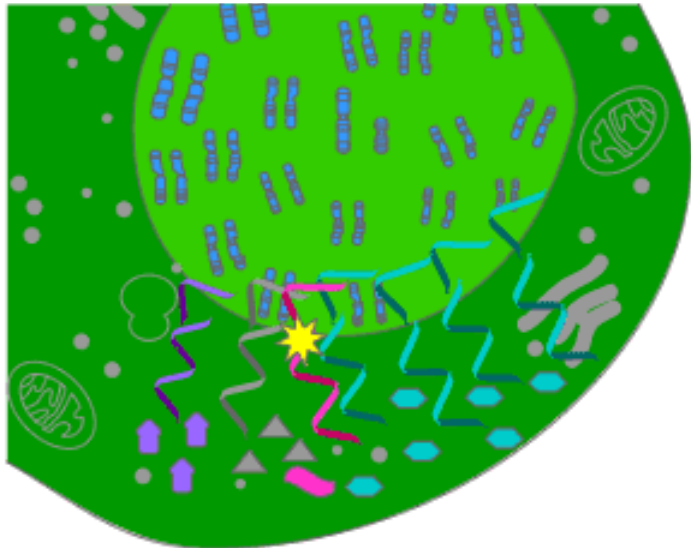
Cellula della prostata, normale



Cellula della prostata, normale



Cellula della prostata, tumorale



Profili di espressione genica nei tumori

E' possibile misurare le differenze tra un tessuto normale ed uno tumorale dello stesso tipo, analizzandone l'espressione genica. Mentre cellule normali di uno stesso tessuto presentano un identico profilo di espressione, quando insorge il tumore tale profilo varia.

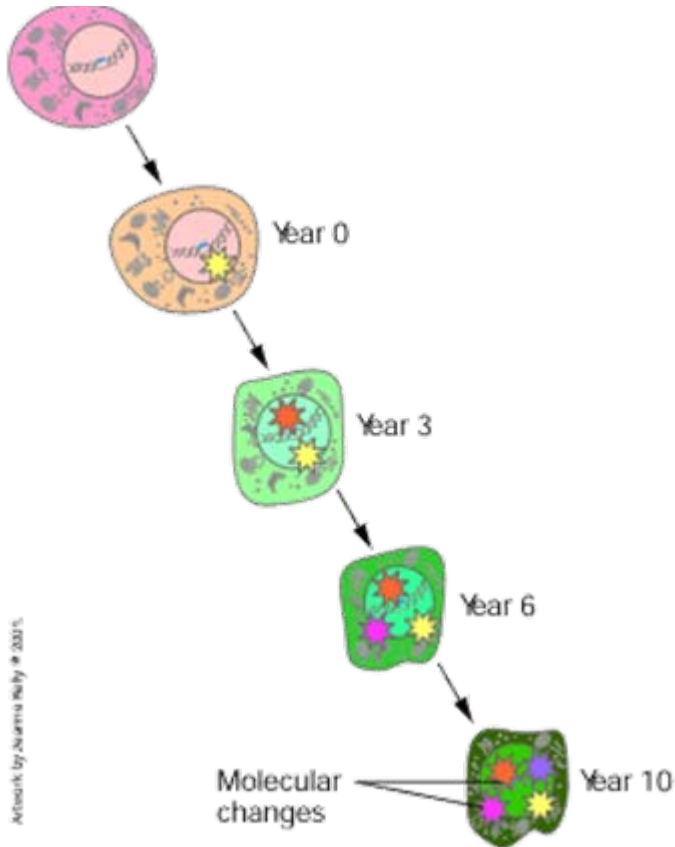
Le alterazioni dell'espressione genica possono causare variazioni nella produzione delle proteine o nella loro reciproca interazione.

Proteine fondamentali potrebbero non essere più disponibili, altre essere prodotte in eccesso oppure potrebbero nascere proteine del tutto nuove.

Le cellule tumorali derivano quindi da una combinazione di più variazioni a livello genico e proteico.

Trasformazione di una cellula normale in cellula tumorale

Cellula normale

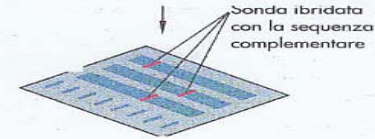


Cellula tumorale

Sappiamo che il cancro insorge quando una cellula subisce numerose variazioni molecolari. Queste variazioni hanno luogo nel corso di molti anni e solo quando la cellula non riesce più a controllare tutte le variazioni accumulate essa diventa una cellula tumorale.

TECNICHE PER L'ANALISI DELLA TRASCRIZIONE GENICA

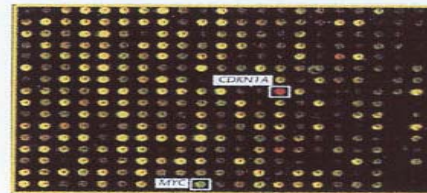
◆ NORTHERN BLOTTING



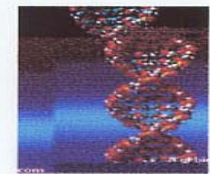
◆ REVERSE-TRANSCRIPTASE-POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR)



◆ MICROARRAYS



◆ MACROARRAYS



Analisi dei profili di espressione genica

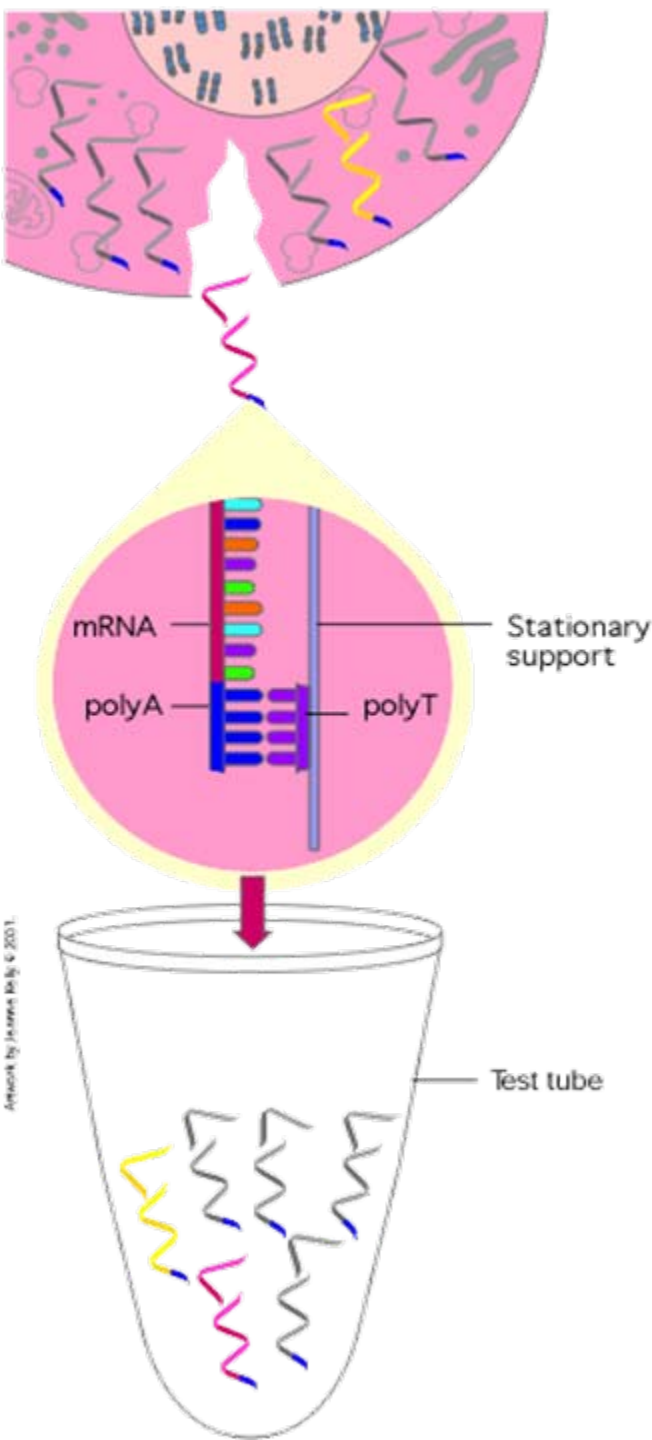
Oggi in generale è possibile seguire differenze dei livello di espressione di geni in tipi cellulari diversi oppure nello stesso tipo di cellula (normale e tumorale) attraverso la tecnica dei “microarrays”.

Questo procedimento è costituito da diverse fasi:

- 1) isolamento dell'mRNA**
- 2) conversione dell'mRNA in cDNA**
- 3) analisi del cDNA con microarrays**

1) Isolamento dell'mRNA

Per poter misurare l'mRNA è necessario innanzitutto separare le sue molecole da tutte le altre molecole cellulari. Ciascun mRNA contiene un' "etichetta" in una delle due estremità, chiamata "coda di polyA" e costituita da più adenine. Usando un supporto solido contenente una breve catena di timine (polyT), è possibile isolare l'RNA messaggero sfruttando l'appaiamento tra adenine e timine. Sfortunatamente le molecole di mRNA estratte non sono molto stabili e solitamente sono presenti in piccole quantità. Dopo aver isolato l'mRNA è quindi necessario trasformarlo in qualcosa di più stabile e facilmente misurabile.



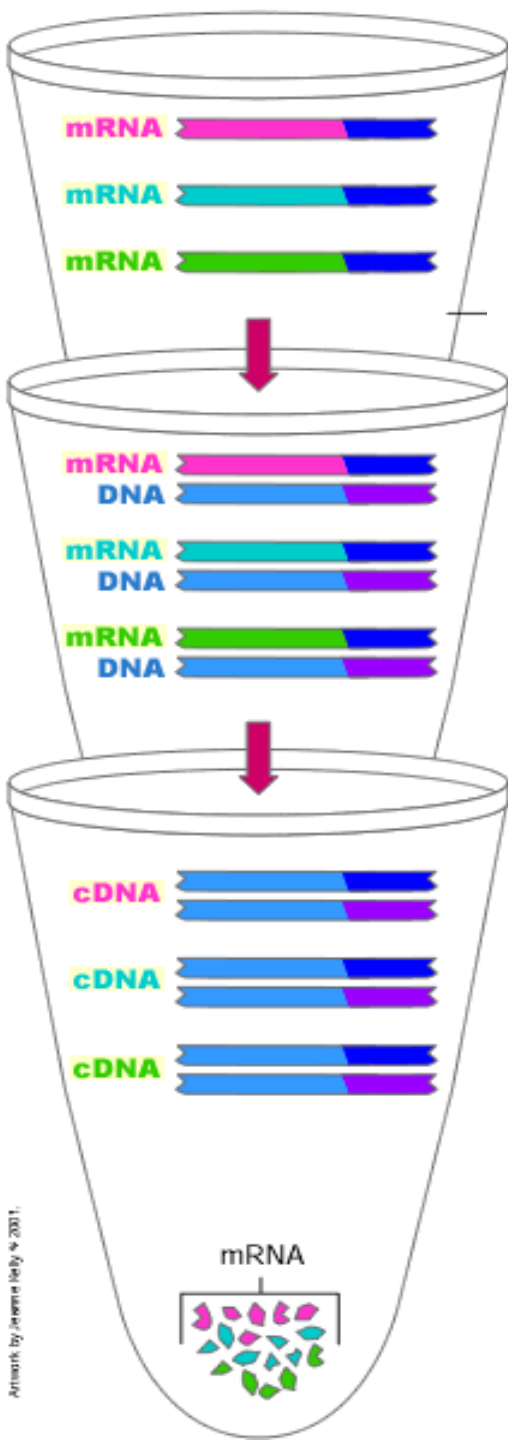
2) Conversione dell'mRNA in cDNA

Il passo successivo consiste nel convertire nuovamente l'mRNA in DNA. Ciò viene effettuato invertendo la trasformazione avvenuta a livello cellulare, quando il DNA di un gene è stato convertito in mRNA tramite il processo di appaiamento delle basi.

Inizialmente l' mRNA viene affiancato ad un insieme di basi di DNA; queste si accoppiano alle loro complementari sull'mRNA, dando origine ad un doppio filamento mRNA-DNA.

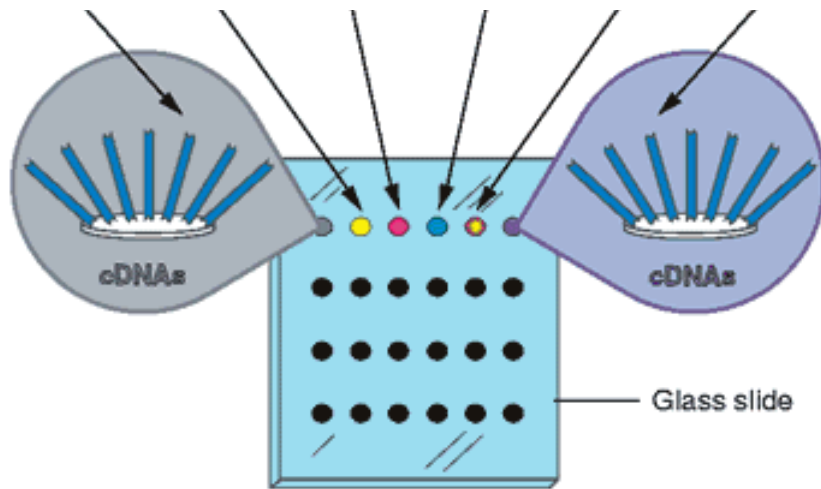
In seguito, l'mRNA viene rimosso ed il filamento di DNA rimanente viene utilizzato come stampo per costruire un doppio filamento, chiamato cDNA.

Ciascun cDNA corrisponde quindi ad uno specifico mRNA prodotto a livello cellulare.



I microarrays

In questo esempio i cDNA sono stati posizionati su di un vetrino, simile ai normali vetrini usati per l'istologia.

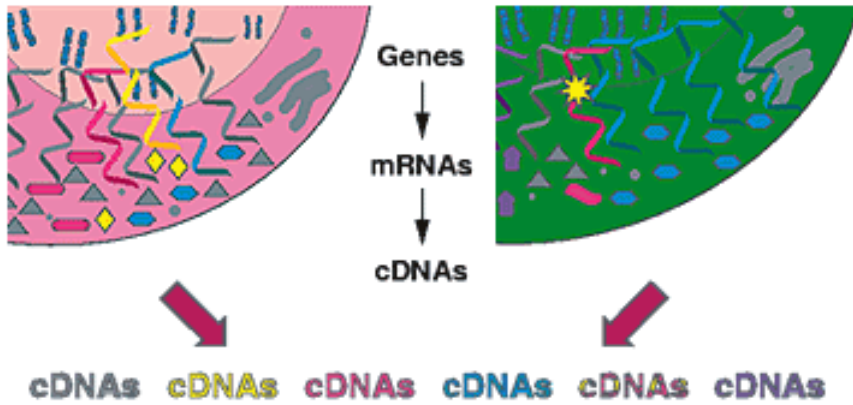


Un microarray è un supporto solido sul quale sono stati posizionati diverse migliaia di cDNA in spot separati. Ciascuno spot rappresenta un gene, in quanto contiene numerose copie di un cDNA corrispondente a tale gene.

L'utilizzo dei microarrays può aiutarci a capire quali geni sono attivati o disattivati in un tessuto, oppure come varia la loro espressione in risposta ad un trattamento specifico.

Tessuto della prostata,
normale

Tessuto della prostata,
tumorale



3) utilizzo dei microarrays

In un generico esperimento si confrontano i profili di espressione genica di due campioni differenti, come ad esempio cellule normali e tumorali di uno stesso organo oppure cellule tumorali analizzate prima e dopo il trattamento.

E' necessario estrarre le molecole di mRNA dai due campioni ed eseguire delle procedure che ne permettano la distinzione, la misura ed il confronto.

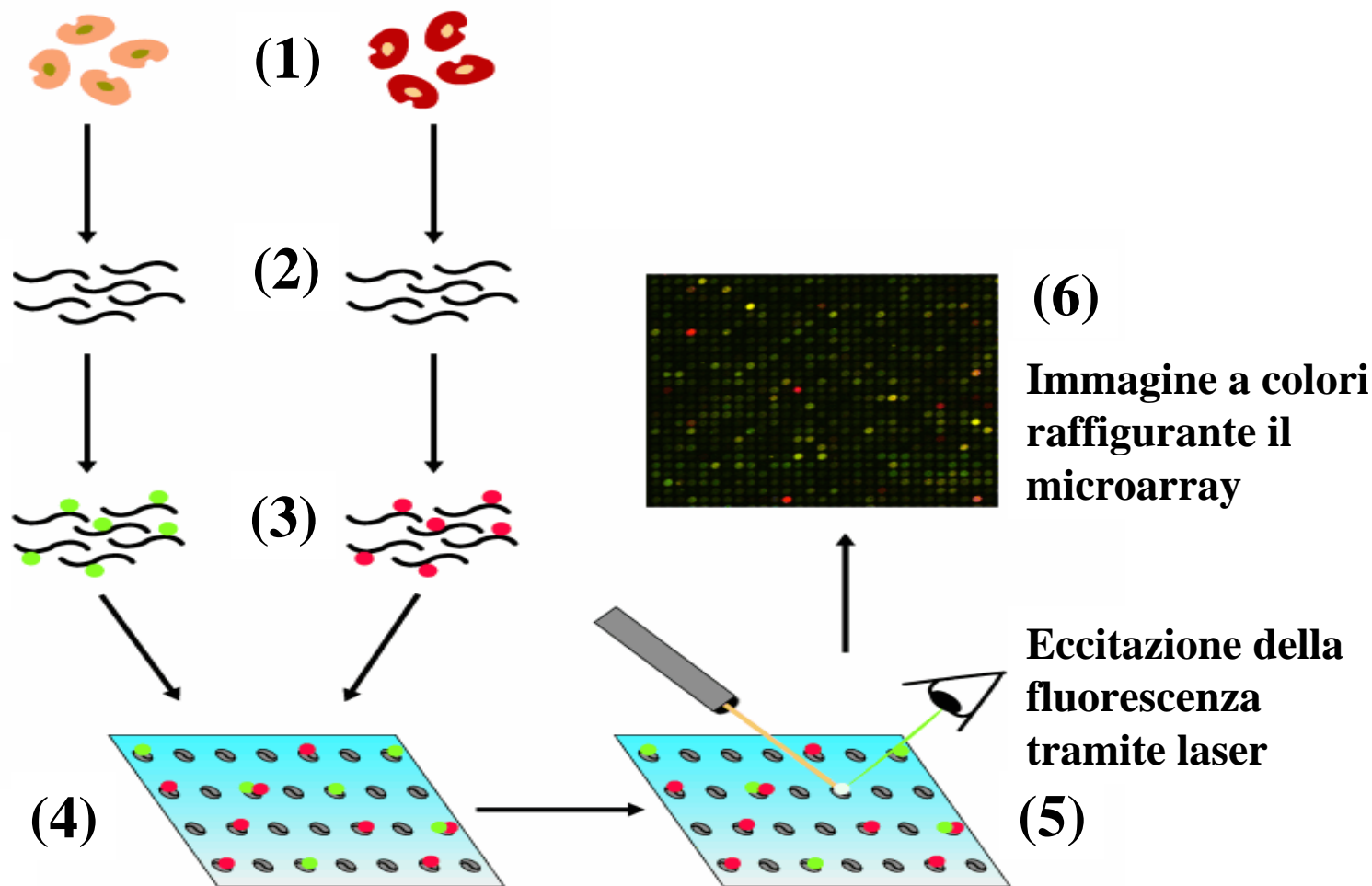
Confronto dei profili di espressione genica in due campioni cellulari diversi

Estrazione dell'mRNA dai 2 campioni di cellule che si vogliono confrontare

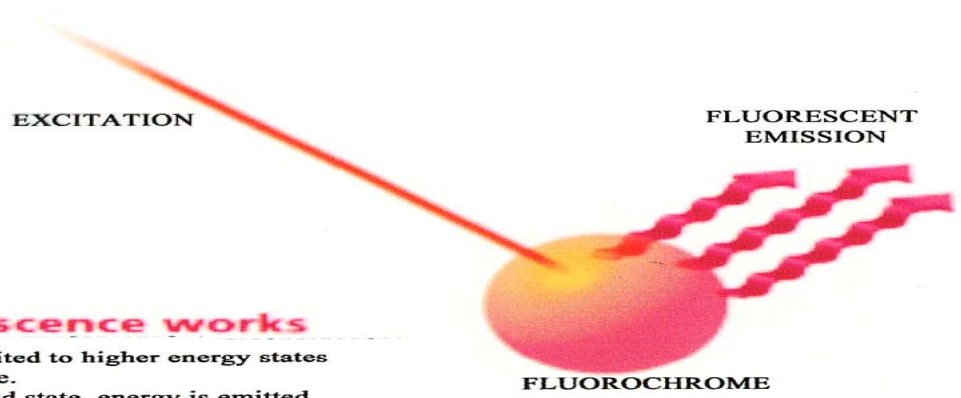
Conversione in cDNA

Marcatura con 2 fluorocromi diversi

Riconoscimento tra i cDNA provenienti dai 2 campioni e quelli già presenti sul microarray

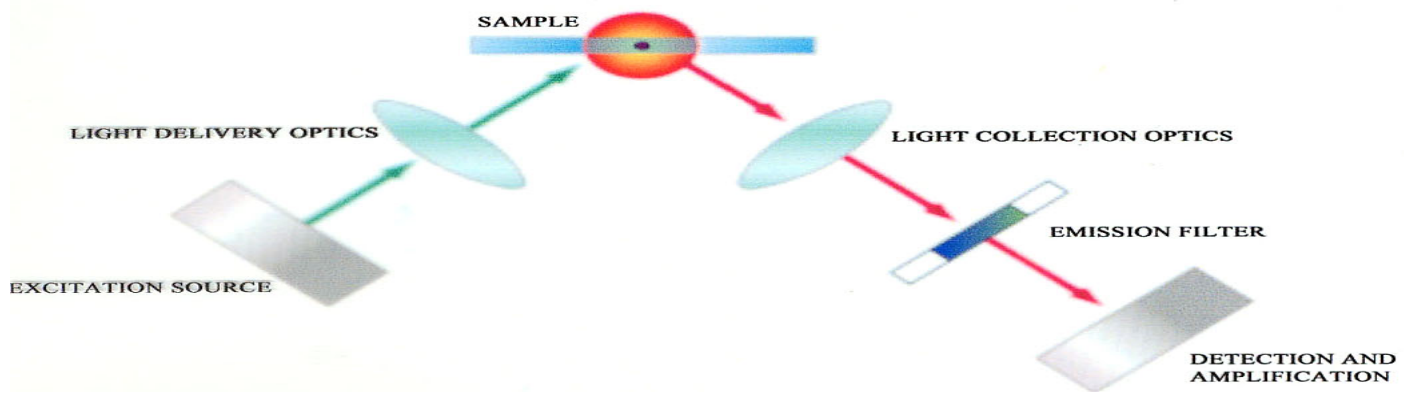


FLUORESCENCE IMAGING SYSTEM



How fluorescence works

Fluorochromes are excited to higher energy states by the laser light source. As they return to ground state, energy is emitted as light of a longer wavelength. The detection system collects and quantitates the emitted fluorescent light.



IBRIDAZIONE SPECIFICA DI DUE MOLECOLE DI DNA

Affinché l'ibridazione tra due molecole di DNA a singolo filamento sia **specifica**, bisogna considerare diversi fattori:

- ✓ Lunghezza delle due molecole di DNA
- ✓ Sequenza delle molecole di DNA
- ✓ Temperatura di ibridazione
- ✓ Concentrazione dei sali presenti in soluzione
- ✓ Concentrazione delle molecole di DNA nella soluzione di ibridazione
- ✓ Durata della reazione di ibridazione

Frammenti genici (sonde) adesi al supporto

	G	C	MYC A
	C	C	C
	G	T	G
AT ₁	G	G	G
	T	T	T
	T	T	T
	A	A	A
	C	A	A
	A	A	A
	G	C	C
	C	C	C

Filtro in nylon o vetrino

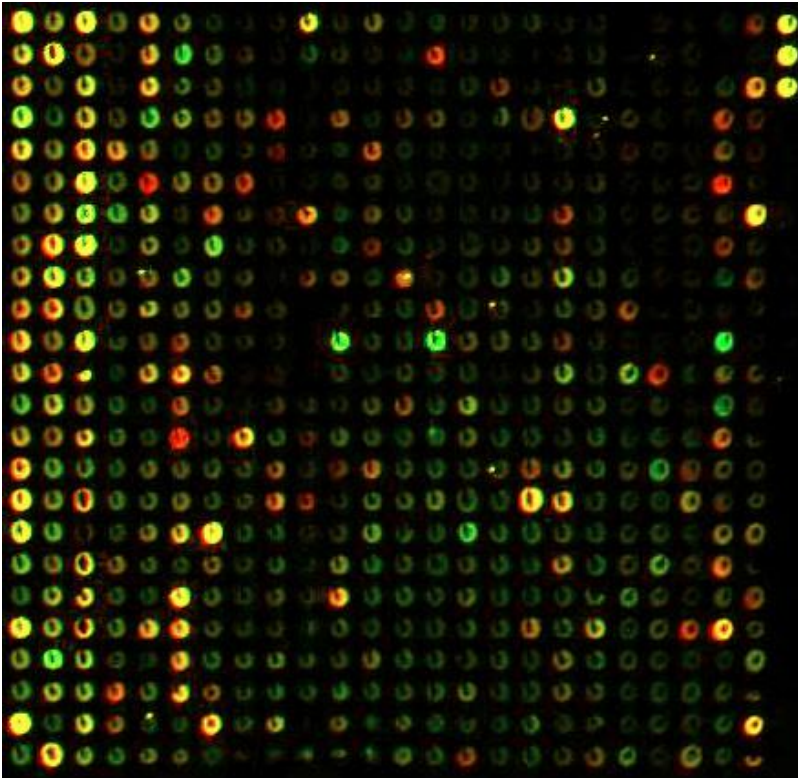
Nucleotide marcato con Cye3, Cye5 o ³²P

	T*
	G
Mix	C
cDNA	C
	A
	A*
	T*
	T*
	G
	G

Ibridazione specifica

A	—	T*
C	—	G
G	—	C
G	—	C
T	—	A
T	—	A
A	—	T*
A	—	T*
A	—	T*
C	—	G
C	—	G

Confronto dei profili di espressione genica in due campioni cellulari diversi

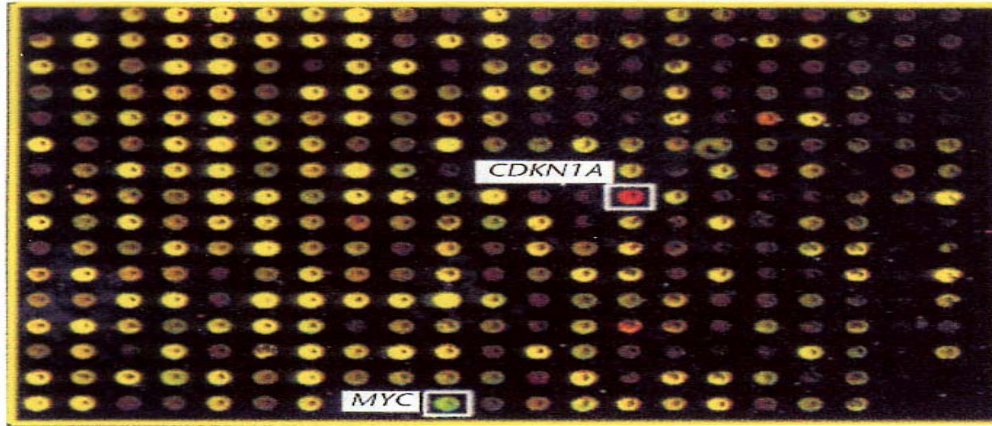


I puntini **gialli** corrispondono a geni che sono espressi in uguale quantità nei due campioni.

I puntini **verdi** corrispondono a geni maggiormente espressi nel campione marcato col fluorocromo che emette fluorescenza verde (ad esempio nelle cellule tumorali prima del trattamento).

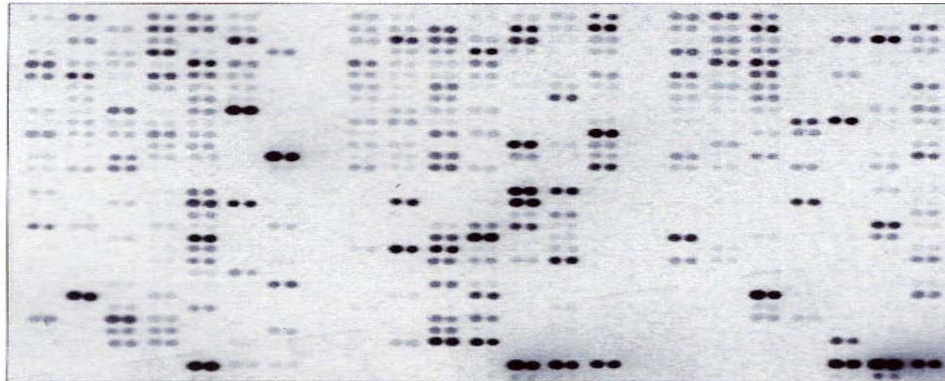
I puntini **rossi** corrispondono a geni che sono maggiormente espressi nel campione marcato col fluorocromo che emette fluorescenza rossa (ad esempio nelle cellule tumorali dopo il trattamento).

MICROARRAYS



- ✓ Marcatura dei cDNA target con i fluorocromi Cy3 e Cy5
- ✓ Ibridazione simultanea dei due target sullo stesso vetrino
- ✓ E' necessaria una maggiore quantità di RNA rispetto ai Macroarrays

MACROARRAYS



- ✓ Marcatura dei cDNA target con ^{32}P o ^{33}P
- ✓ Ibridazione dei due target su due filtri di nylon diversi
- ✓ E' necessaria una minore quantità di RNA rispetto ai Microarrays

MICROARRAYS

VANTAGGI:

- Analisi dell'espressione di circa 7-10000 cDNA in un unico esperimento
- Ibridazione contemporanea dei due pool di cDNA estratti da due campioni biologici diversi sullo stesso vetrino grazie alla marcatura con due fluorocromi diversi (Cye3 e Cye5)

SVANTAGGI:

- E' necessaria una elevata quantità di RNA di partenza (circa 100 µg di RNA totale o 1 µg di RNA polyA+) a causa della minore energia legata alla fluorescenza)
- I costi sono molto elevati
- Spesso molti dei 7-10000 frammenti di DNA legati alla superficie del vetrino corrispondono a geni la cui funzione non è stata ancora identificata

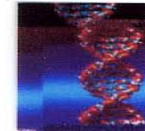
MACROARRAYS

VANTAGGI:

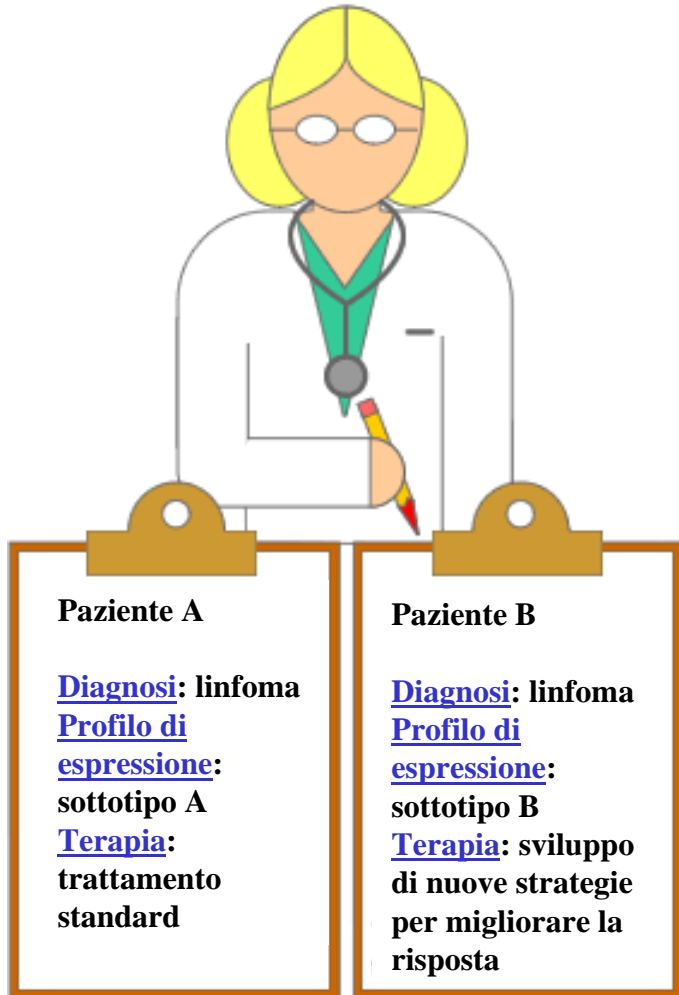
- E' sufficiente una bassa quantità di RNA di partenza (circa 1 µg di RNA totale o 10 ng di RNA polyA+) a causa della maggiore energia delle radiazioni emesse da ^{32}P o da ^{33}P)
- I costi sono meno elevati dei microarrays
- La maggior parte dei frammenti di DNA legati alla superficie del vetrino corrispondono a geni la cui funzione è nota

SVANTAGGI:

- Ibridazione dei due pool di cDNA estratti da due campioni biologici diversi su due diversi filtri di nylon o sullo stesso filtro dopo deibridazione del primo pool.
- Analisi dell'espressione di non più di 1300 cDNA in un unico esperimento



Utilizzo dei microarrays nella classificazione dei tumori



Recentemente i microarrays sono stati utilizzati per ottenere informazioni utili nella classificazione dei tumori.

Si è scoperto che alcuni tumori possono essere caratterizzati, a livello molecolare, da più sottotipi di cellule tumorali, che rispondono in maniera diversa ai trattamenti standard.

La tecnica dei microarrays

Si tratta di una tecnica molto promettente che richiede un grande sforzo, sia dal punto di vista sperimentale sia dal punto di vista dell'analisi dei dati.

Dalla lettura di un singolo microarray vengono generati circa centomila valori, che senza un adeguato approccio matematico risulterebbero incomprensibili.

La complessità di questo tipo di studio richiede l'interazione tra diverse competenze (matematico-statistica, informatica, biologica, medica,...).

Utilizzo dei microarrays in studi pre-clinici

Attualmente si stanno utilizzando microarrays in studi pre-clinici su cellule tumorali in vitro per valutare quali geni vengono modulati in seguito a trattamenti con farmaci.

Lo studio dell'espressione genica può fornire informazioni utili sul meccanismo d'azione di nuovi farmaci e sui meccanismi di resistenza sviluppati dalle cellule.

L'obiettivo finale consiste in un utilizzo mirato e razionale dei farmaci testati, dopo aver individuato i tipi cellulari ad essi più sensibili.

Utilizzo dei microarrays in studi clinici

Lo studio dell'espressione genica può fornire informazioni utili sulle diversità molecolari di tumori appartenenti alla stessa classe e sulle caratteristiche individuali legate al profilo di espressione genica dei diversi pazienti.

L'obiettivo finale consiste in un utilizzo più mirato e razionale dei farmaci in fase di sperimentazione, dopo aver individuato i tipi tumorali ad essi più sensibili ed i pazienti che possono beneficiare maggiormente di nuove terapie.