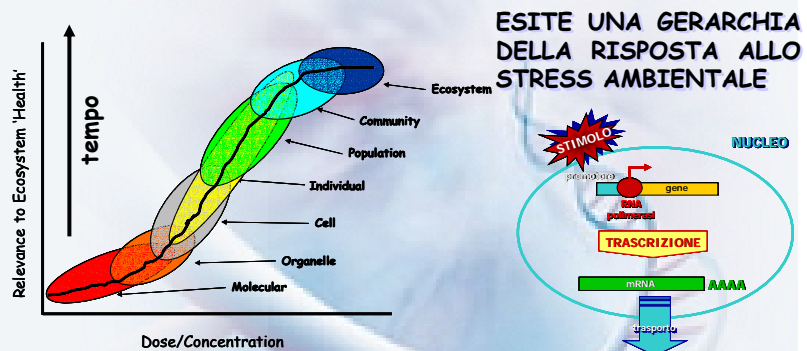


Il biomonitoraggio ambientale attraverso lo studio della regolazione genica della risposta allo stress

Silvia Franzellitti

Perché utilizzare lo studio dell'alterazione dell'espressione genica nella tossicologia ambientale?



Le modificazioni a livello molecolare rappresentano il primo stadio, estremamente precoce, della serie di eventi che governano i meccanismi di risposta.

Metodi per lo studio dell'espressione genica

Basati sull'ibridazione degli acidi nucleici →

Basati sulla PCR
(*Reazione a catena della DNA polimerasi*) →

Southern/Northern blotting
Ibridazione *in situ*
Microarray a DNA/cDNA

RT-PCR
PCR semi-quantitativa
PCR *real-time*

S. Franzellitti - Il biomonitoraggio ambientale attraverso lo studio della regolazione genica della risposta allo stress

Ibridazione

A-T

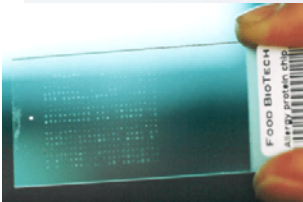
Adenine Thymine

G-C

Guanine Cytosine

S. Franzellitti - Il biomonitoraggio ambientale attraverso lo studio della regolazione genica della risposta allo stress

TECNOLOGIA DEL MICROARRAY



CHIP GENICI

Supporti in vetro su cui sono collocati in posizioni definite dei frammenti di DNA.

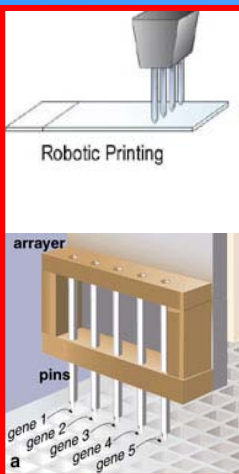
Ogni posizione (*spot*) rappresenta un singolo gene.

Ogni vetrino può contenere svariate migliaia di *spot*




S. Franzellitti - *Il biomonitoraggio ambientale attraverso lo studio della regolazione genica della risposta allo stress*

Preparazione dei microarray (spottaggio)




Preparazione dei campioni

controllo



trattato



Isolamento dell'mRNA

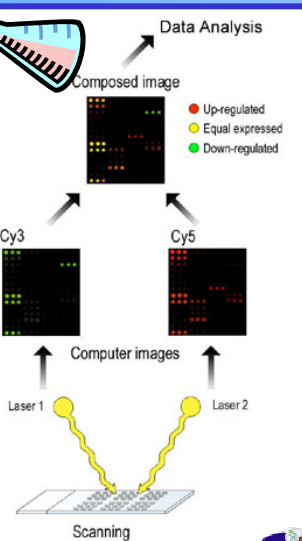
Retrotrascrizione e marcatura dei cDNA

Cy3-dCTP

Cy5-dCTP

ibridazione

Acquisizione e analisi delle immagini



S. Franzellitti - *Il biomonitoraggio ambientale attraverso lo studio della regolazione genica della risposta allo stress*

Mytox-chip


Un microarray per studiare la risposta allo stress in *M. galloprovincialis*

2 SOTTO-ARRAYS con 50 oligonucleotidi spottati su un supporto in vetro "attivato" di dimensioni 26 mm x 76 mm

I 50 oligonucleotidi rappresentano i 25 geni: 2 spots diversi per ogni gene in esame


| | | | | | | | | |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|
| 1 | actin #1 | mrp #1 | mrp #2 | mrp2 | mrp2 | lysoz #1 | lysoz #2 | actin #2 |
| 2 | myt1-b #1 | myt1-b #2 | myt1-a #1 | myt1-a #2 | mgd1 | mgd1 | hsp70 #1 | hsp70 #2 |
| 3 | hsp27 | hsp27 | mvp | mvp | gat-pi #1 | gat-pi #2 | hsp70 #1 | cyp4 |
| 4 | cyp4 | cat #1 | cat #2 | r185 #1 | kra | kra | helic #1 | helic #2 |
| 5 | cyp-A | cyp-A | gaba #1 | gaba #2 | p53 #1 | p53 #2 | mt20 #1 | mt20 #2 |
| 6 | mt10 #1 | mt10 #2 | h1 #1 | h1 #2 | h2_a #1 | h2_a #2 | h4 #1 | r185 #2 |
| 7 | r289 #1 | h4 #2 | r289 #2 | hsp27 | hsp27 | actin #2 | | |

S. Franzellitti - Il biomonitoraggio ambientale attraverso lo studio della regolazione genica della risposta allo stress



Hg²⁺ (750 nM)


NSO (0.5ppm)

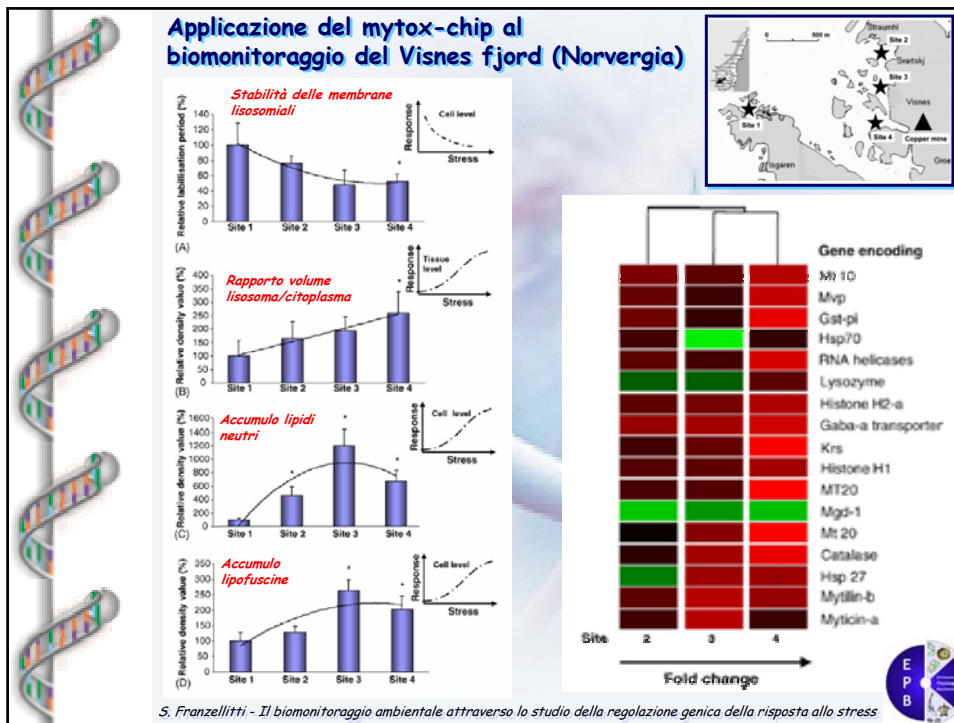


| Gene reporter ID | Normalized expression | SD | p-value |
|------------------|------------------------|------|----------|
| Mt20#1 | 6.48 (1.156 to 38.86) | 1.36 | 0.0107 |
| h2_a#2 | 2.80 (2.646 to 2.976) | 0.06 | 0.00109 |
| Mt20#2 | 2.54 (0.77 to 9.989) | 1.01 | 0.0495* |
| Mt10#2 | 1.87 (1.085 to 2.328) | 0.25 | 0.000589 |
| h2_a#1 | 1.47 (0.65 to 2.854) | 0.30 | 0.0232 |
| Mt10#1 | 1.42 (0.828 to 1.847) | 0.28 | 0.0163 |
| h1#1 | 0.51 (0.426 to 0.757) | 0.06 | 0.00296 |
| gat-pi#1 | 0.48 (0.23 to 0.698) | 0.08 | 0.00162 |
| Actin#1 | 0.47 (0.373 to 0.658) | 0.05 | 0.000148 |
| Lysoz#2 | 0.41 (0.221 to 0.72) | 0.08 | 0.00254 |
| h1#2 | 0.40 (0.233 to 0.785) | 0.07 | 0.00154 |
| mrp2 | 0.39 (0.291 to 0.739) | 0.05 | 0.00166 |
| Actin#2 | 0.37 (0.238 to 0.517) | 0.03 | 1.55e-5 |
| Lysoz#1 | 0.37 (0.153 to 0.645) | 0.08 | 0.00468 |
| Myt1_a#2 | 0.29 (0.0859 to 1.034) | 0.09 | 0.0199 |
| myt1_b#1 | 0.27 (0.147 to 0.561) | 0.04 | 0.00178 |
| myt1_a#1 | 0.20 (0.125 to 0.26) | 0.01 | 0.0025 |
| myt1_b#2 | 0.19 (0.111 to 0.523) | 0.02 | 0.000889 |

| Gene reporter ID | Normalized expression | SD | p-value |
|------------------|-------------------------|------|----------|
| Cat#2 | 1.233 (0.992 to 1.691) | 0.22 | 0.0431* |
| Myt1_b#1 | 0.724 (0.267 to 0.976) | 0.27 | 0.0434* |
| Hsp70#2 | 0.678 (0.435 to 0.942) | 0.18 | 0.0141 |
| Lysoz#2 | 0.667 (0.477 to 0.925) | 0.09 | 0.00157 |
| Hsp70#1 | 0.657 (0.292 to 0.952) | 0.13 | 0.0194 |
| Mt10#2 | 0.647 (0.528 to 0.855) | 0.11 | 0.00116 |
| Mt10#1 | 0.622 (0.388 to 0.801) | 0.06 | 0.00256 |
| Myt1_b#2 | 0.605 (0.229 to 1.022) | 0.18 | 0.03840 |
| Mt20#1 | 0.577 (0.244 to 0.866) | 0.15 | 0.0109 |
| P53#2 | 0.567 (0.322 to 0.807) | 0.13 | 0.0323* |
| Helic#2 | 0.566 (0.349 to 1.133) | 0.14 | 0.0128 |
| Mvp | 0.54 (0.325 to 1.54) | 0.15 | 0.01 |
| Mrp2 | 0.512 (0.174 to 0.744) | 0.07 | 0.000002 |
| Actin#1 | 0.495 (0.279 to 1.007) | 0.10 | 0.00206 |
| Actin#2 | 0.477 (0.0967 to 0.896) | 0.09 | 0.000648 |

S. Franzellitti - Il biomonitoraggio ambientale attraverso lo studio della regolazione genica della risposta allo stress





I METODI BASATI SULLA REAZIONE A CATENA DELLA DNA POLIMERASI (PCR)

Estensione

Permette l'amplificazione selettiva di singoli tratti genici, cioè la produzione *in vitro* di un elevato numero di copie di una specifica sequenza di DNA.

La PCR si basa sulle proprietà dell'enzima DNA polimerasi di ripetere *in vitro* ciò che accade normalmente *in vivo* durante il processo di duplicazione del DNA, ossia la sintesi di nuovi filamenti complementari ad un filamento stampo, e sulla possibilità di mirare tale sintesi ad uno specifico tratto di DNA scegliendo opportunamente gli inneschi o *primer*.

I *primer* sono oligonucleotidi sintetici lunghi 10-30 pb, complementari alle regioni fiancheggianti il frammento genico da amplificare. Appaiandosi a tali regioni, i *primer* costituiscono un piccolo tratto di DNA a doppia catena, dal quale la DNA polimerasi può iniziare la sintesi, ossia formazione di legami fosfodiesterici tra l'estremità 3' del segmento iniziatore e il dNTP complementare allo stampo.

LA PCR SEMI-QUANTITATIVA

Elettroforesi

Analisi d'immagine

la quantità di un determinato target prodotto dalla duplicazione *in vitro* è esponenzialmente proporzionale alla quantità di cDNA inizialmente presente

S. Franzellitti - Il biomonitoraggio ambientale attraverso lo studio della regolazione genica della risposta allo stress

