

MICROARRAY

I PROGETTI “OMICI”

Studiano gli elementi biologici nel loro insieme

GENOMICA

Studia il genoma, il codice genetico che racchiude, in modo ordinato e lineare, tutte le informazioni necessarie per la sintesi delle proteine e, in maniera più semplice, per lo sviluppo dell'individuo.

TRASCRIPTOMICA

Studia il contenuto in mRNA di una cellula (in differenti fasi di sviluppo, in risposta a vari stimoli o a differenti nutrienti)

PROTEOMICA

Studia il contenuto in proteine di una cellula. Benché possa essere immaginata come la componente tradotta del trascrittoma, in molti casi le proteine espresse da una cellula possono differire dai geni trascritti. Inoltre, le modificazioni post-traduzionali possono alterare le funzioni di molte proteine

METABOLOMICA

Studia il contenuto in piccole molecole di metaboliti di una cellula. La quantità e l'identità dei metaboliti primari e secondari possono variare in funzione dello stato fisiologico della cellula e riflettono la funzione delle proteine richieste per il metabolismo.

Trascrittomica

Tutte le cellule di un organismo contengono la stessa informazione genomica

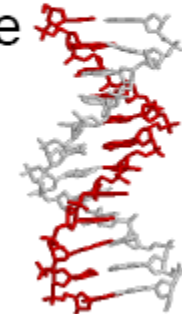
Cellule diverse di uno stesso organismo possono essere morfologicamente e funzionalmente diverse

Le diverse caratteristiche di cellule di uno stesso organismo dipendono da quali geni sono “accesi” e quali no

La trascrittomica studia a che livello e in che ordine temporale i geni di un organismo sono trascritti in mRNA

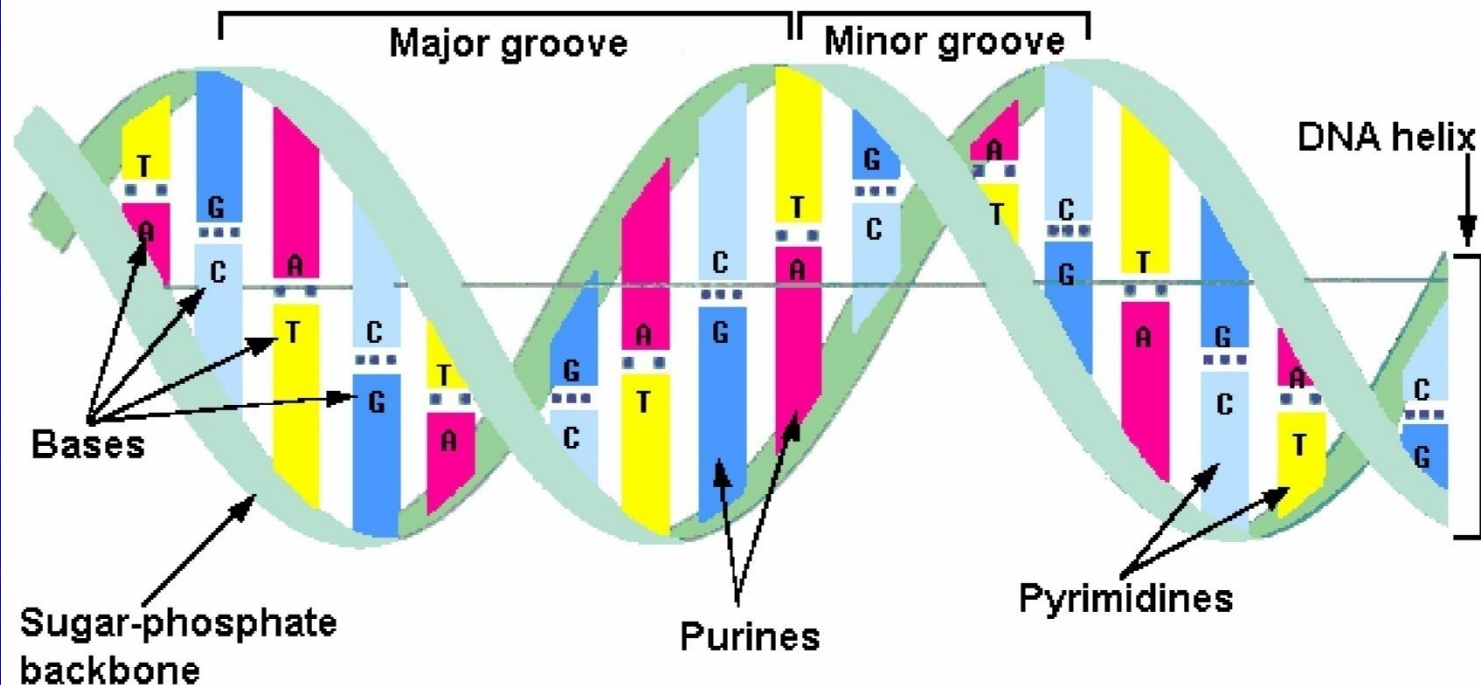
Trascrittomica

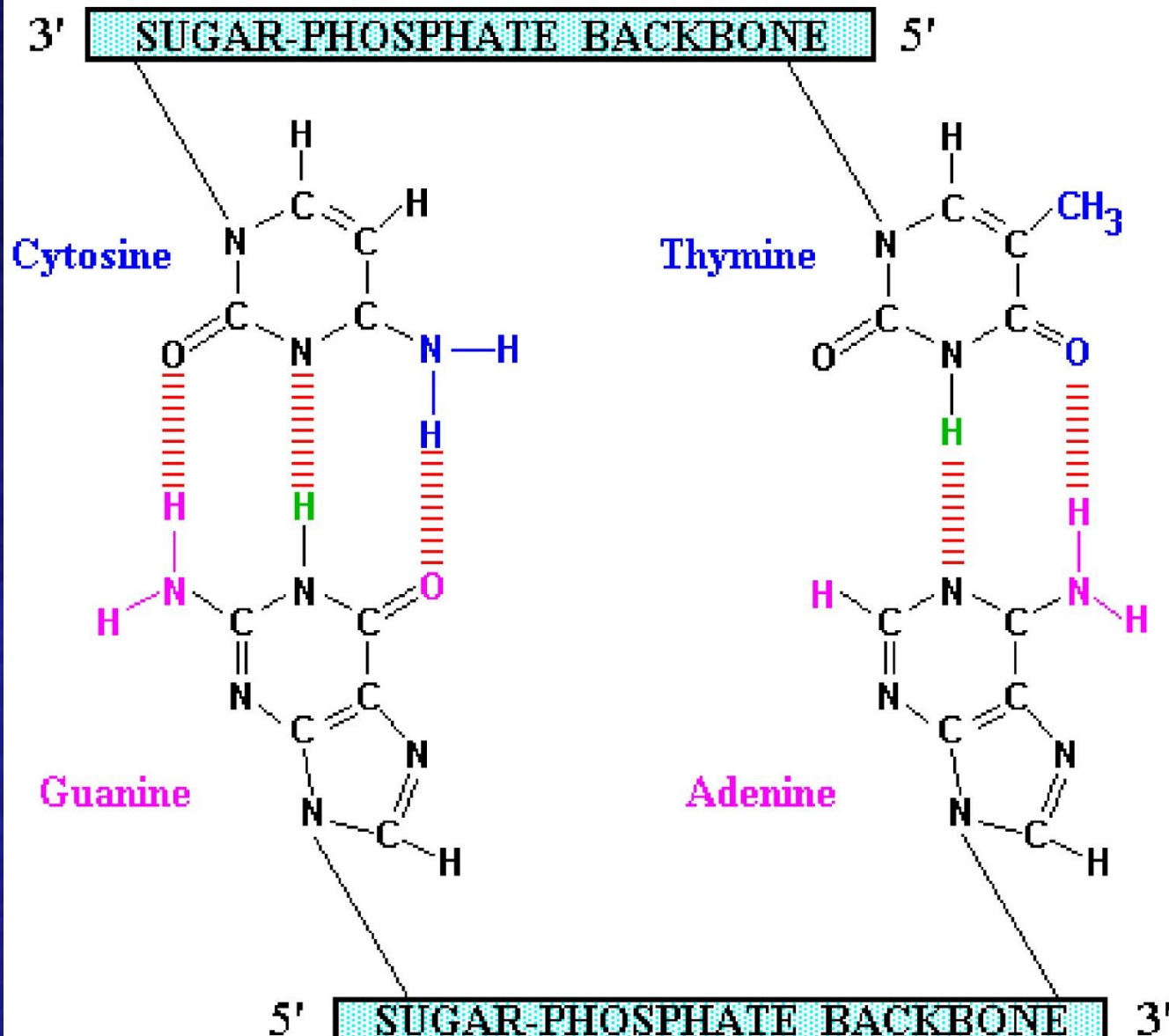
Per la individuazione e la quantificazione di specifici mRNA, è possibile utilizzare tecniche basate sulla specificità di ibridazione di due eliche complementari



The Double Helix

A simple way to think of the double helical structure of DNA is to imagine a twisted rope ladder. The rope is equivalent to the sugar phosphate backbones, while the wooden steps are the paired bases.

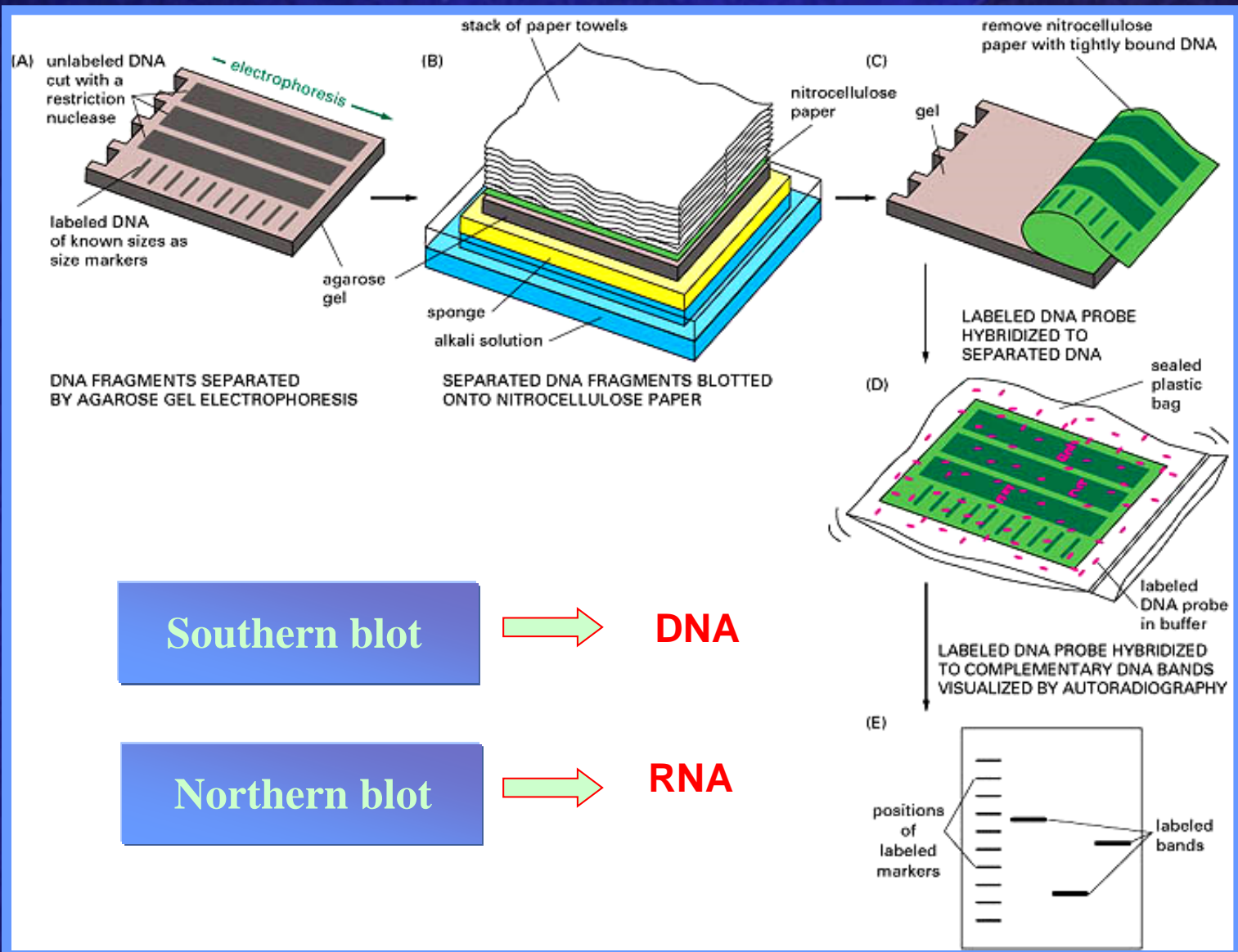




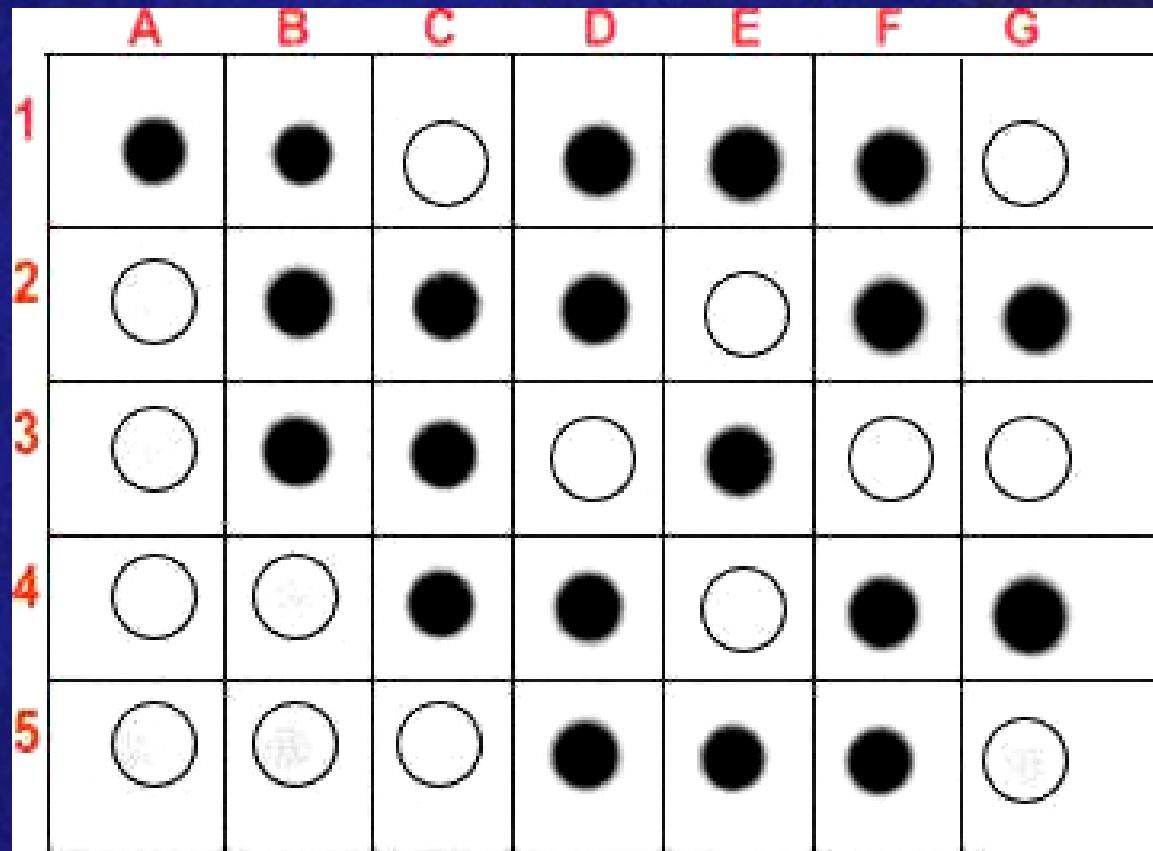
Complementary Base Pairing in DNA

The sequence along the bottom strand is **G-A** (5' to 3'), thus the sequence on the top strand must be **T-C** (5' to 3'). Thus, the sequence of **one strand predicts the sequence** of the other.

TEST BIOLOGICI CHE SFRUTTANO LA COMPLEMENTARITA' TRA BASI



DOT BLOT: UN ANTENATO DEL MICROARRAY



MICROARRAY

Rappresenta la tecnologia più avanzata tra le tecniche di ibridazione del DNA

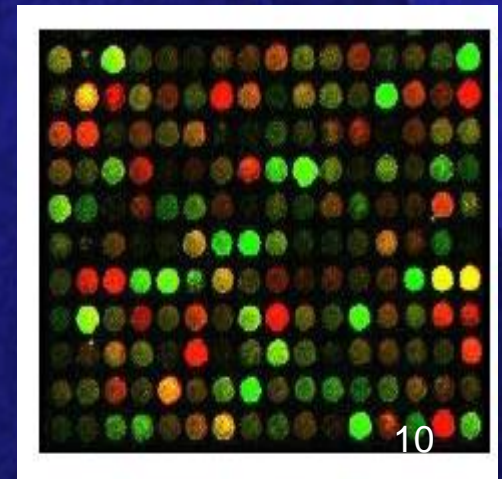
MICROARRAY: Con tale termine si identifica un supporto solido sul quale immobilizzare migliaia di sequenze geniche differenti per poter studiare contemporaneamente assetti genici.

SUPPORTO:

- membrana di nylon
- sottile supporto di vetro
- chip a silicio

SEQUENZE:

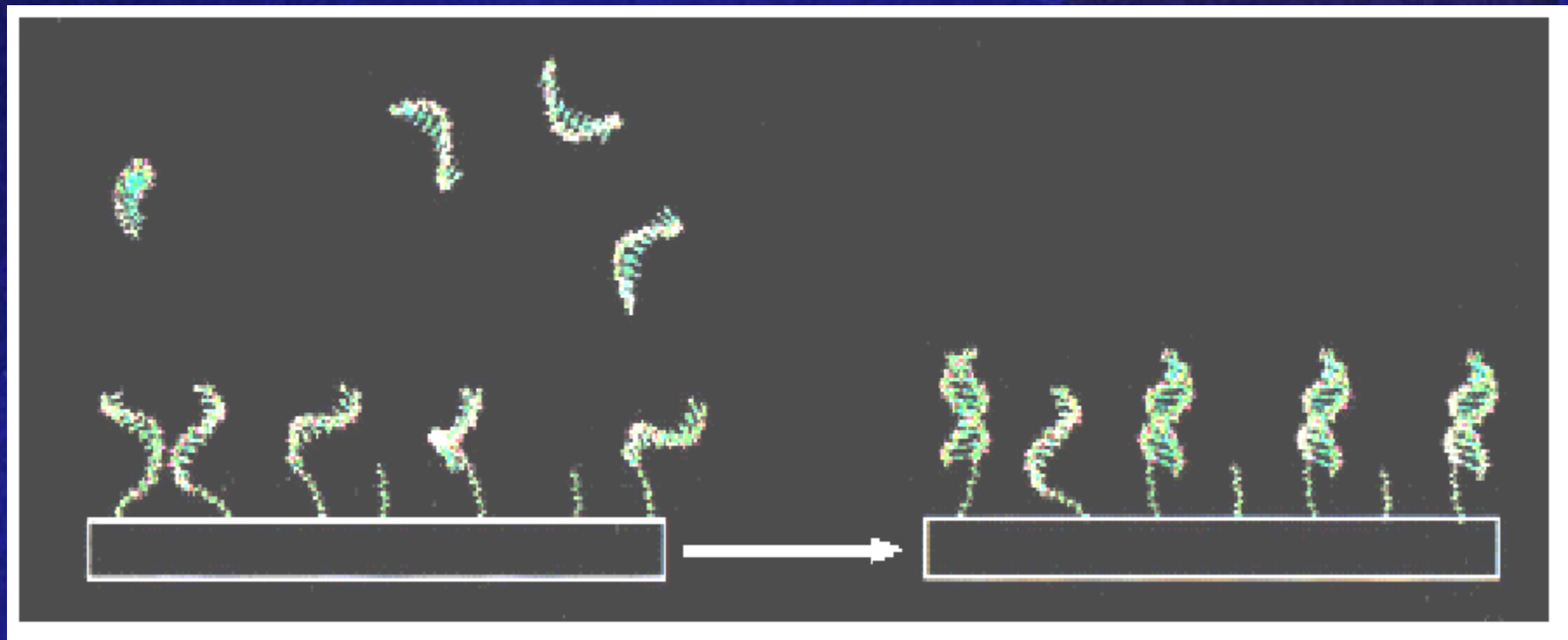
- DNA
- cDNA
- OLIGONUCLEOTIDI



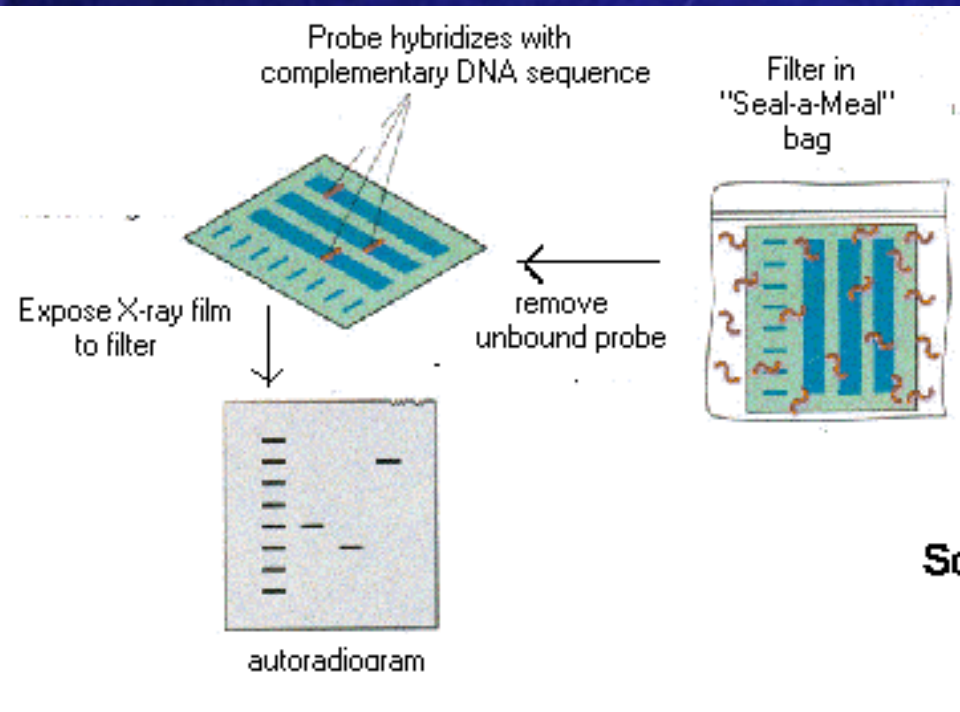
TECNOLOGIA DEL MICROARRAY

- Complementarità tra i nucleotidi degli acidi nucleici (DNA o RNA)
- Sequenze specifiche vengono immobilizzate su un supporto solido inerte in quantità microscopiche e a posizioni definite (genechip o microarray)
- Il DNA o RNA complementari alle sequenze si legano al supporto
- La presenza di DNA o RNA è rivelata mediante fluorescenza in seguito ad eccitazione con laser

INTERAZIONI MOLECOLARI NEL MICROARRAY



DIFFERENZE TRA MICROARRAY E SOUTHERN/NORTHERN BLOT



SOUTHERN/NORTHERN BLOT

SONDA:

- unica sequenza nucleotidica
- marcata con radioattivo
- libera

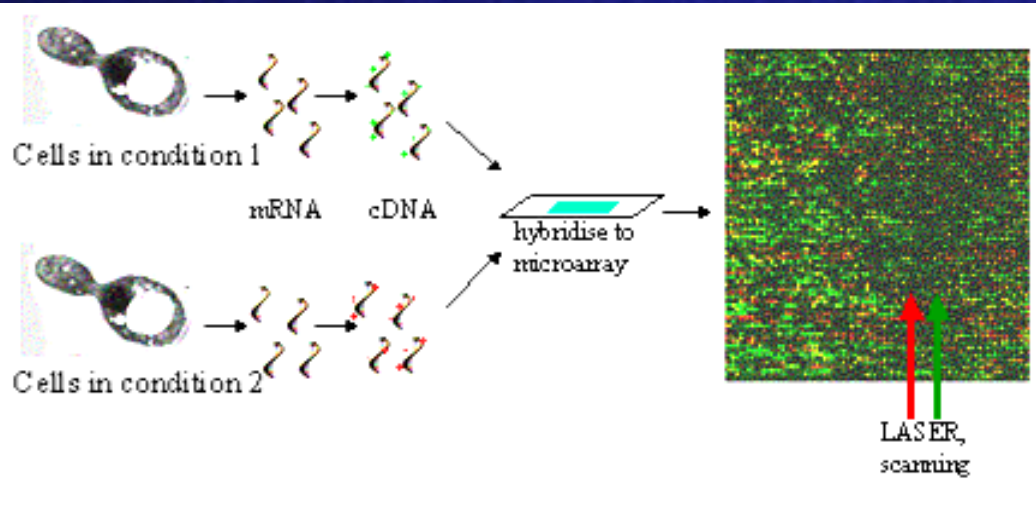
CAMPIONE:

- non marcato
- ancorato alla membrana
- possibilità di analizzare un numero limitato di campioni

METODO DI RIVELAZIONE:

- radioattivo
- esposizione della membrana su lastra fotografica
- analisi qualitativa

DIFFERENZE TRA MICROARRAY E SOUTHERN/NORTHERN BLOT



MICROARRAY

SONDA:

- milioni di sequenze nucleotidiche
- non marcata
- ancorata al supporto

CAMPIONE

- marcato con fluorocromi o biotina
- libero
- possibilità di analizzare un numero limitato di campioni, ma per lo screening di molteplici geni

METODO DI RIVELAZIONE:

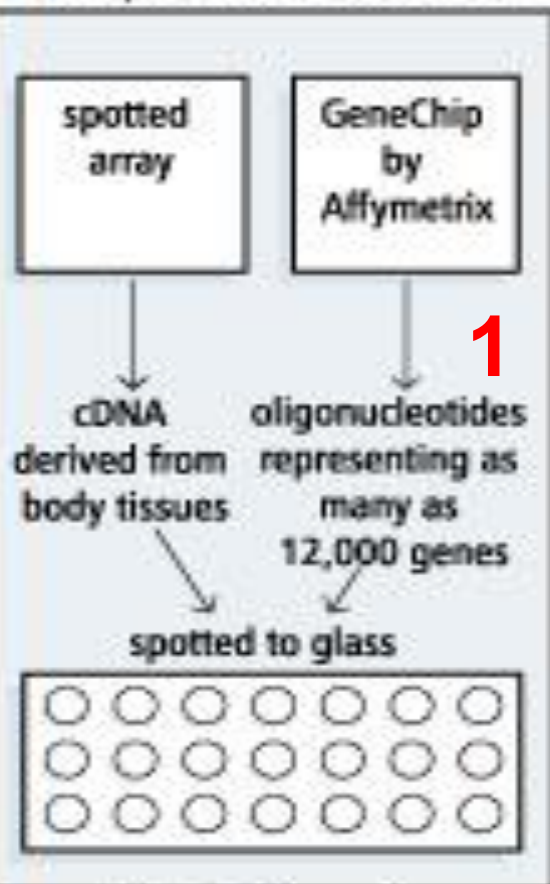
- registrazione di una fluorescenza
- possibilità di analisi quantitativa

VANTAGGI NELL'UTILIZZO DI MICROARRAY

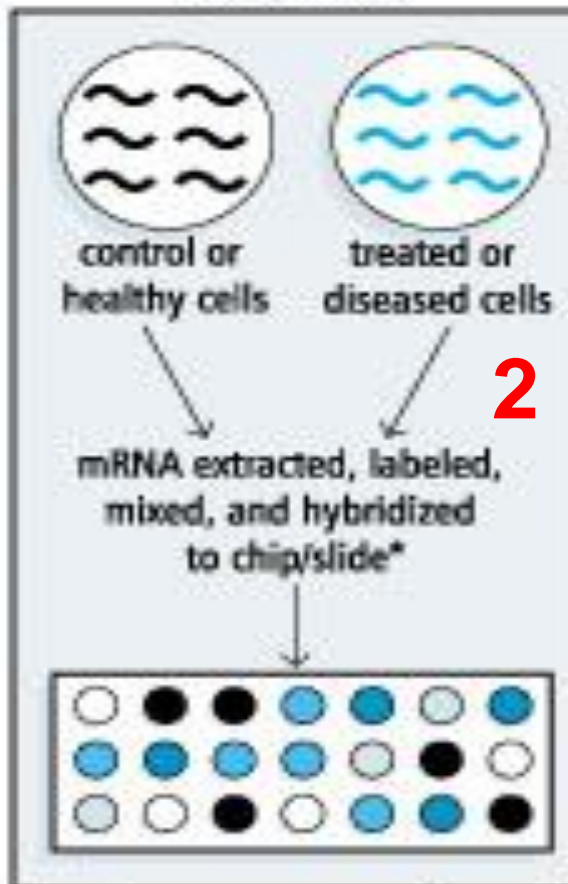
- Necessita di un supporto piccolo e di basse quantità di reagenti
- Metodo rapido ed automatizzato
- Permette di fare screening su un ampio numero di geni
- Consente una diretta/parallela comparazione tra geni diversi
- Non comporta rischi biologici per l'operatore (non tossico e non radioattivo)

MICROARRAY TECHNOLOGY

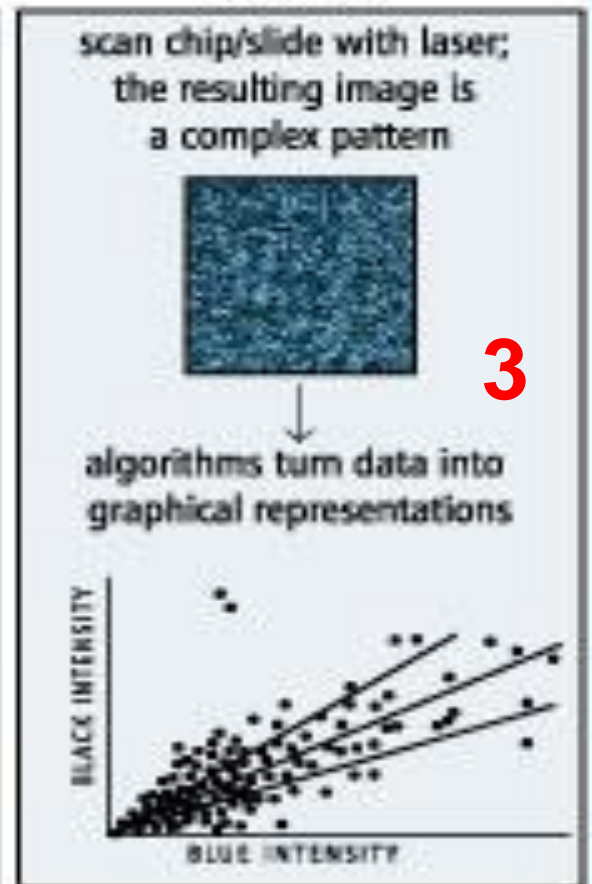
CHIP/SLIDE PREPARATION



EXPERIMENT



ANALYSIS



*Note: Affymetrix experiments use two chips. Software analyzes pattern differences between the two.

Result:

Gene expression is represented as a function of the ratio of the intensities.

- a. ↑ black – ↑ expression in untreated.
- b. ↑ blue – ↑ expression in treated.
- c. blue/black – genes equally expressed in both types of cells.

PREPARAZIONE DEI Genechips

Supporto inerte sul quale vengono immobilizzate le sonde di DNA

TECNOLOGIE PER LA COSTRUZIONE DEI GENECHIPS

SINTESI IN SITU (fotolitografia)

La sintesi delle sonde avviene direttamente sul supporto solido di silicio funzionalizzato con piccole sequenze oligonucleotidiche (oligo starter) per l'avvio dell'allungamento.

SPOTTING

Le sonde da ancorare al supporto solido sono sintetizzate a parte e depositate sul supporto. Le sonde possono essere rappresentate da molecole di cDNA lunghe migliaia di basi, le cui sequenze possono essere ricavate anche da banche dati genomiche.

le due tecnologie differiscono in:

**Metodologia di immobilizzazione delle sonde di
DNA sul supporto solido:
FOTOLITOGRAFIA vs SPOTTING**

**Lunghezza delle sonde di DNA immobilizzate:
frammenti nucleotidici vs sequenze complete**

TECNOLOGIA DELLA SINETSI IN SITU

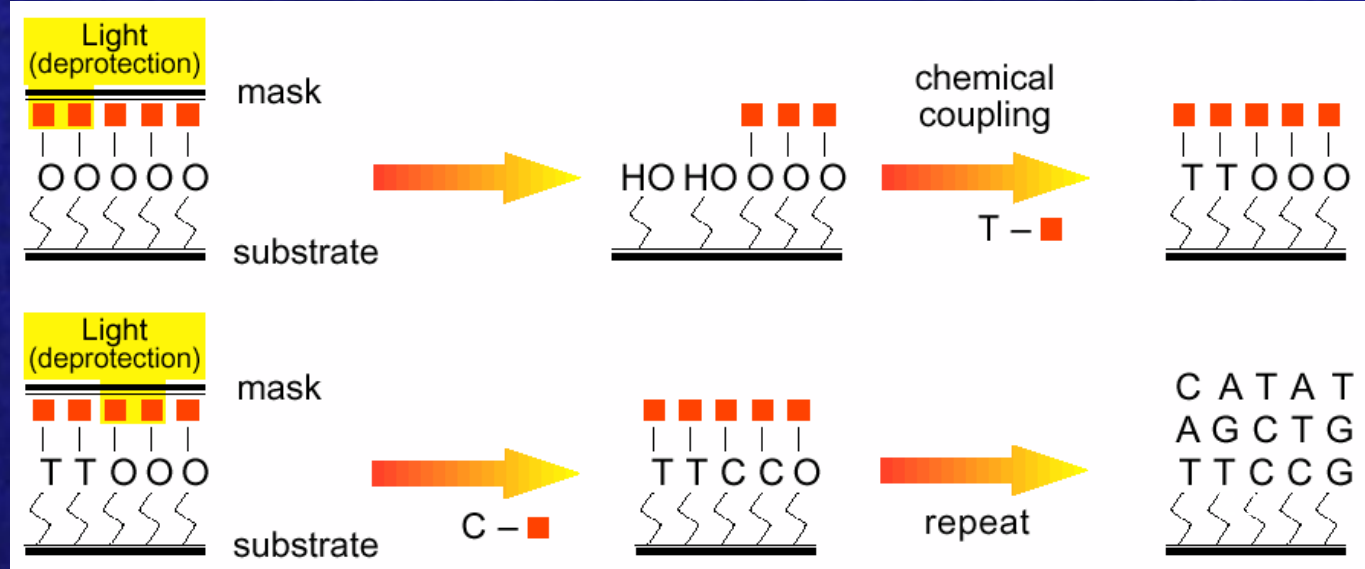
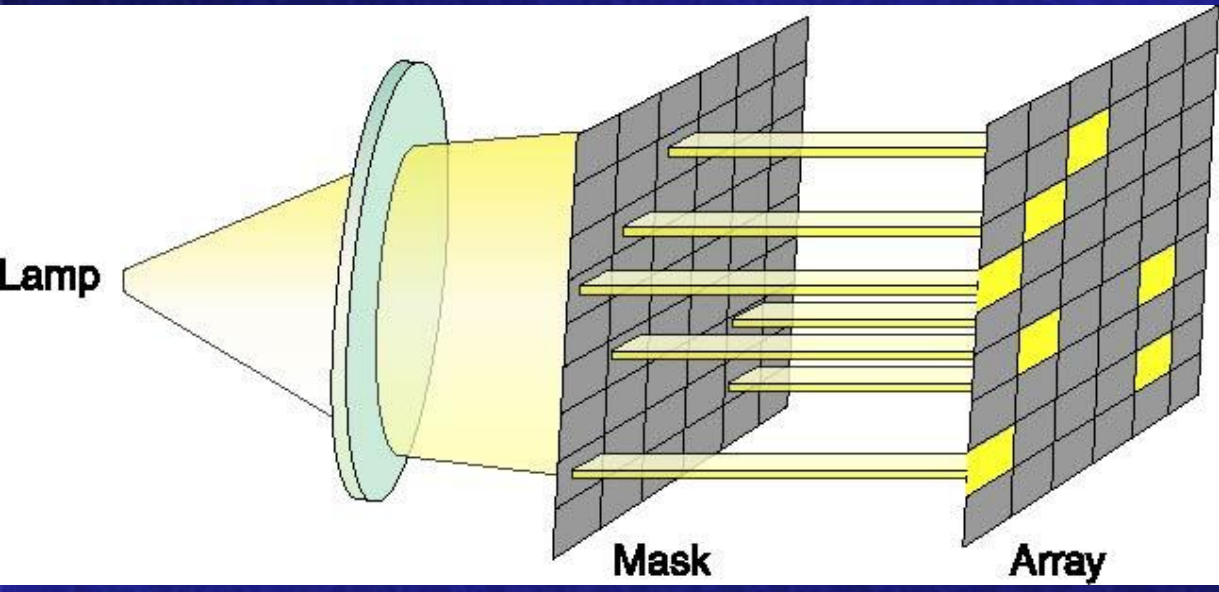
Integrazione di due tecniche:

- la fotolitografia
- sintesi diretta in fase solida di oligonucleotidi

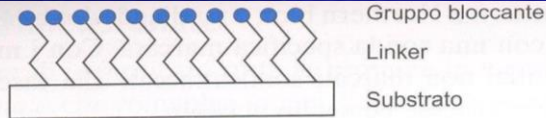
CHIP Affymetrix®



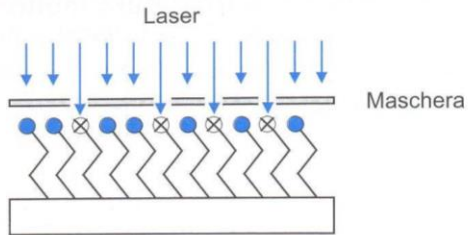
FOTOLITOGRAFIA



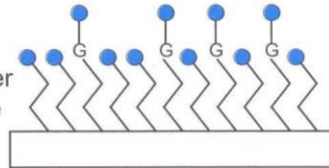
1. I linker con un gruppo bloccante fotolabile sono legati al substrato



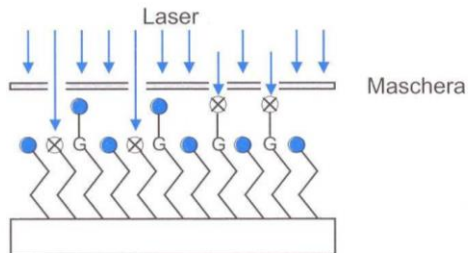
2. Il laser distrugge i gruppi bloccanti ad eccezione di quelli protetti dalla maschera



3. Un nucleotide con il gruppo bloccante viene attaccato ai linker non protetti dal gruppo bloccante



4. Si posiziona una nuova maschera e il laser distrugge i gruppi bloccanti non protetti



5. Il nucleotide successivo, con un gruppo bloccante, è attaccato ai linker non protetti

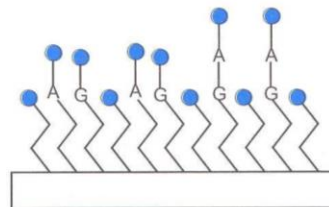


Figura 14.5 Sintesi di oligonucleotidi su un array

SINTESI IN SITU DI OLIGONUCLEOTIDI MEDIANTE FOTOLITOGRAFIA

CHIP Affymetrix®

CARATTERISTICHE DEI PROBE Affymetrix®

➤ Ogni gene è rappresentato da 15-20 probes

➤ Ogni probe può essere costituito da circa 25 nucleotidi

➤ I probes rappresentanti un gene sono scelti in regioni di sequenza che presentano la più alta divergenza con sequenze di geni appartenenti alla stessa famiglia

REGOLE PER IL DISEGNO DEI PROBE Affymetrix®

- Scegliere oligonucleotidi che ibridizzino con elevata affinità e specificità
- La sintesi in situ permette di evitare operazioni come preparazione, verifica, dosaggio e catalogazione di un elevato numero di probes (cDNAs, prodotti di PCR o cloni), abbassando notevolmente il rischio di errori.
- Utilizzo di molteplici probes oligonucleotidici a sequenza differente che ibridizzino con regioni differenti della stessa sequenza di riferimento (probe redundancy). La registrazione di molteplici segnali indipendenti per una stessa sequenza aumenta enormemente il rapporto segnale/rumore di fondo.

PROBES REDUNDANCY

Un ulteriore livello di ridondanza deriva dall'utilizzo di probes 'perfect match (PM)' e 'mismatch (MM)' .

PERFECT MATCH (PM): sequenza di basi capace di ibridizzare perfettamente la sequenza di riferimento

MISMATCH (MM): identici al PM ad eccezione di una singola base in posizione centrale.

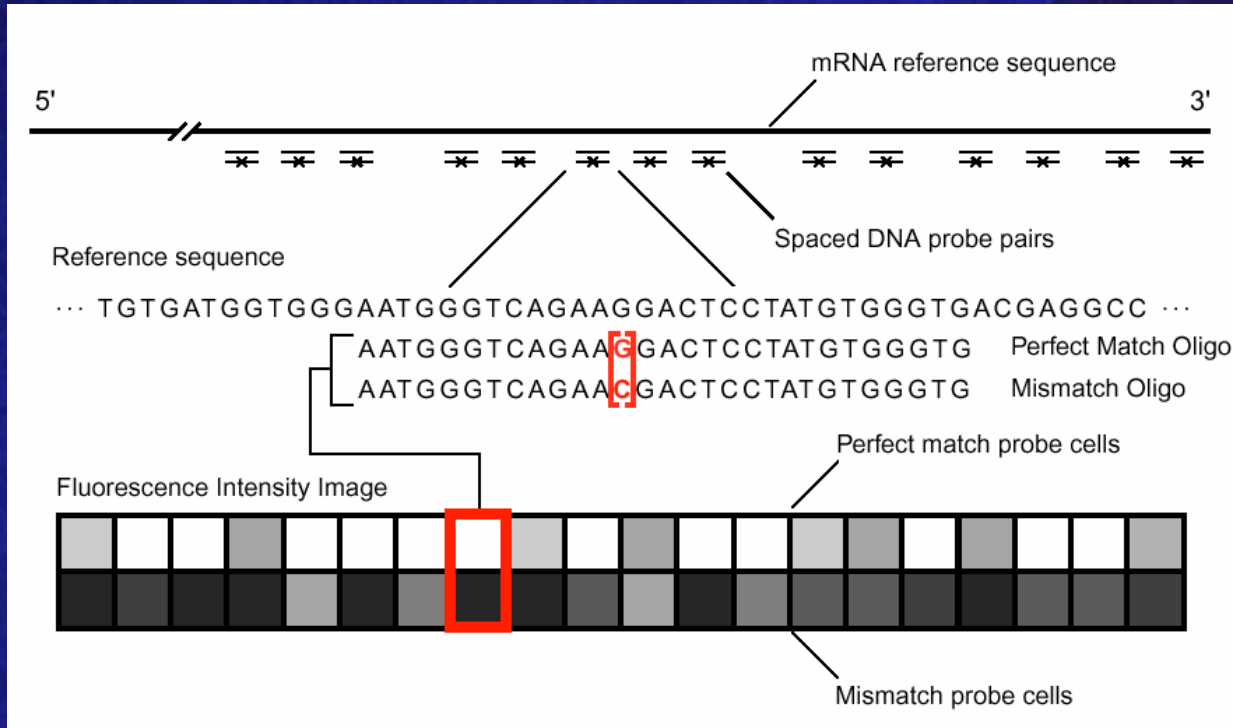
Sequenza di riferimento

... TGTGATGGTGGGAATGGGTCAGAAAGGACTCCTATGTGGGGTGACGAGG

Perfect match PM AATGGGTCAGAA**G**GACTCCTATGTGGGGTG

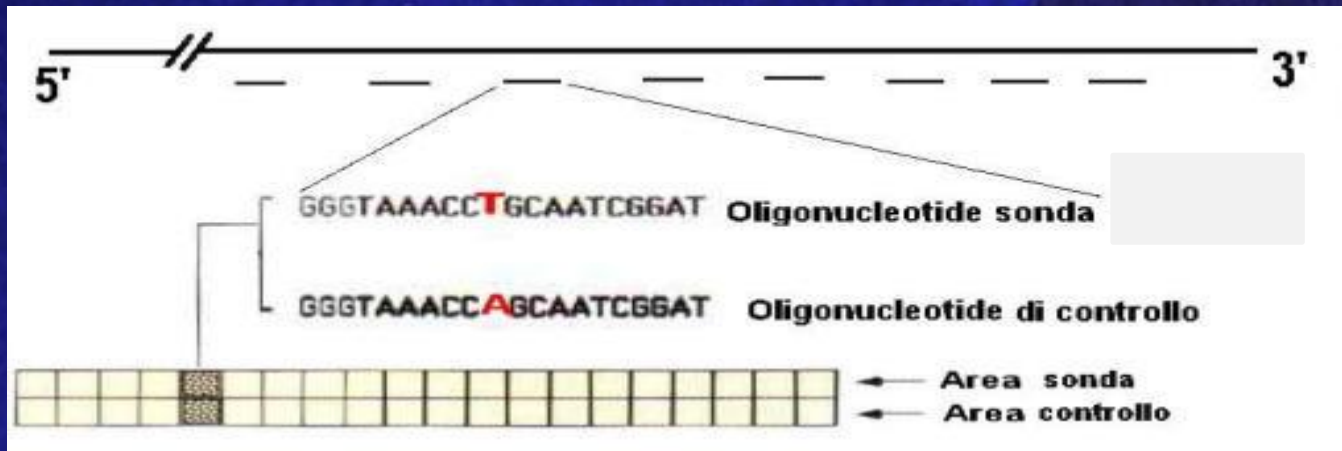
Mismatch MM AATGGGTCAGAA**C**GACTCCTATGTGGGGTG

Perfect match PM e mismatch MM PROBES



I probes che formano i duplex più stabili (PM probes) sviluppano un segnale più fluorescente rispetto ai probe MM che formano duplex meno stabili.

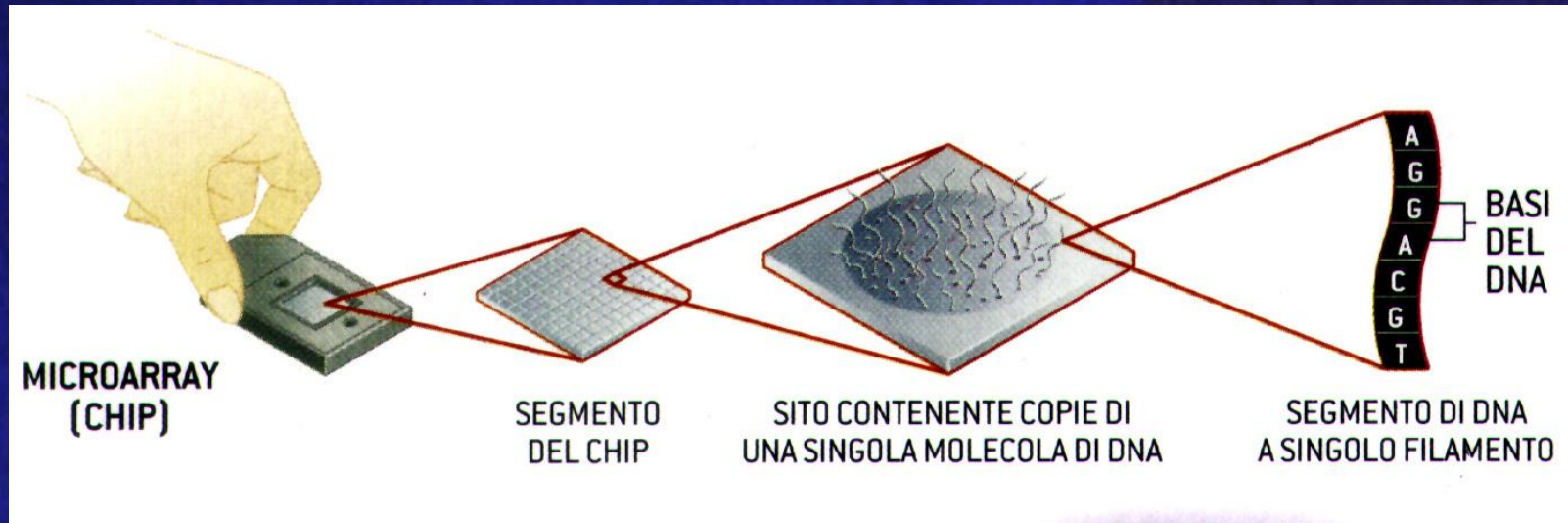
I probes MM rappresentano un controllo di specificità che permettono di distinguere il reale segnale dal background e dalla cross-ibridizzazione.



Ciascun gene è rappresentato sul chip Affymetrix da un set di probes (15-20) ridondanti PM/MM.

I probe set PM/MM permettono di determinare con alta confidenza se il segnale fluorescente registrato deriva da una ibridazione specifica con il campione.

DIMENSIONI DI UN CHIP



1.28 X 1.28 cm array

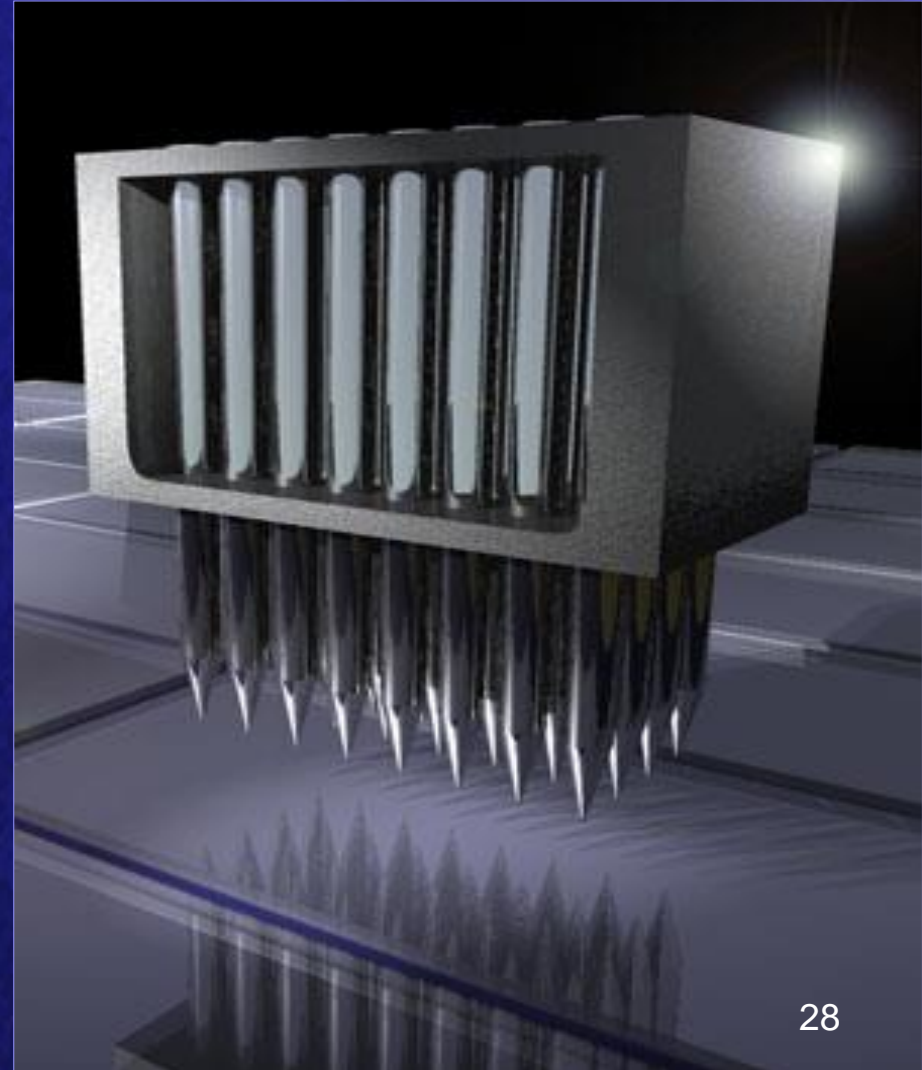
24 x 24 μm cella
20 paia di probe/cella

7000-30000 geni/array

Spotting o metodo Stanford

Uso di un robot per depositare sul chip sequenze complete di DNA in una precisa posizione:

SPOTTING



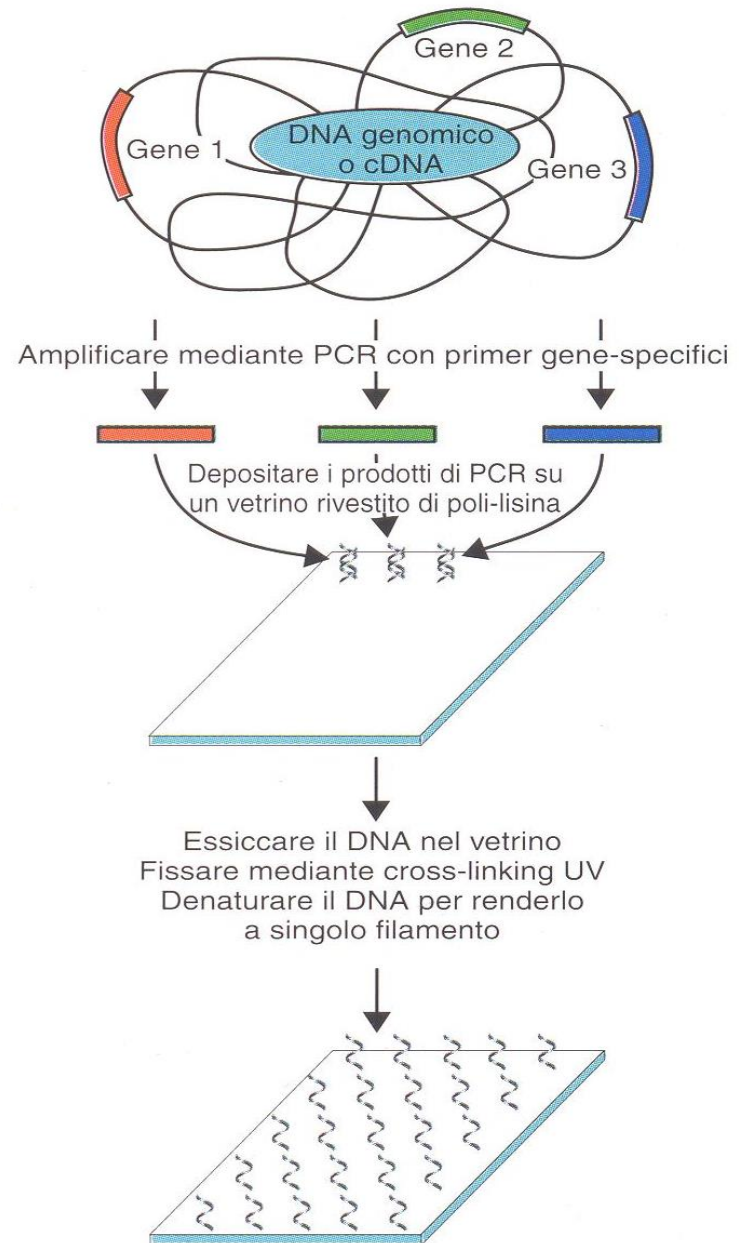
Spotting

- Deposizione dei prodotti di PCR gene-specifici, mediante robot in un punto preciso dell'array.

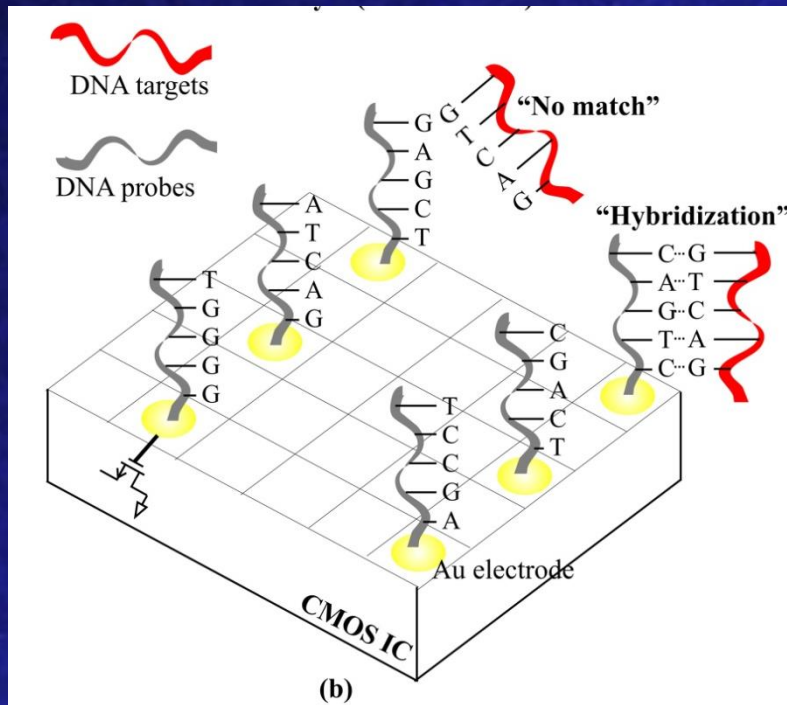
- Essiccamento del vetrino a 100° per 2s

- Fissaggio mediante crosslinking con raggi UV

- Denaturazione delle sonde a DNA (2min a 95°C) per renderle a singolo filamento



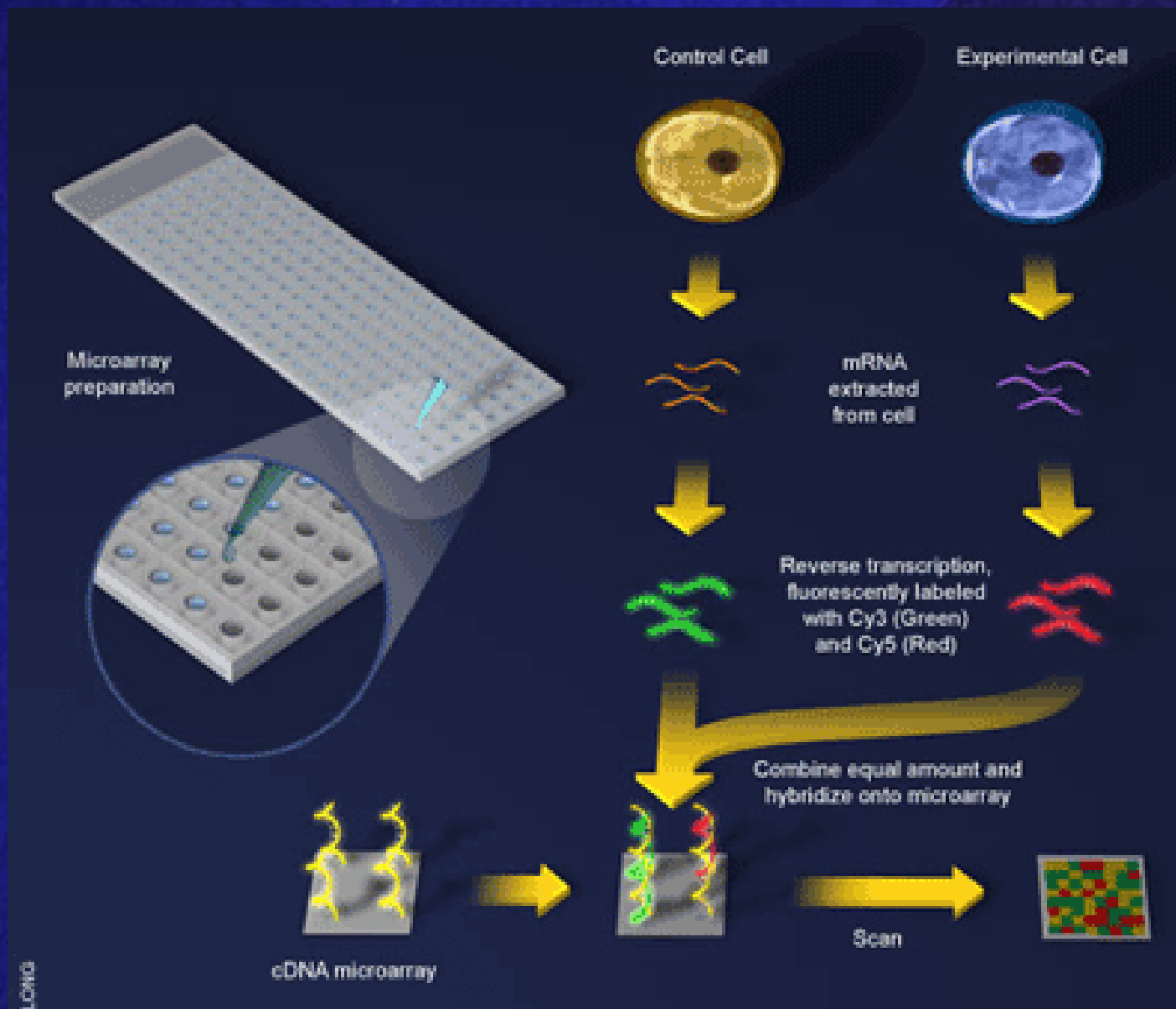
CHIP COSTRUITI PER SPOTTING



Espongono frammenti di DNA a singolo filamento, di lunghezza variabile, ma superiore ai probes oligonucleotidici Affymetrix

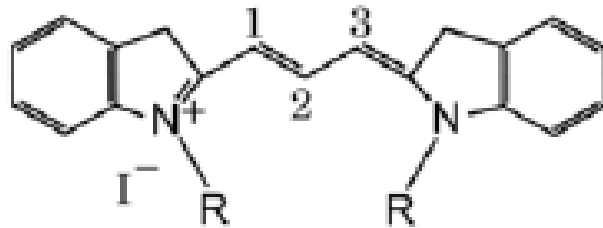
PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

PREPARAZIONE CAMPIONI PER MICROARRAY A cDNA



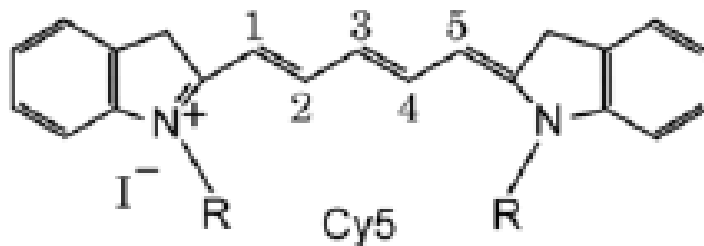
Metodo Stanford

➤ I due campioni da comparare vengono marcati con due diversi fluorocromi:



Cy3

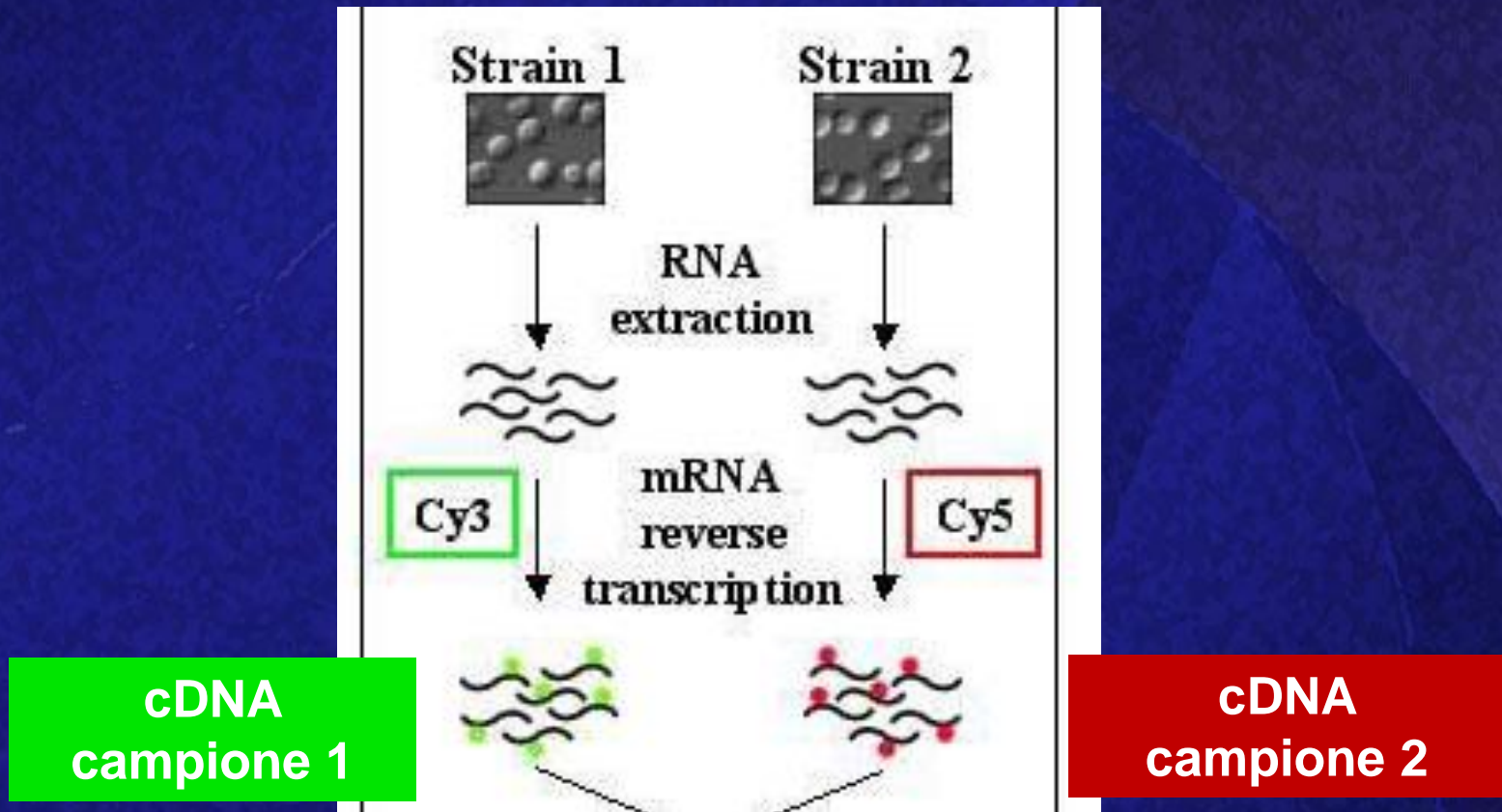
Cy3
(verde)



Cy5

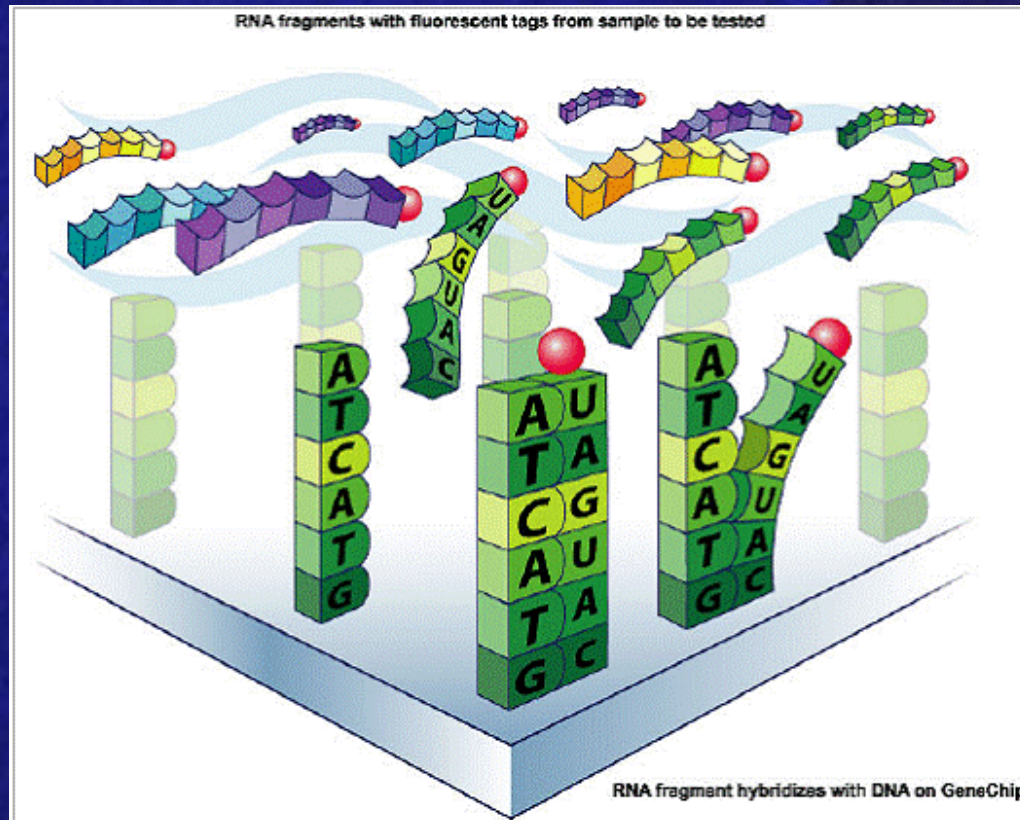
Cy5
(rosso)

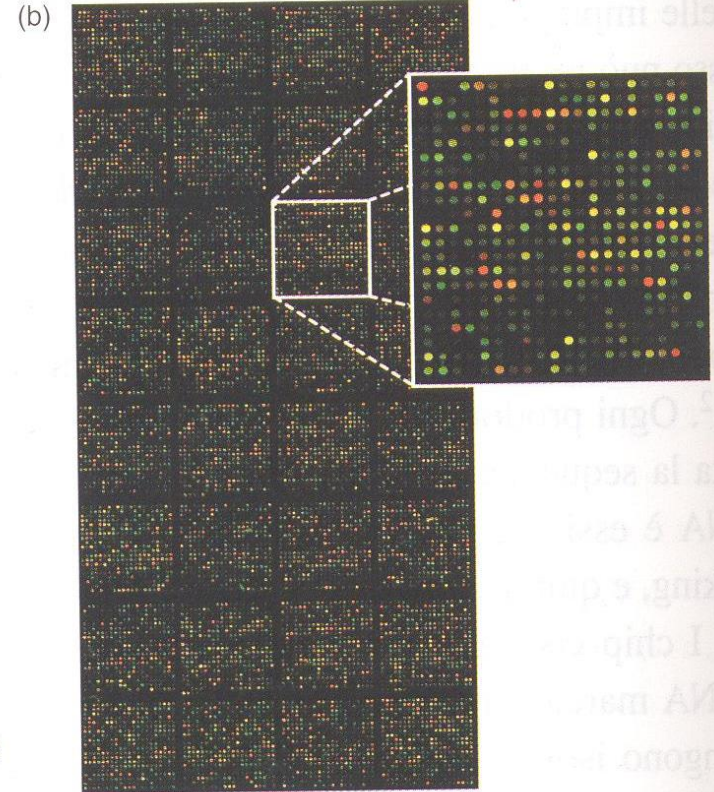
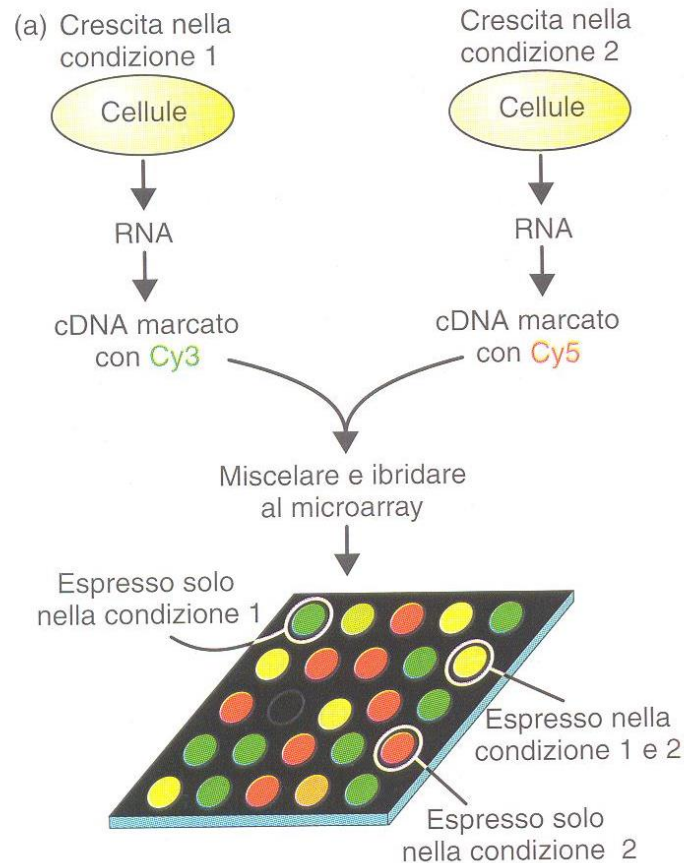
La marcatura dei campioni avviene per retrotrascrizione di mRNA in presenza di tre dNTPs normali e il quarto dNTP fluorescente.



Il cDNA derivante da ciascun tipo cellulare porterà un marcatore fluorescente differente (rosso o verde).

IBRIDIZZAZIONE: i due campioni vengono poi miscelati in ugual quantità e fatti ibridare al chip.

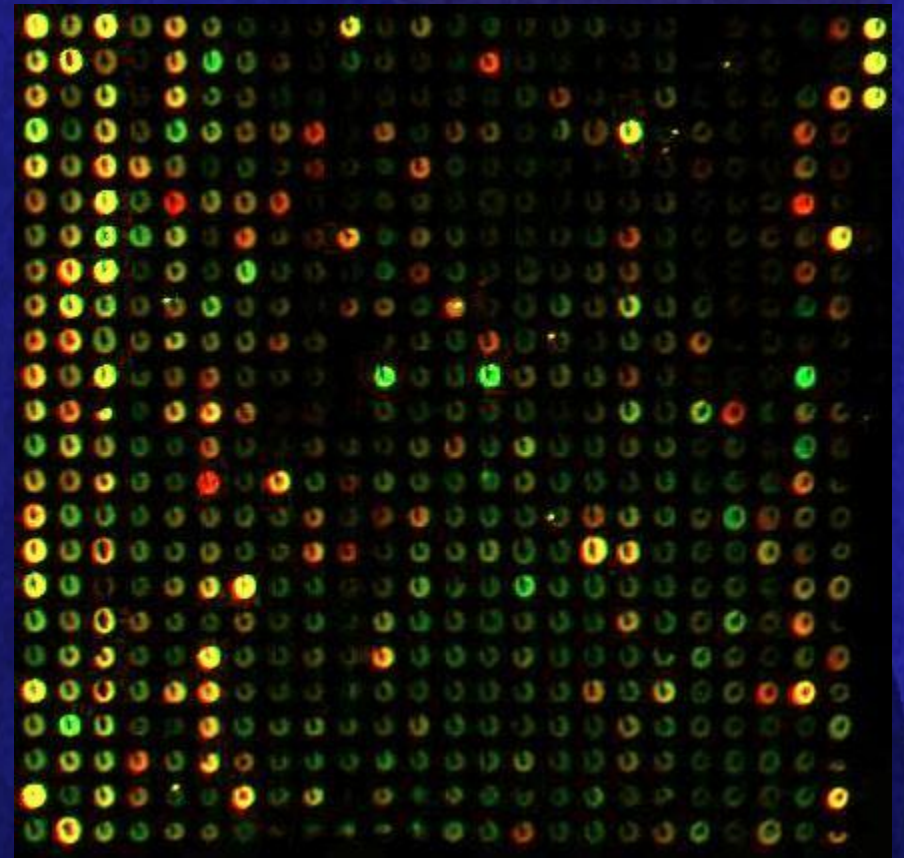




Il colore e l'intensità di ogni singolo spot sul chip viene monitorato con un microscopio confocale a scansione per fluorescenza.

I campioni immobilizzati sull'array sono eccitati da un laser e la fluorescenza rilevata per ogni spot fornisce informazioni della quantità relativa di ogni specie di RNA nel campione originale.

Colore spot	Espressione gene
Giallo	invariata
Rosso	indotta
Verde	repressa
Nero	non espresso

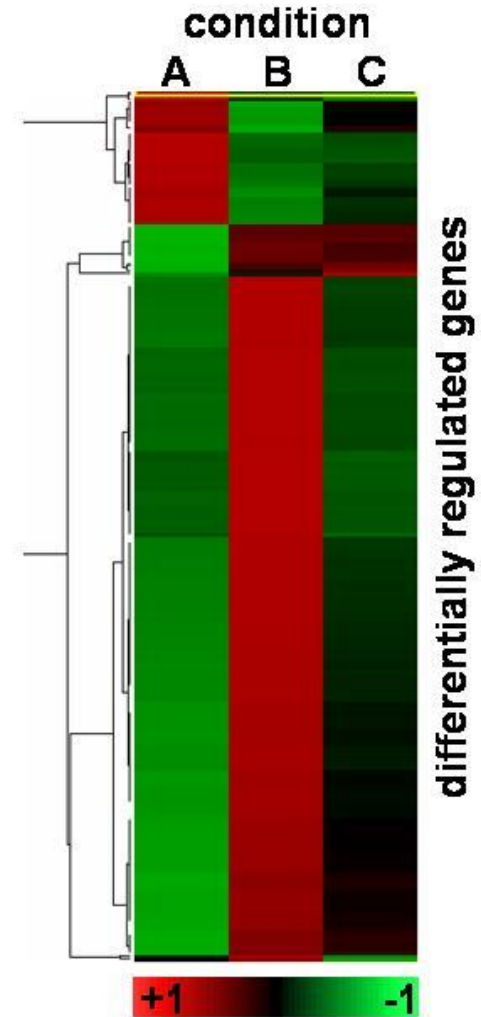
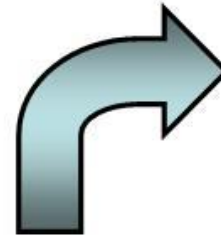
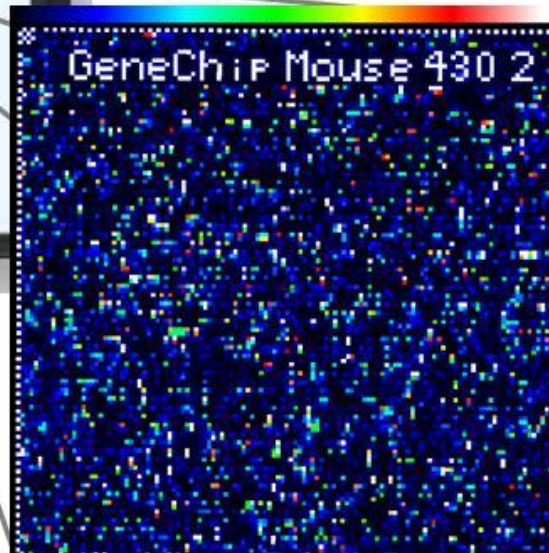


Campione 1 (ctr) : verde

Campione 2 (sperimentale): rosso

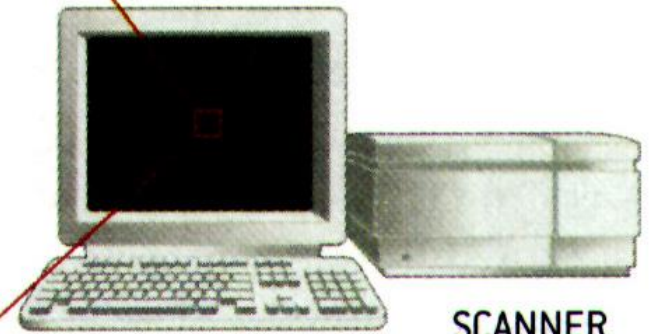
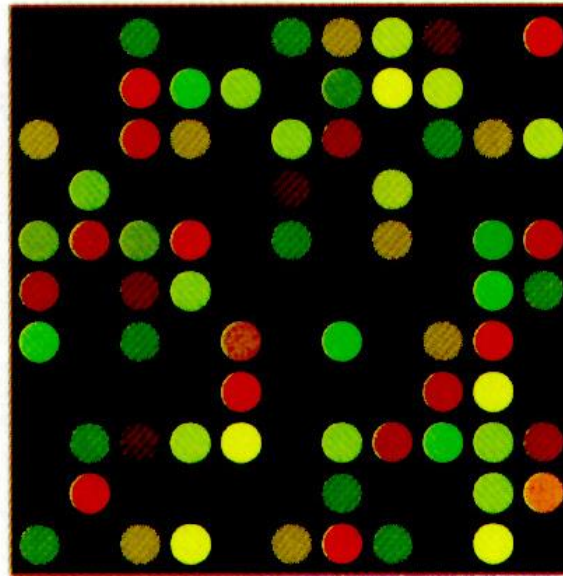
I campioni sono miscelati e ibridizzati con un unico microarray

STUDIO DELL'ESPRESSIONE GENICA RELATIVA



Analisi Qualitativa

- GENE LA CUI ATTIVITÀ È STATA MOLTO STIMOLATA NELLE CELLULE TRATTATE
- GENE LA CUI ATTIVITÀ È STATA MOLTO RIDOTTA NELLE CELLULE TRATTATE
- GENE UGUALMENTE ATTIVO NEI DUE TIPI DI CELLULE
- GENE INATTIVO NEI DUE TIPI DI CELLULE



MAPPA

SCANNER

Analisi Quantitativa

CALIBRAZIONE DEL MICROARRAY

Lo strumento è tarato in maniera che il rapporto tra l'intensità della fluorescenza dei due fluorocromi (V:R) in microcelle contenenti DNA genomico è uguale ad 1

L'intensità relativa V/R è una misura dell'abbondanza degli mRNA di ogni specifico campione



$$V/R > 1$$

$$V/R < 1$$



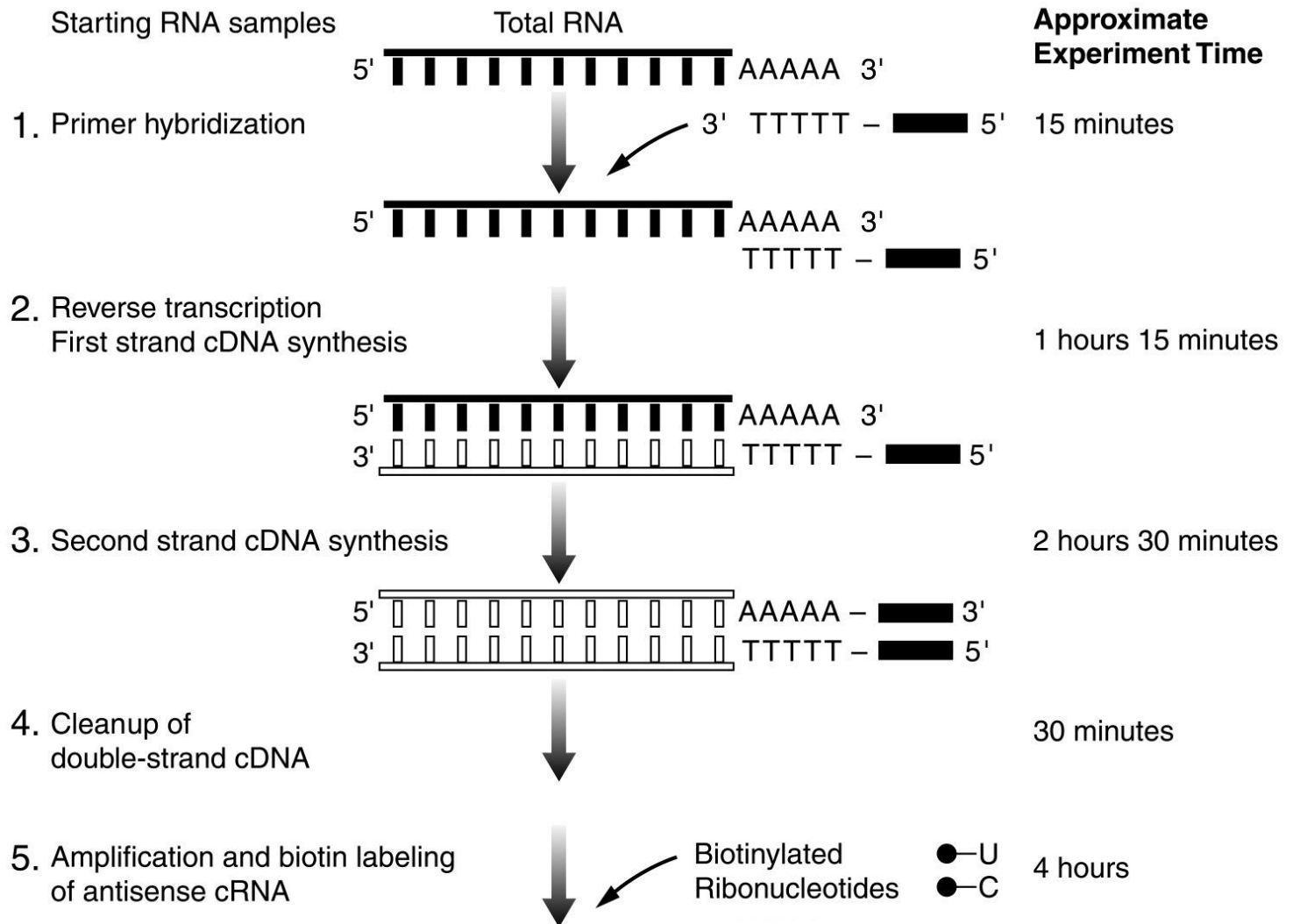
$$V/R > 2$$

$$V/R < 0.5$$

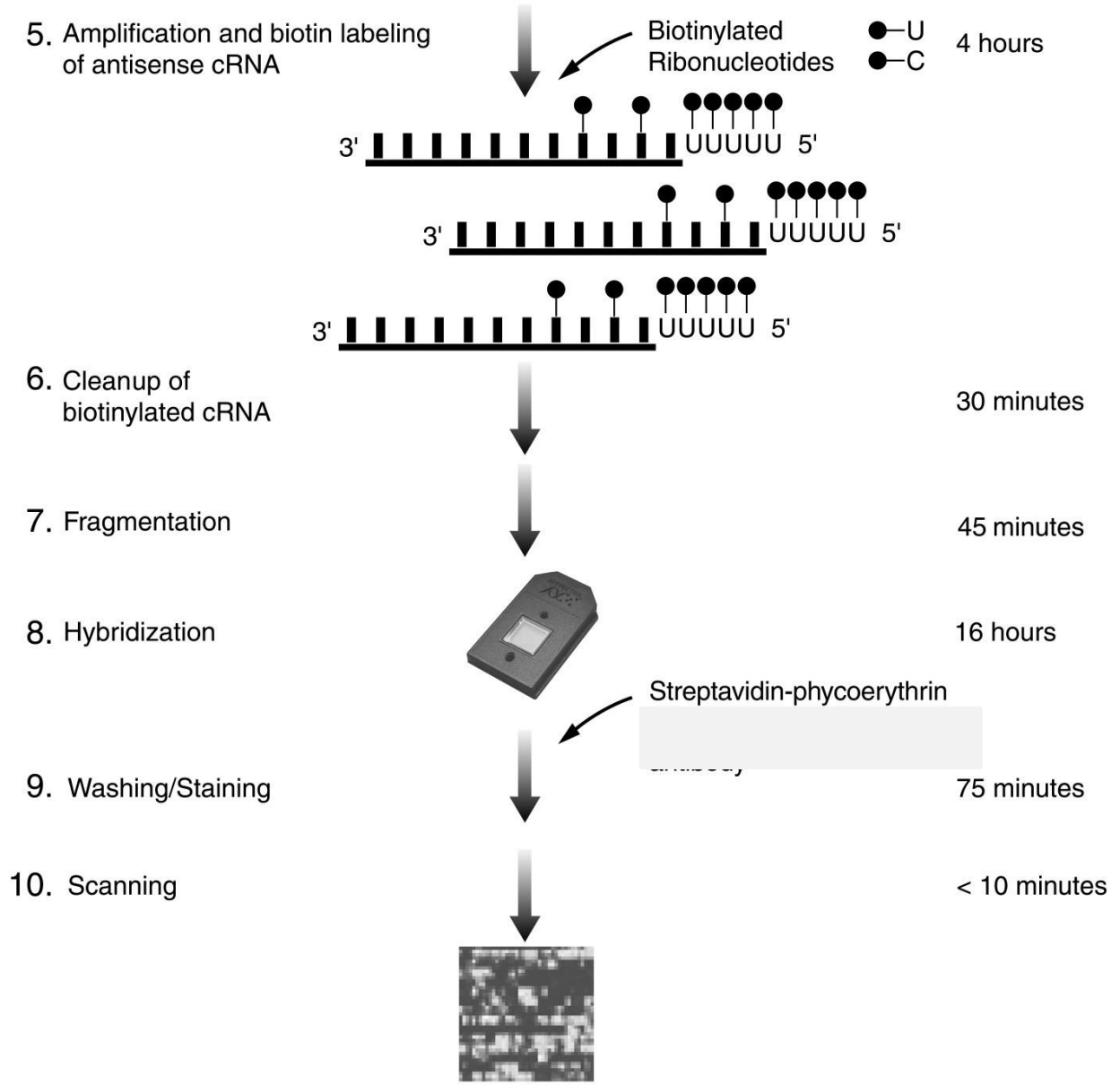
A causa del rumore di fondo dell'analisi, si fissa un cut-off superiore a 2 o inferiore a 0.5

PREPARAZIONE CAMPIONI PER GENECHIP AFFYMETRIX

Eukaryotic Target Labeling for GeneChip® Probe Arrays



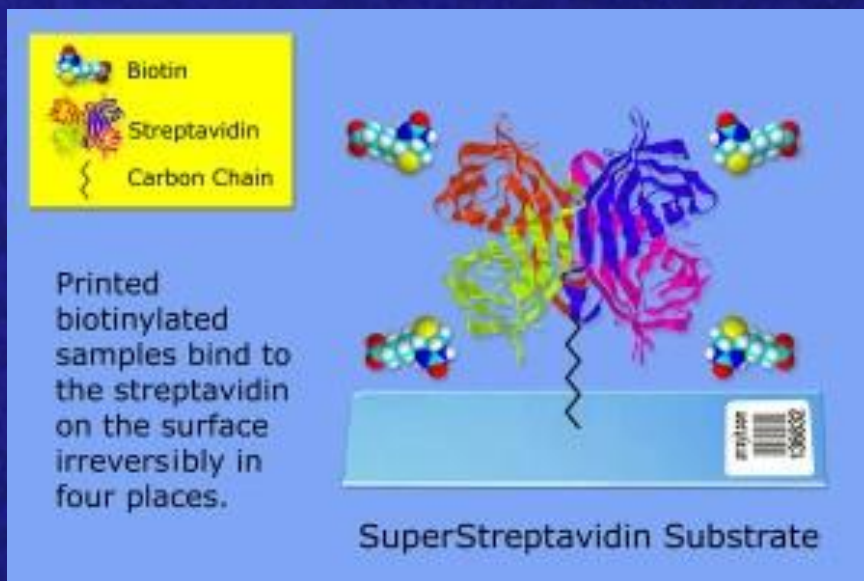
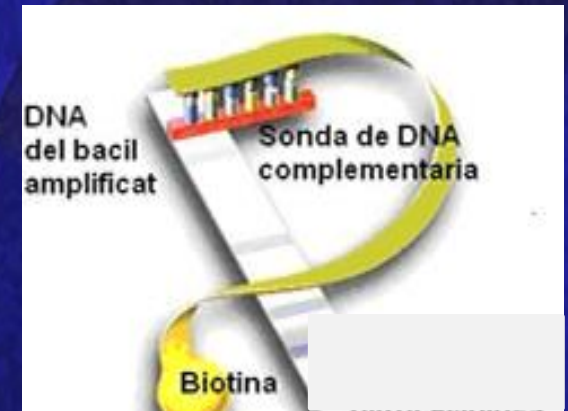
M
E
T
O
D
O
L
O
G
Y
A
F
F
Y
M
E
T
R
I
X



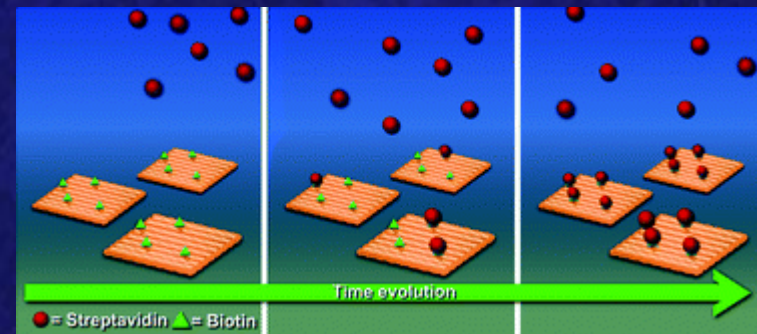
Legend: RNA DNA T7 Primer Biotin

IBRIDAZIONE DEI GENECHIP AFFYMETRIX

Il campione è costituito da cRNA biotinilato



L'ibridazione è condotta in presenza di streptavidina-ficoeritrina, come marcatore.



DIFFERENZE TRA Metodo Affymetrix O Stanford

CAMPIONI

AFFYMETRIX

I campioni sono cRNA marcati con biotina

STANFORD

I campioni sono cDNA marcati con fluorocromi Cy3 o Cy5

IBRIDAZIONE

AFFYMETRIX

- Ciascun campione viene ibridizzato in presenza di SAPE (Streptavidin-phycoerytrin).
- Ogni campione è ibridizzato con un singolo chip

STANFORD

I campioni differentemente marcati sono miscelati in parti uguali e ibridizzati sullo stesso chip.

RIVELAZIONE

AFFYMETRIX

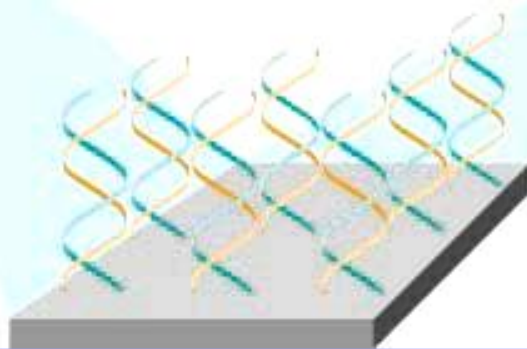
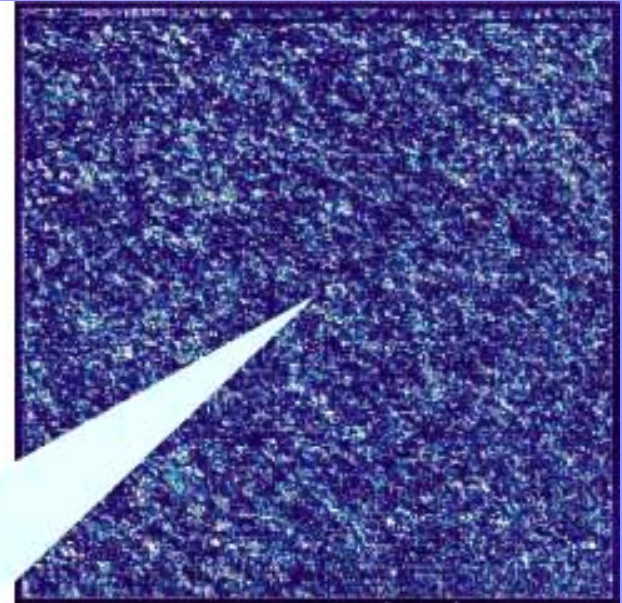
Lo scanner misura l'intensità di fluorescenza per ciascun singolo campione

STANFORD

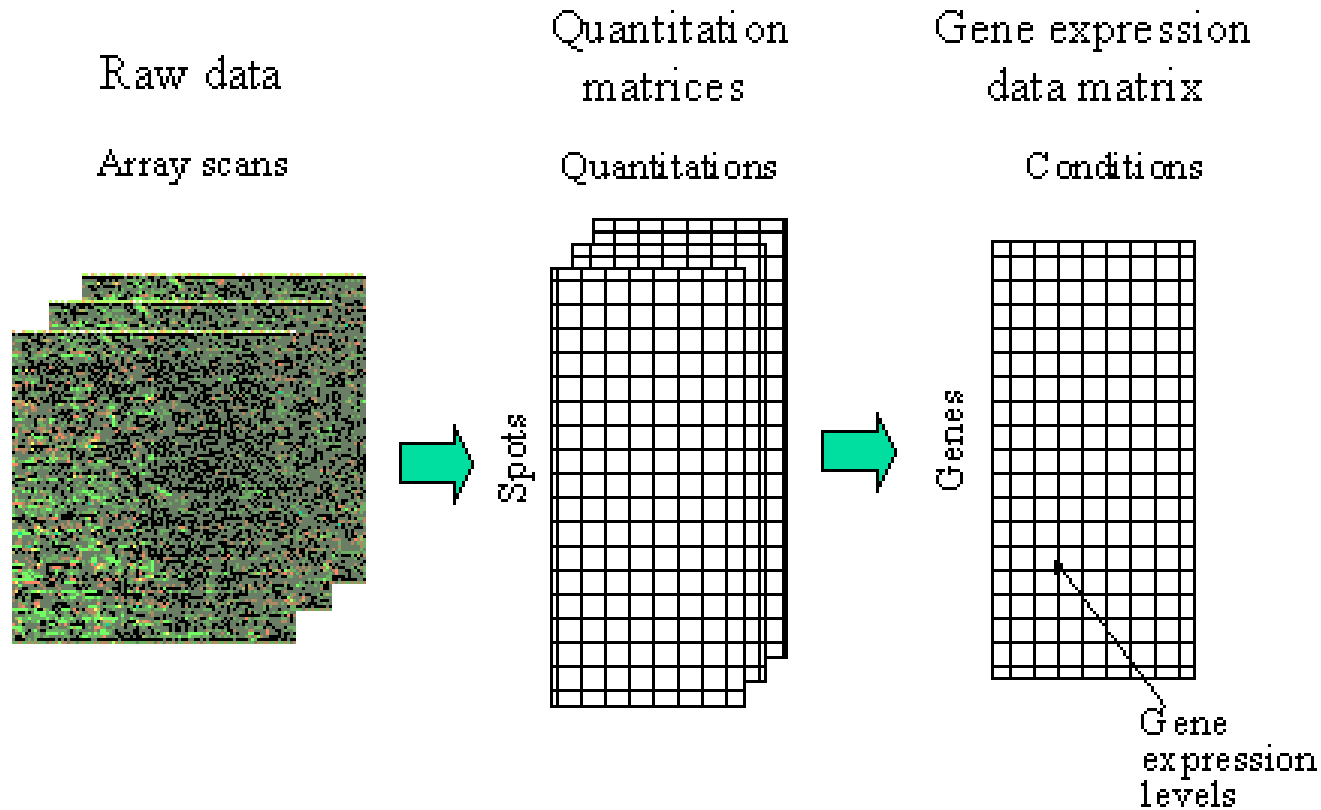
Lo scanner misura l'intensità relativa V/R .

ELABORAZIONE DATI

Microarray e analisi dei dati. E' la tecnica fondamentale per lo studio della trascrittomica. Il trattamento dei dati è un fattore critico che può portare a risultati diversi.



Annotazione dei raw data



Matrice dei dati

		Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 4	Exp. 5
		Type I	Type II	Type III	Type II	Type III
Gene 1	foo	0.78	0.22	0.32	0.87	0.50
Gene 2	bar	0.73	0.92	0.06	0.67	0.09
Gene 3	blee	0.99	0.60	0.48	0.10	0.56
Gene 4	bas	0.60	0.26	0.11	0.21	0.41
Gene 5	groo	0.44	0.84	0.42	0.84	0.86
Gene 6	gar	0.07	0.18	0.49	0.30	0.05
Gene 7	glee	0.28	0.49	0.47	0.93	0.89
Gene 8	glas	0.91	0.95	0.76	0.22	0.00
Gene 9	gree	0.72	0.51	0.35	0.54	0.81
Gene 10	goo	0.34	0.83	0.62	0.15	0.71
...						

I dati di espressione genica possono essere rappresentati in una matrice dove ogni riga rappresenta un gene e ogni colonna una condizione analizzata

Confronto di due casi

	Int(treated)	Int(wild type)	ratio
Gene A	0.22	0.24	0.917
Gene B	0.67	1.21	0.598
Gene C	1.13	0.43	2.630
Gene D	2.45	2.44	1.01

Se riportiamo il \ln_2 della ratio, abbiamo:

$\log_2(\text{ratio}) > 0$: aumento

$\log_2(\text{ratio}) < 0$: diminuzione

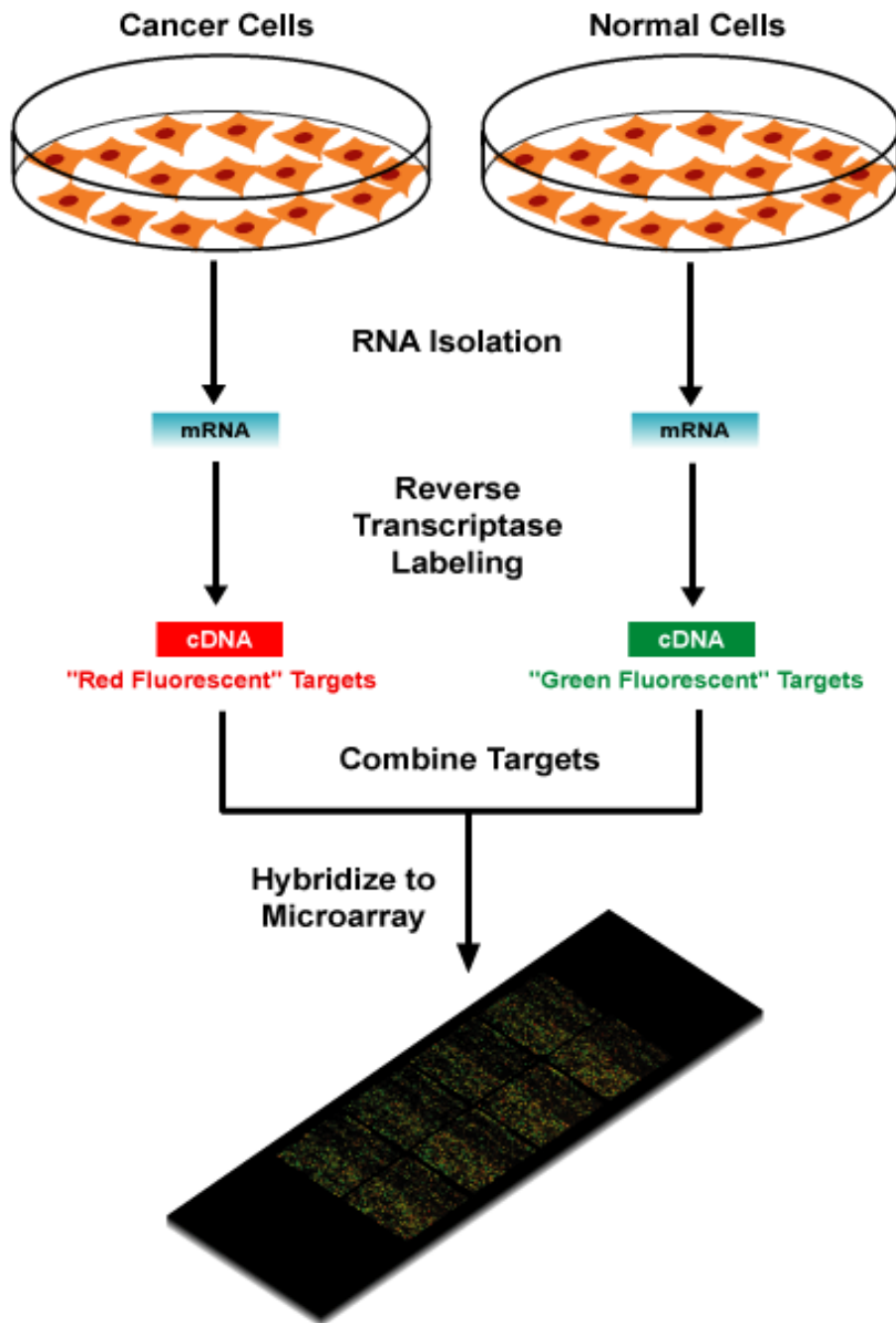
APPLICAZIONE DEL MICROARRAY: STUDIO DEL PROFILO DI ESPRESSIONE GENICA



“istantanea” dettagliata delle modificazioni funzionali
cui una cellula va incontro in seguito all’assunzione
di farmaci o per la presenza di specifiche patologie



CLUSTER DI GENI



ANALISI DELL'ESPRESSIONE DI GENI DIFFERENTEMENTE ESPRESSI DA CELLULE TUMORALI E NORMALI

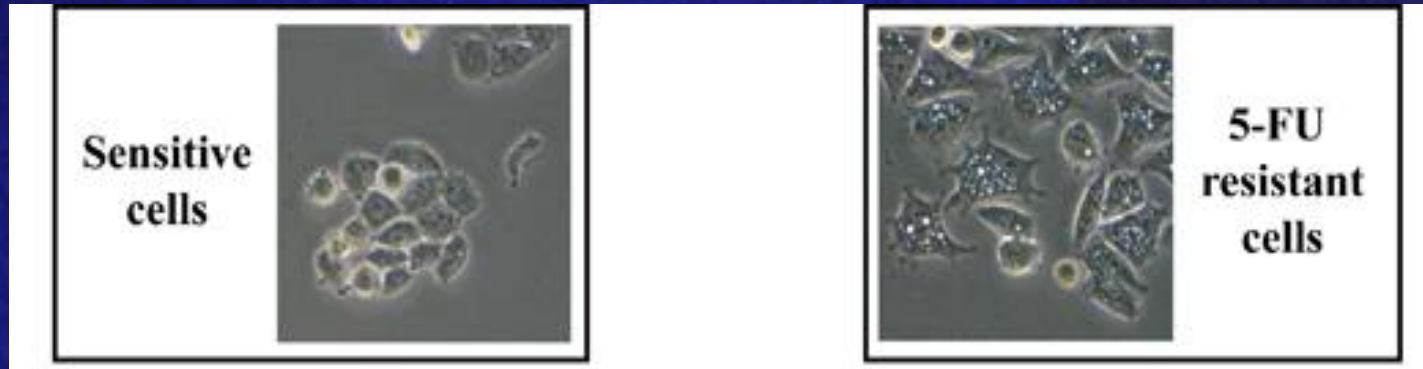


Identificazione di cluster di geni coinvolti nella proliferazione delle cellule tumorali

Classificazione delle cellule tumorali sulla base del pattern di espressione genica

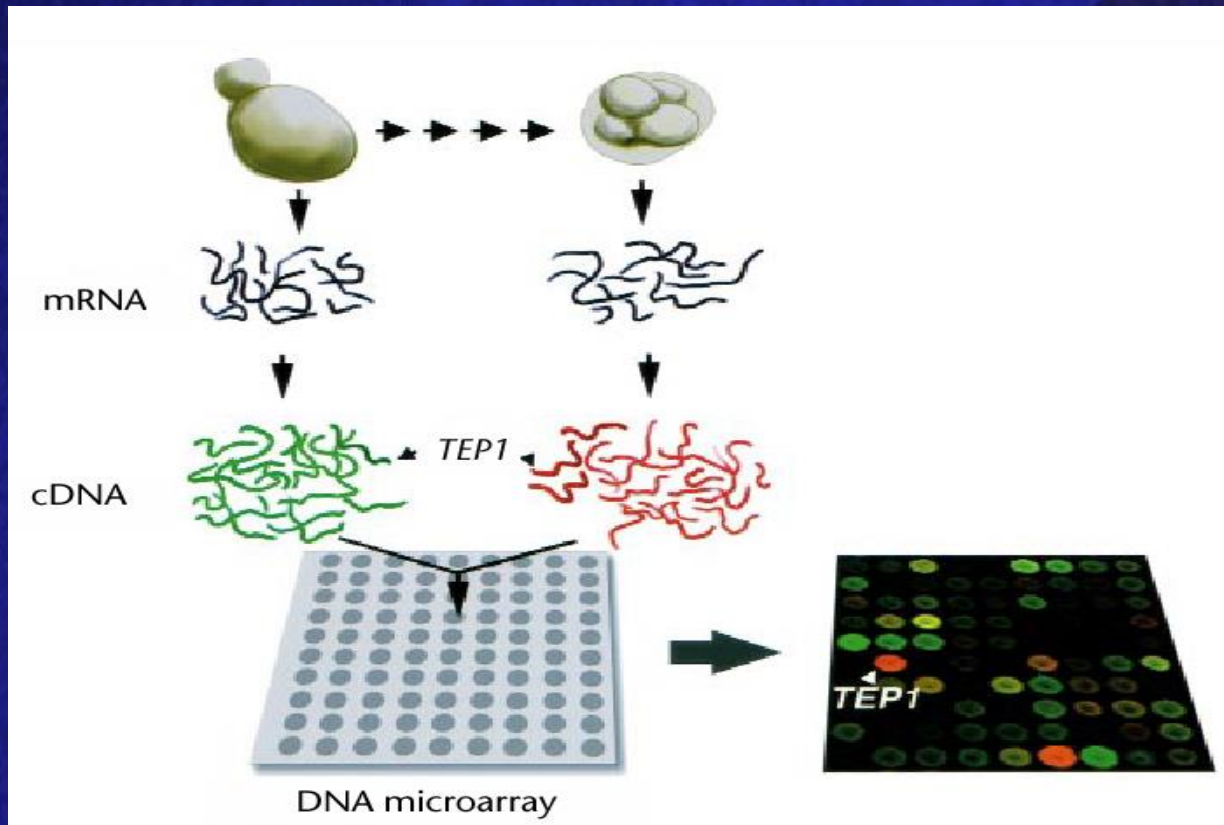
Associazione di pattern d'espressione genica con il decorso clinico

PREDIZIONE DELLA CHEMIORESISTENZA DELLE CELLULE TUMORALI



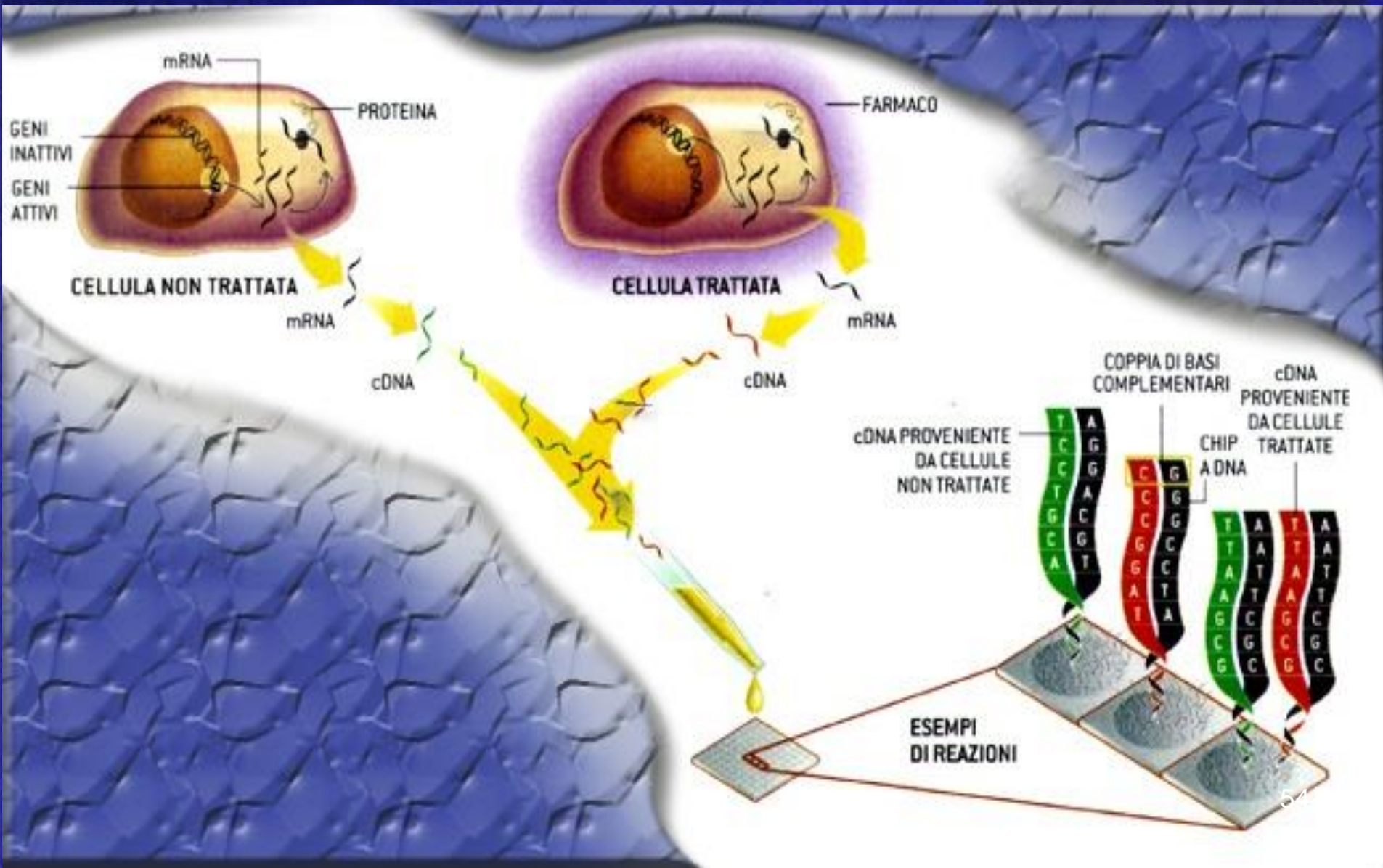
Dall'analisi del trascrittoma di cellule tumorali resistenti o sensibili ad un particolare chemioterapico, è possibile identificare un cluster genico associabile alla chemioresistenza.

DEFINIZIONE DEL TIPO CELLULARE IN BASE AL GRADO DI DIFFERENZIAMENTO

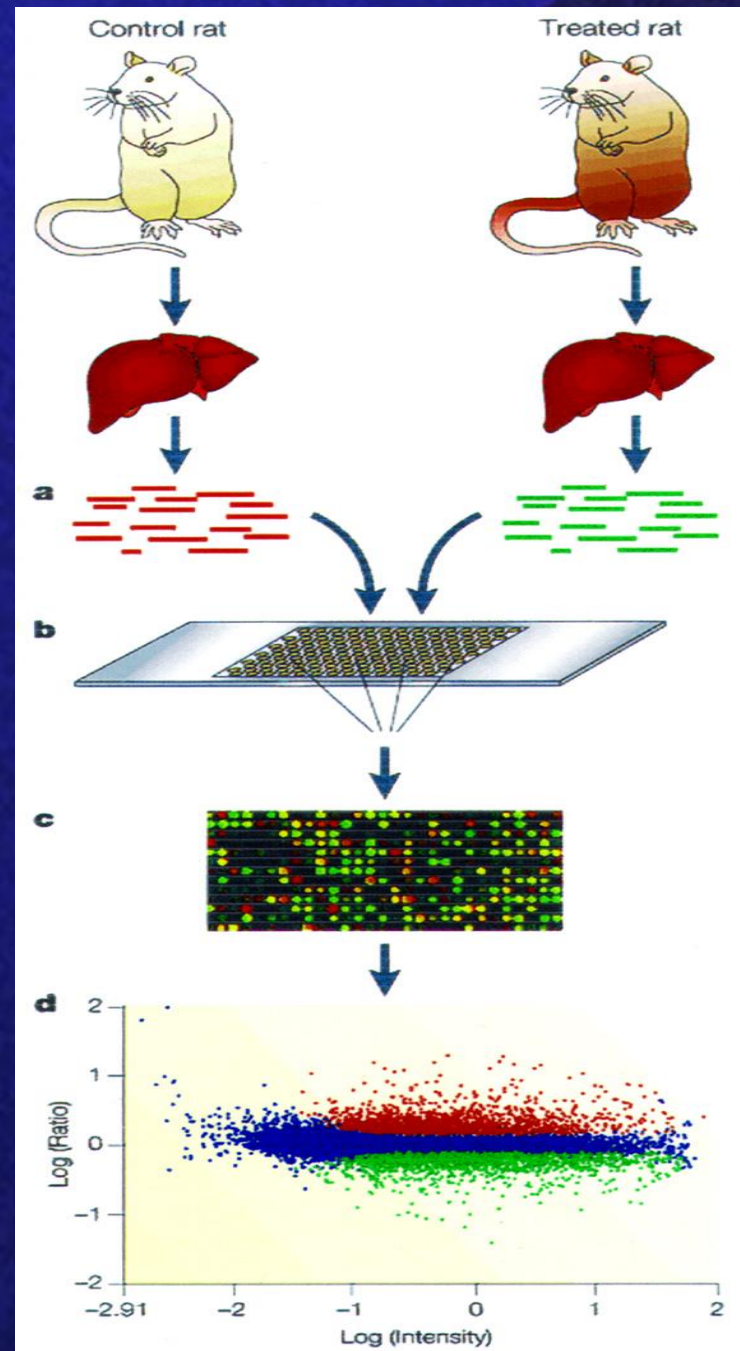


Dall'analisi del profilo trascrizionale di differenti tipi di cellule staminali è emerso un cluster di circa 200 geni che caratterizzano le cellule staminali prima del processo di differenziamento.

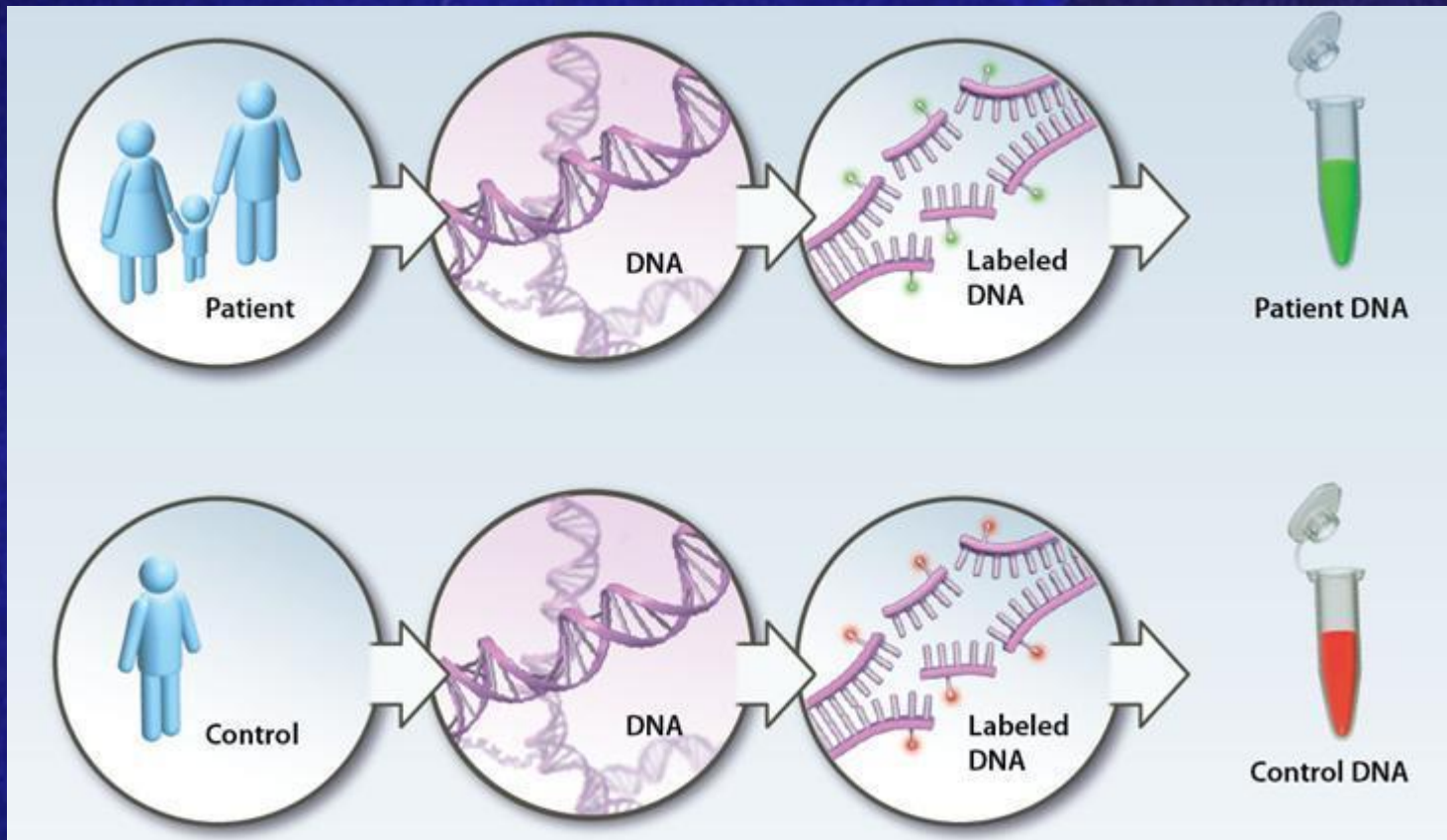
STUDIO PRECLINICO DI FARMACI



TOSSICITA' DI UN FARMACO



APPLICAZIONI DEL MICROARRAY IN CLINICA



PRATICA CLINICA

Indicazioni sull'agente patogeno di un'infezione

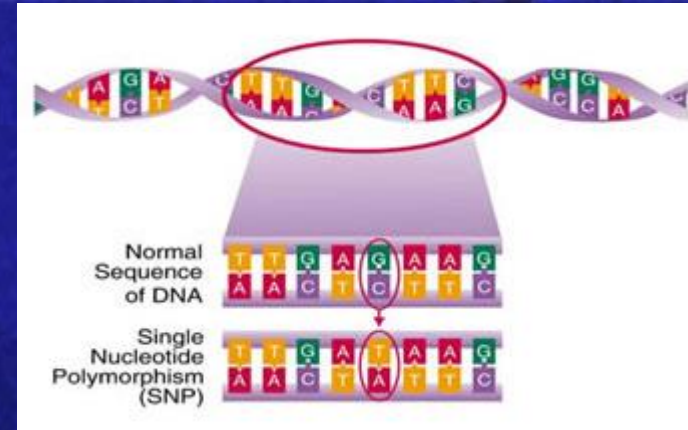
Indicazioni su predisposizioni genetiche individuali a particolari malattie. Es: Alzheimer, diabete, particolari tumori, ecc.



Chip a SNPs

SNP

Single Nucleotide Polymorphism



Sequenze di DNA in cui un singolo nucleotide viene sostituito da un altro

CHIP a SNP costruiti con sequenze correlate a malattie



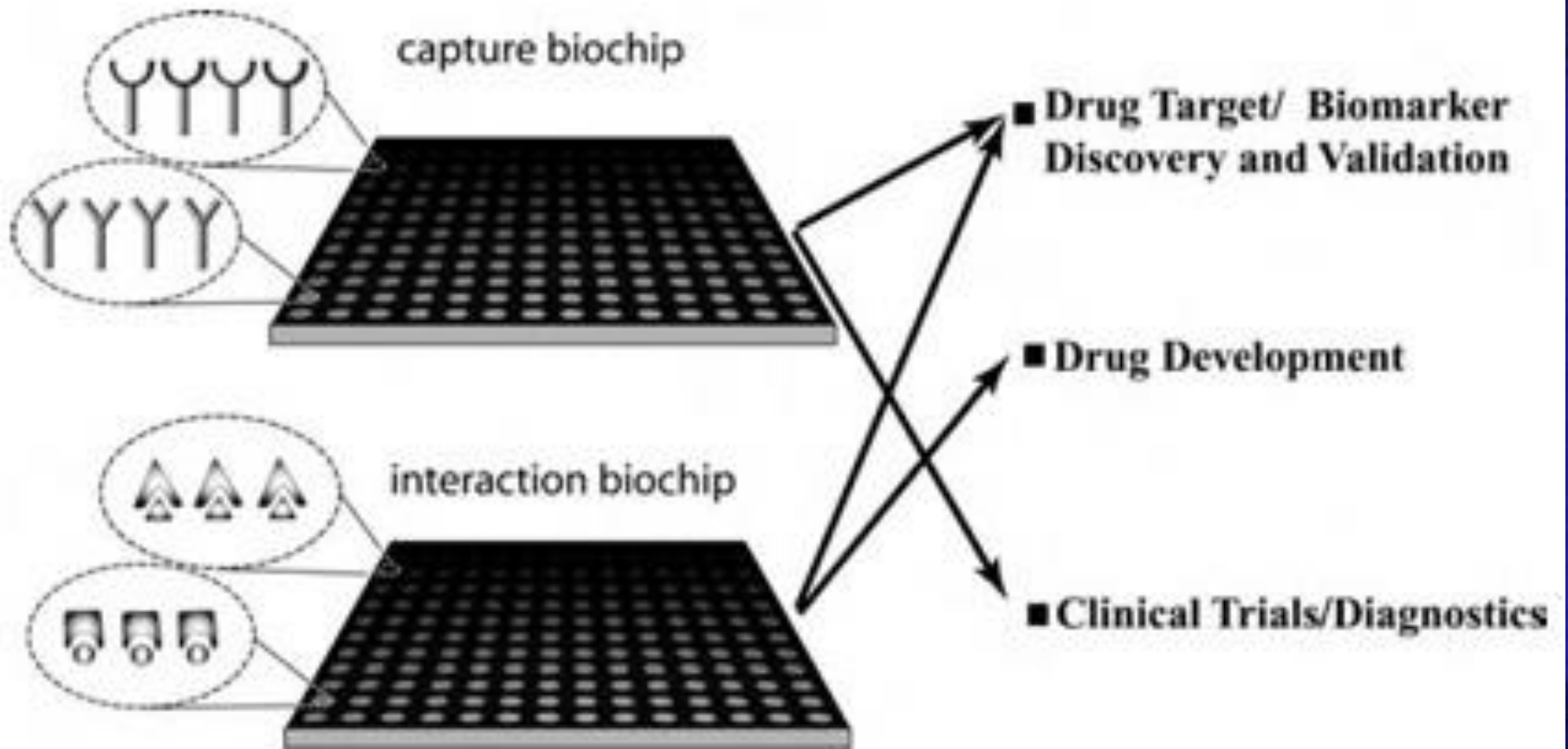
Diagnosi della probabilità di ammalarsi, terapie preventive

CHIP a SNP costruiti con varianti alleliche responsabili della diversa metabolizzazione di un farmaco

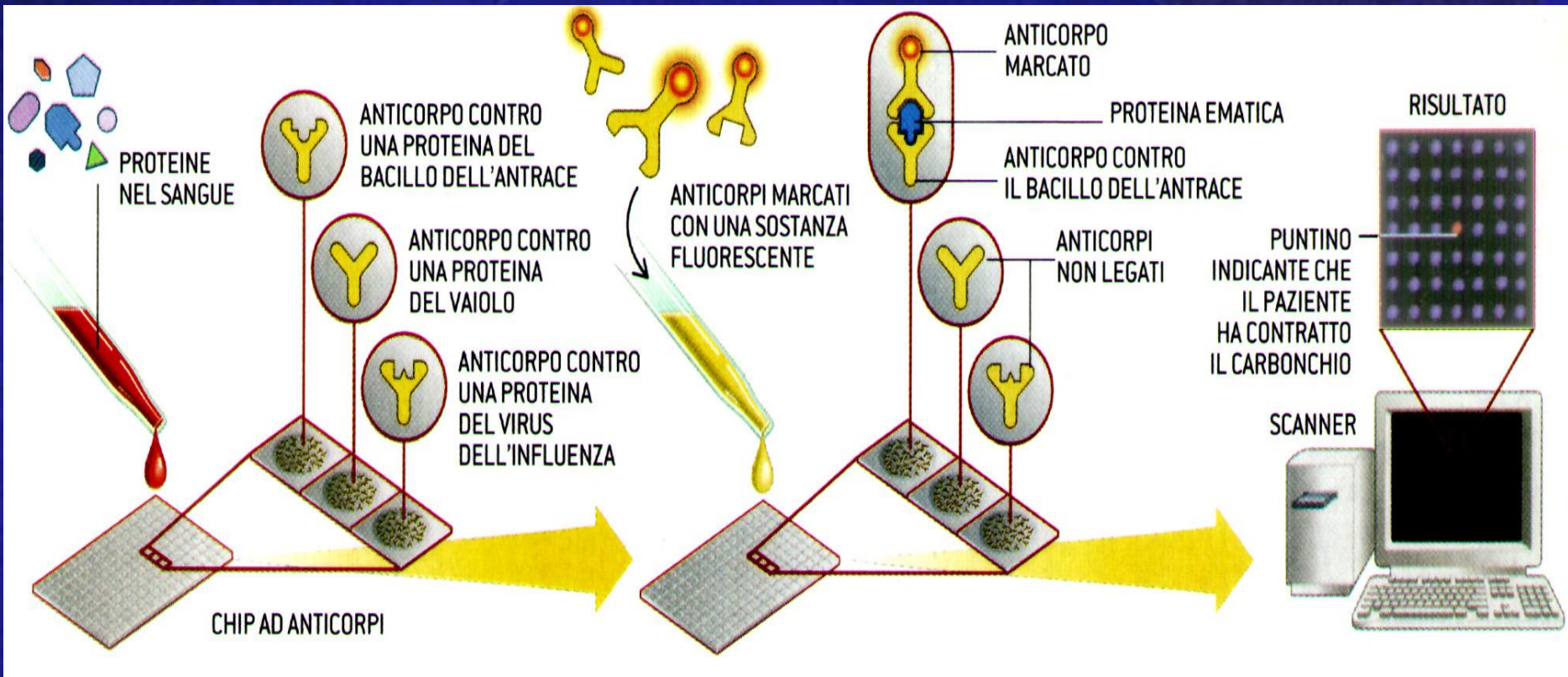


Informazioni sull'efficacia ed effetti collaterali del farmaco sull'individuo

ARRAY PROTEICI



CAPTURE BIOCHIPS

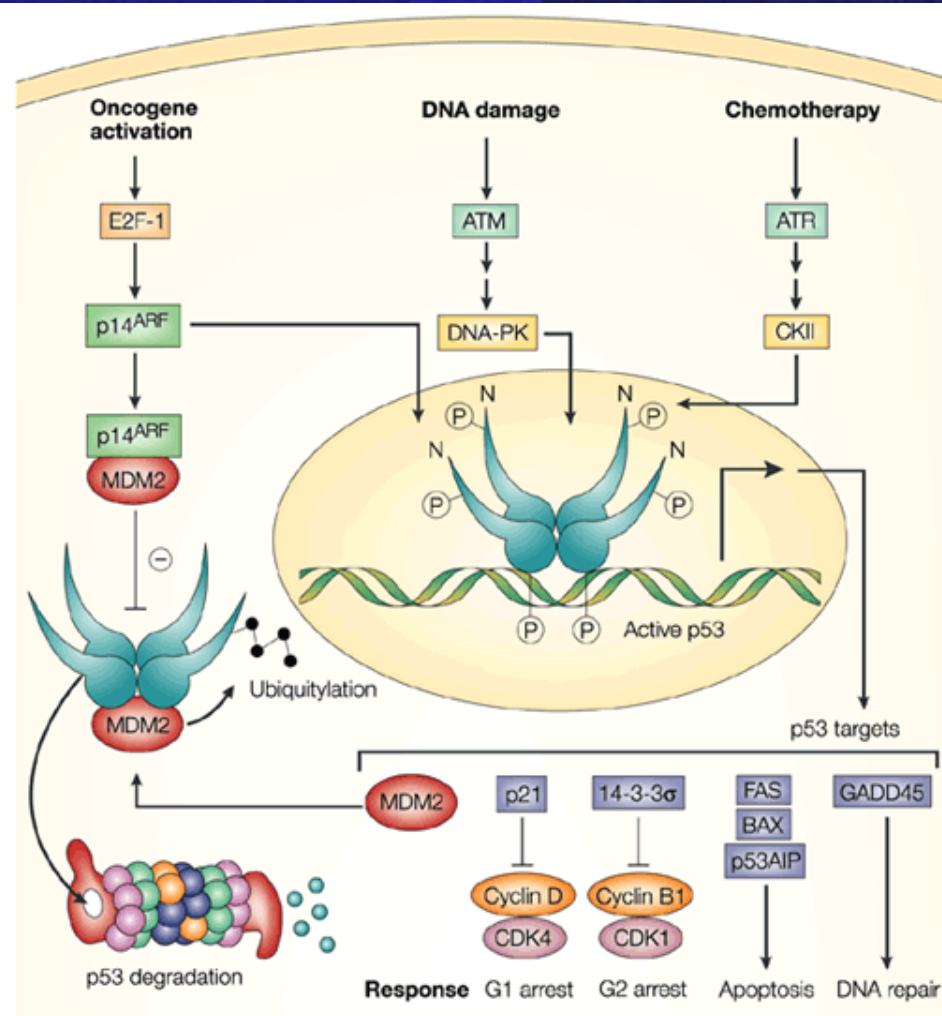


INTERACTION BIOCHIPs

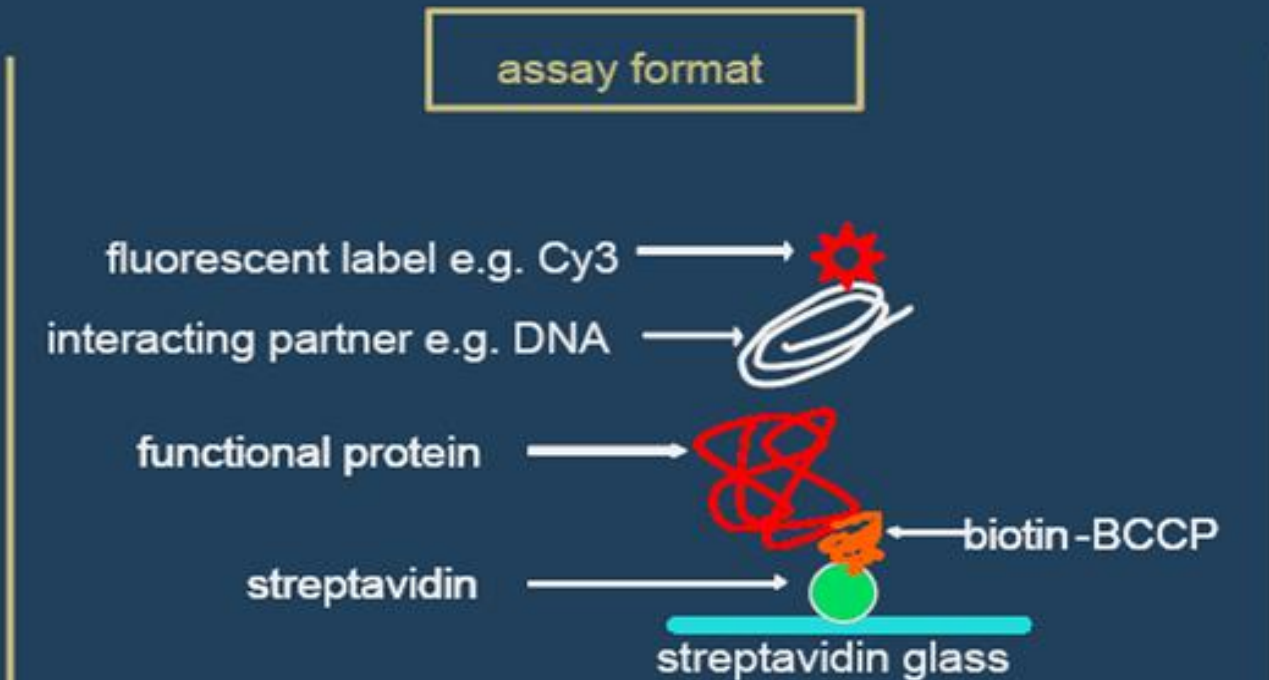
characterisation of wild type and variant p53

'Guardiano del genoma'

Tumor suppressor gene



Wild type and mutant p53 were spotted onto streptavidin coated slides.



- Arrayed proteins are captured onto glass via a BCCP tag. The use of this tag ensures that arrayed proteins are:
- correctly folded (only correctly folded tag is biotinylated)
 - orientated such that interaction with probe is possible
 - strongly bound via biotin:streptavidin linkage
 - easily purified and captured in single step

experiment format



1. array of immobilised proteins is interrogated with labelled probe e.g. DNA or protein.

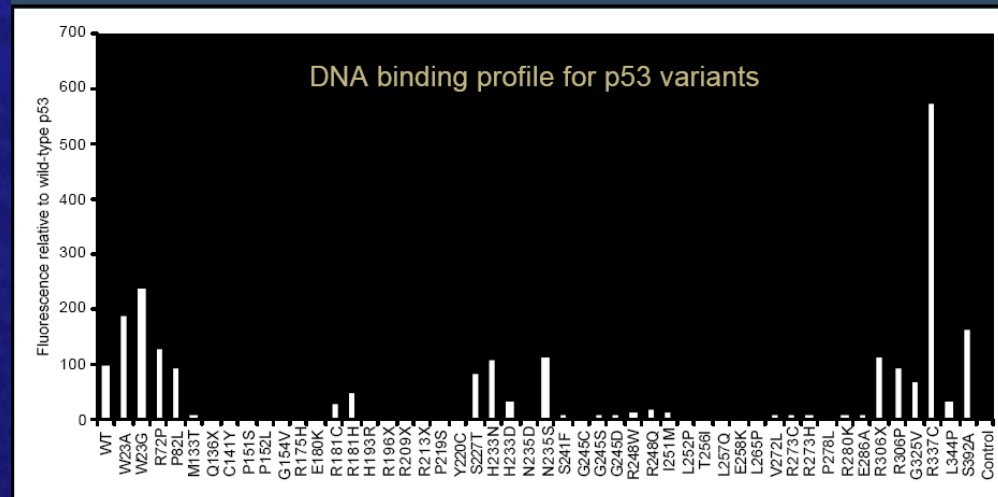
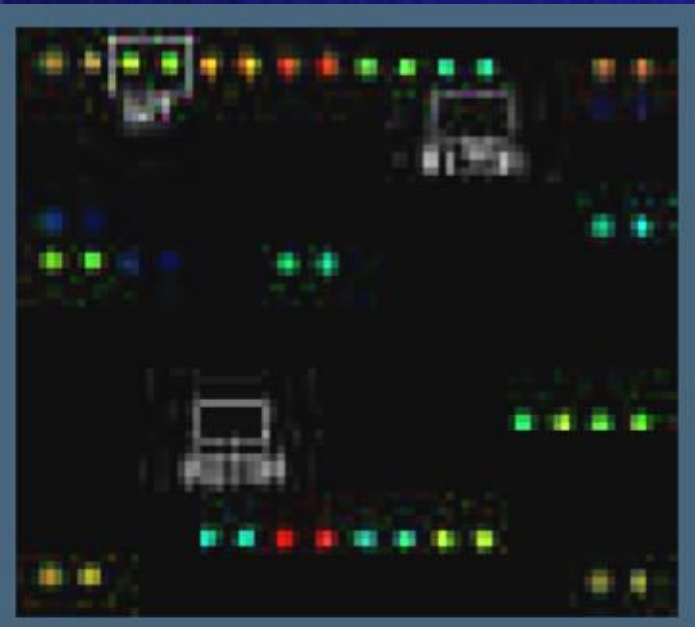


2. incubation allows interaction between probe and proteins on the array. Unbound probe is removed in wash steps.



3. interactions are identified by detecting fluorescent signals using an array scanner.

DNA binding assay: to study protein function an assay was devised which measured the ability of arrayed proteins to bind Cy3-GADD45 promoter DNA. After binding, the intensity of fluorescent signals for mutant p53 was compared with that for wild type p53 so that any effect of mutation on the ability of p53 to bind DNA could be determined. The data were presented as a bar chart comprising a DNA binding profile.



This technology provides a powerful multiplex tool for characterising protein function. The p53 array will enable many more questions to be addressed concerning how mutations in this protein modulate its oncogenic properties.