

Lezione 5-6 3 Novembre 2009

corso di genomica
a.a. 2009/10

aula 6a ore 14.00-16.00

corso di laurea specialistica
magistrale Biotecnologia

andata e ritorno

l'informazione arriva all'informatore e riparte
(difficile separare i ruoli nel ciclo continuo)

è un artificio porre un inizio e scegliere lo zigote come
start-point

la trasduzione del segnale mette in comunicazione le varie
parti della cellula e quindi dell'organismo

ogni punto di un ciclo può essere scelto come inizio o fine

adesso prendiamo il genoma come nostro riferimento

come possiamo approcciare il genoma in maniera globale

la post genomica

dopo il sequenziamento dei genomi interi

ancora una volta si scopre di non sapere

è l'inizio del salto verso la genomica regolativa /
o del genoma non tradotto

forse una parte del trascrittoma non è ben noto

è riduttivo credere che si conosca il genoma solo dalla
porzione codificante

post genomica non significa che la genomica sia superata

approcci globali e olistici

nuove metodologie

trascrittoma

proteoma - interattoma

ma il restante 95%?

95% ? wide genome screening

screening con tecniche diverse

studio nuovo

cosa si può analizzare

in che maniera

genomica obbligatoriamente porta al confronto tra i vari possibili organismi modello

centralità del modello umano oppure riferimento al modello umano

ricerca di modelli per trovare semplificazioni e generalizzazioni

cosa si vuole vedere ?

strutture e variabilità

micro-arrays per ibridazione

resequencing shot-gun parziali o globali

SNPs e VNR

ogni 500 bp del genoma

i vari approcci

i diversi modelli permettono di produrre i nuovi approcci e le diverse tecniche

dalle domande generali a quelle più specifiche o ai meccanismi sottostanti

allargare l'interattoma anche alla interazione col genoma

pensare in maniera globale

cercare di essere onnicomprensivi (presuntuoso ma necessario)

il problema globale

rischio di genericità tutto o niente

lo studio con le libraies è stato l'inizio

i metodi globali: osservazioni col grand'angolo

necessità di non perdere anche i particolari

guardare dal satellite ma con una risoluzione altissima

osservazione diretta e indiretta

in quasi tutte le scienze si passa alla osservazione indiretta

il DNA o le proteine non le vediamo, abbiamo prove
indirette

ci fidiamo delle osservazioni indirette ed il metodo passa
attraverso l'uso dei controlli ossia della contraffabilità del
risultato

convergenza delle osservazioni e riprove

l'uso di organismi modello come riprova della universalità

osservazioni riproposte anche su organismi di specie diverse

difficoltà di riscontrare patologie in organismi molto diversi

possibilità di osservare fenotipi simili in organismi anche molto diversi

generalità di un fenomeno

troppi esempi

a riprova dell'universalità dei promotori eucariotici e procariotici : tutti i costrutti inducibili o costitutivi transfettati

cosa possiamo fare per capire il genoma nell'era post-genomica

mantenere la capacità di analisi nelle interazioni/variazioni

nel contesto e fuori contesto

in vitro veritas

fenotipi mutanti e polimorfismi

dove si guarda

cercando le funzioni genomiche

creazione di esche per trovare con cosa interagiscono

riprova in vivo con l'organismo transgenico per una conferma

approccio simmetrico

da un fenotipo ricerca del fenomeno da riprodurre in vitro

verificare se lo stesso costrutto interagisce con le stesse proteine

tentativi non sempre di successo con two hybrid systems
le tecniche hanno delle approssimazioni

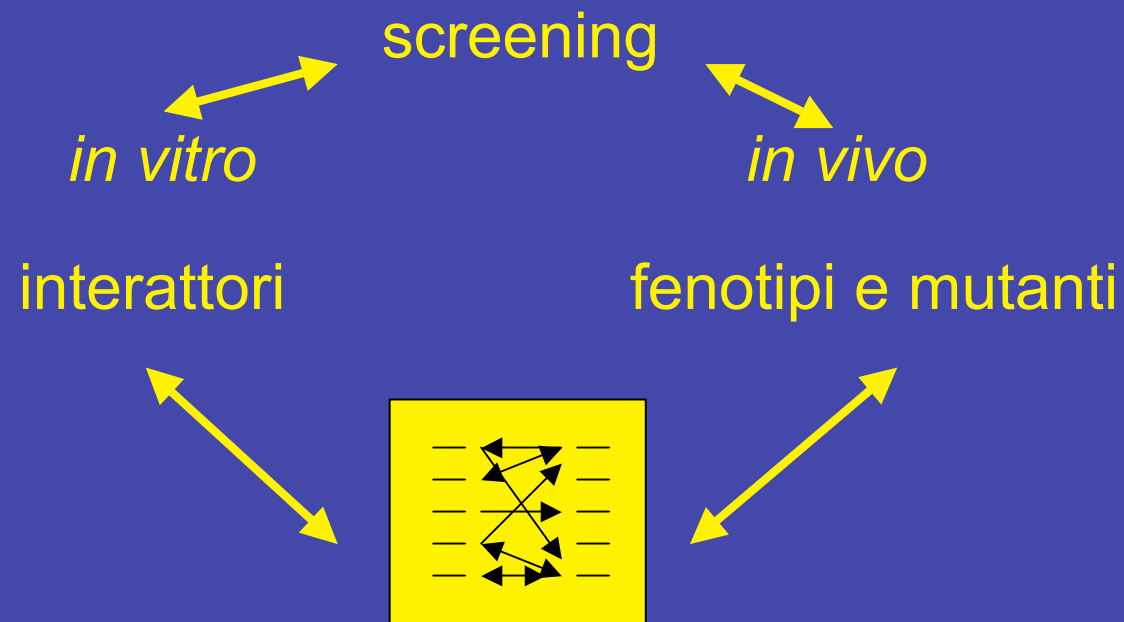
esca e oggetto interagente

dal *vitro* al *vivo*

il sistema biologico dinamico e interattivo

i metodi globali

cercare chi interagisce



dal lato fenotipo / mutanti

analisi dei fenotipi (organismi dall'ambiente)

produzione e analisi dei mutanti (per supplire ai fenotipi degli organismi di laboratorio)

sempre un fenotipo si analizza

analizzare le interazioni

se un sistema è dinamico non se ne può prescindere

analisi causa effetto

dall'analisi descrittiva dei fenomeni all'interpretazione
dei meccanismi

esempio topo / uomo

due genomi conosciuti

mutanti umani spontanei polimorfismi già esistenti

mutanti di topo indotti

studi per differenza di fenotipi (espressione ed analisi ai diversi livelli con metodi di indagine diversa)

modello umano

mutanti a disposizione: genetica di popolazione
analisi di linkage

approccio globale: analisi genomica globale

“wide genome screening” in che consiste come è possibile”

applicazione di tecniche diverse per lo screening

punto di partenza: conoscenza dei polimorfismi

polimorfismi = mutazioni fissate

mappaggio dei polimorfismi

analisi dei polimorfismi con stessi strumenti e tecniche

polimorfismi più comuni: SNPs e VNTR

come si possono pescare nel genoma:

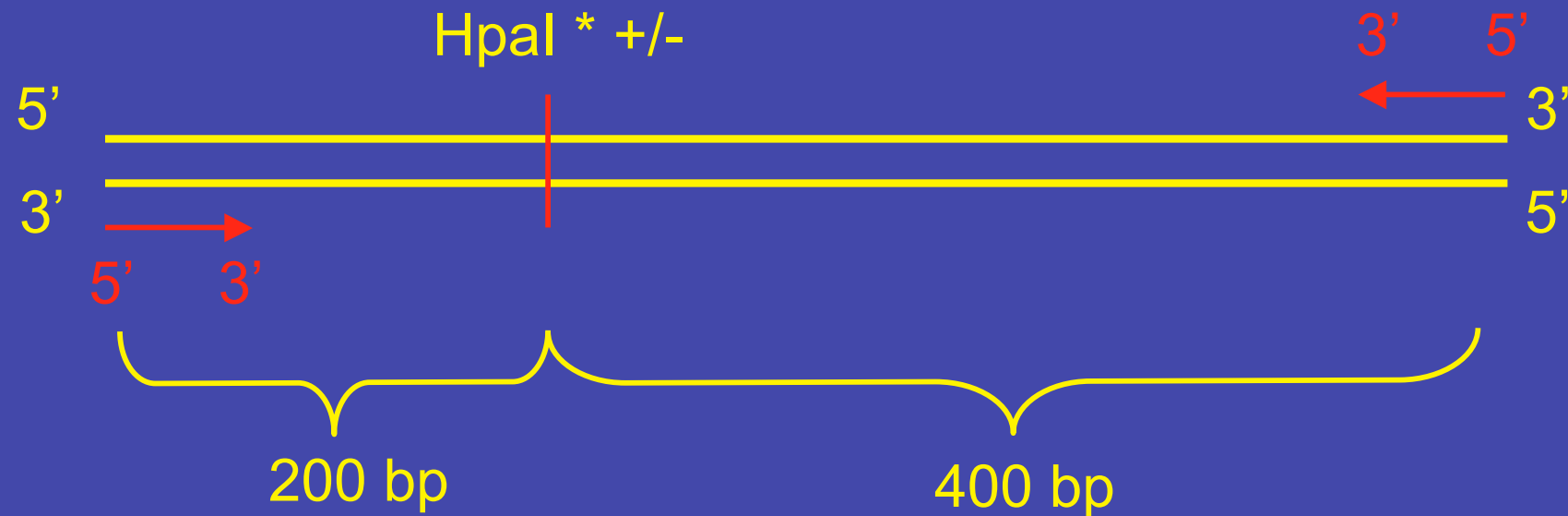
- PCR e digestione del sito polimorfico
- primer extension (solo su sequenza + e non -)
- appaiamento dell'oligo e PCR
- PCR e ibridazione su chips
- PCR e resequencing

PCR e digestione del sito polimorfico

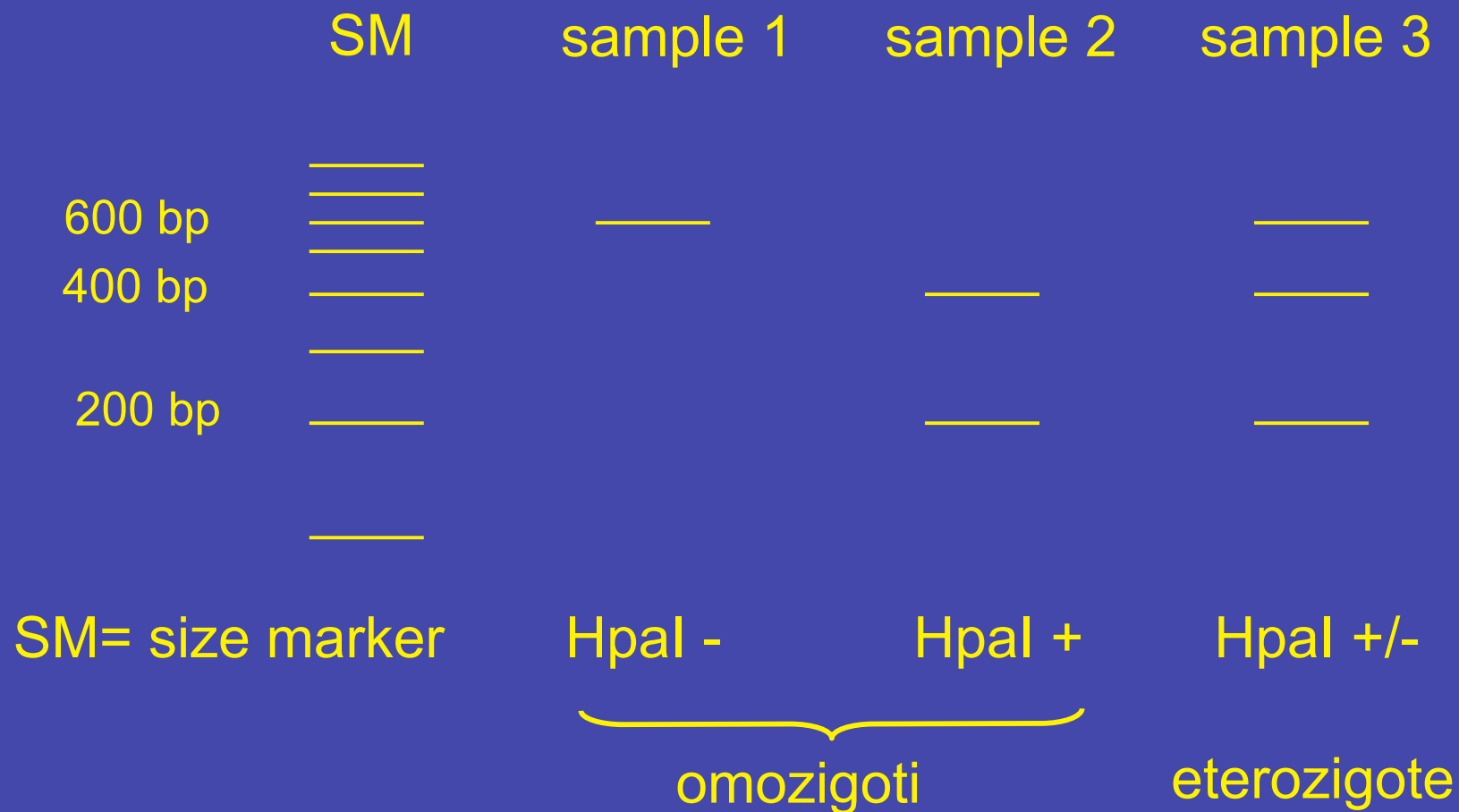
HpaI GTT'AAC

n

600 bp



rilevazione per elettroforesi



primer extension - appaiamento dell'oligo e PCR

effetto simile con tecniche diverse

estensione / non estensione (polimerasi normale, Klenow)

amplificazione / non amplificazione (PCR)

PCR su piastra o ibridazione su chips

metodo globale con maggior output

dipende dal numero di PCR possibili su piastra e multiplex

analisi di singoli genomi per molti siti polimorfici:

analisi di amplificazione su piastra per fluorescenza
tipo real time

analisi per ibridazione su chips con le sequenze genomiche
polimorfiche preamplificate

PCR e resequencing

amplificazione dei frammenti da sequenziare per i siti polimorfici

sequenziamento con metodo classico Sanger

sequenziamento con ibridazione su microchips con oligos polimorfici (fluorescenza)

sequenziamento shot-gun degli interi prodotti tramite chips ed oligos-adapters legati a palline (micro-beads) aggiunte successive di nucleotidi fluorescenti

produzione di mutanti

processo analogo

produzione di mutanti per ottenere fenotipi nuovi

da cellule in coltura o da cellule staminali per ottenere topi transgenici

metodo di mutagenesi

esempio: ENU ethyl-nitroso urea

ottenuti i topi inizia lo screening dei fenotipi di interesse

analisi di genomica funzionale “delle interazioni”

quale punto di arrivo

in questi approcci si risale dai fenotipi ai genotipi

ricerca dei genotipi corrispondenti tramite dei marcatori
o con confronti dei marcatori