

# ***Farmacologia cellulare e molecolare***

***AA 2022/23***

***PR***

## **Metodiche di biologia molecolare applicate alla farmacologia:**

- CRISPR-Cas9
- Real Time qPCR
- Chromatin Immuno Precipitation (Chip)
- Metilazione del DNA
- Western Blotting

**Due modi per agire sui geni e i loro prodotti:  
modificare il DNA o eliminare l'mRNA**

**1**



**Tramite la terapia genica  
o DNA editing (o *genome editing*)**

**2**



**Tramite l'impiego di aODN  
*Small interfering RNA (siRNA)***

**1** Lo studio delle basi genetiche associate ad una malattia attraverso l'impiego delle moderne strategie di sequenziamento, ha permesso di associare diverse mutazioni a specifiche condizioni patologiche.

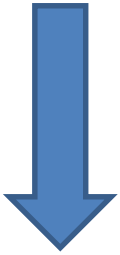
Da queste osservazioni sono nate nuove strategie volte a :

- Inserire una sequenza di DNA codificante per una proteina non funzionante o mancante → **terapie genica**
- Sostituire il DNA mutato con una sequenza genica corretta → **DNA editing**



# I primi approcci volti a modificare il DNA hanno sfruttato:

→ il meccanismo di ricombinazione del DNA, che presentava alcune difficoltà come la frequenza con cui poi veniva espresso il prodotto. Nonostante l'utilizzo di enzimi di restrizione ancora era difficile tagliare con precisione il DNA



## Problematiche superate con la CRISPR-Cas9

Questo approccio permette di:

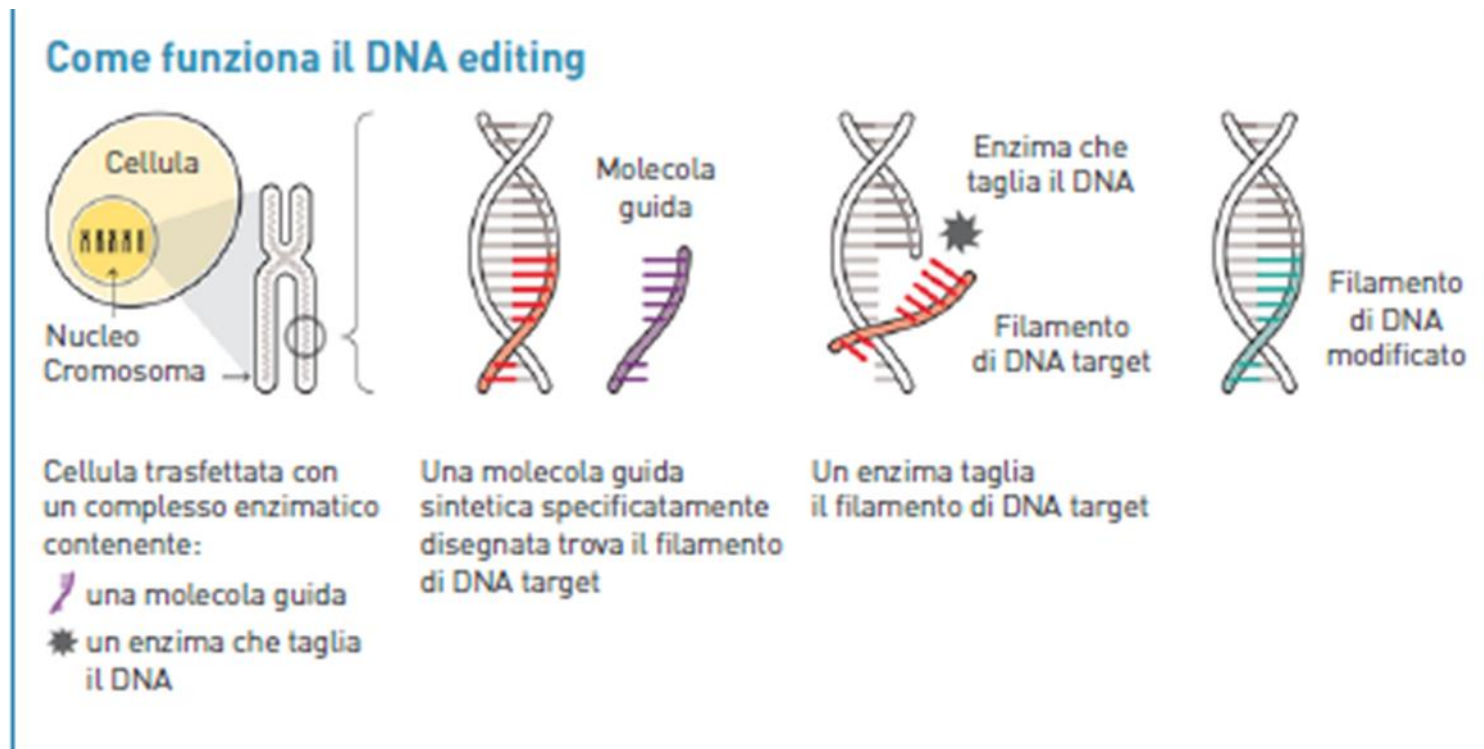
- 1) eliminare una sequenza di DNA
- 2) introdurre o correggere una mutazione
- 3) inserire una sequenza di DNA
- 4) attivare o reprimere l'espressione di un gene.

Questo approccio presenta ad oggi alcune limitazioni ed è legato anche ad aspetti etici e alla necessità di un'attenta valutazione del bilancio rischio/beneficio.

# Il complesso CRISPR-Cas9 è un complesso formato da :

Una proteina Cas9 ad attività enzimatica e una sequenza di RNA

Trae origine da un meccanismo di immunità adattativa che i batteri hanno conservato per riconoscere e proteggersi da DNA esogeno.

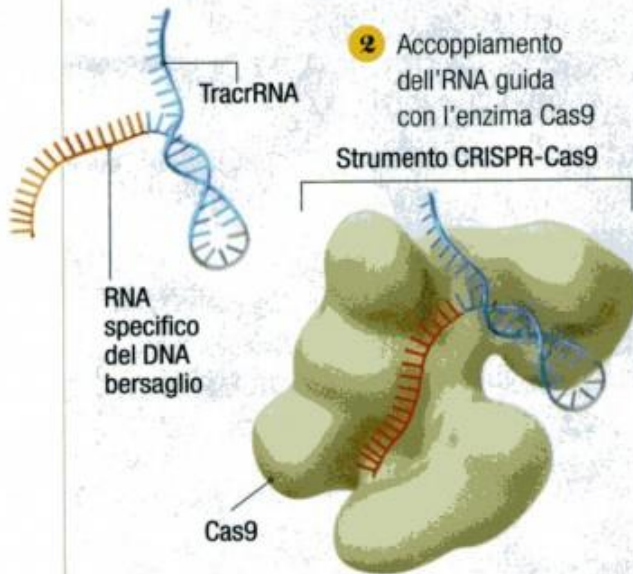


# Come funziona lo strumento CRISPR-Cas9

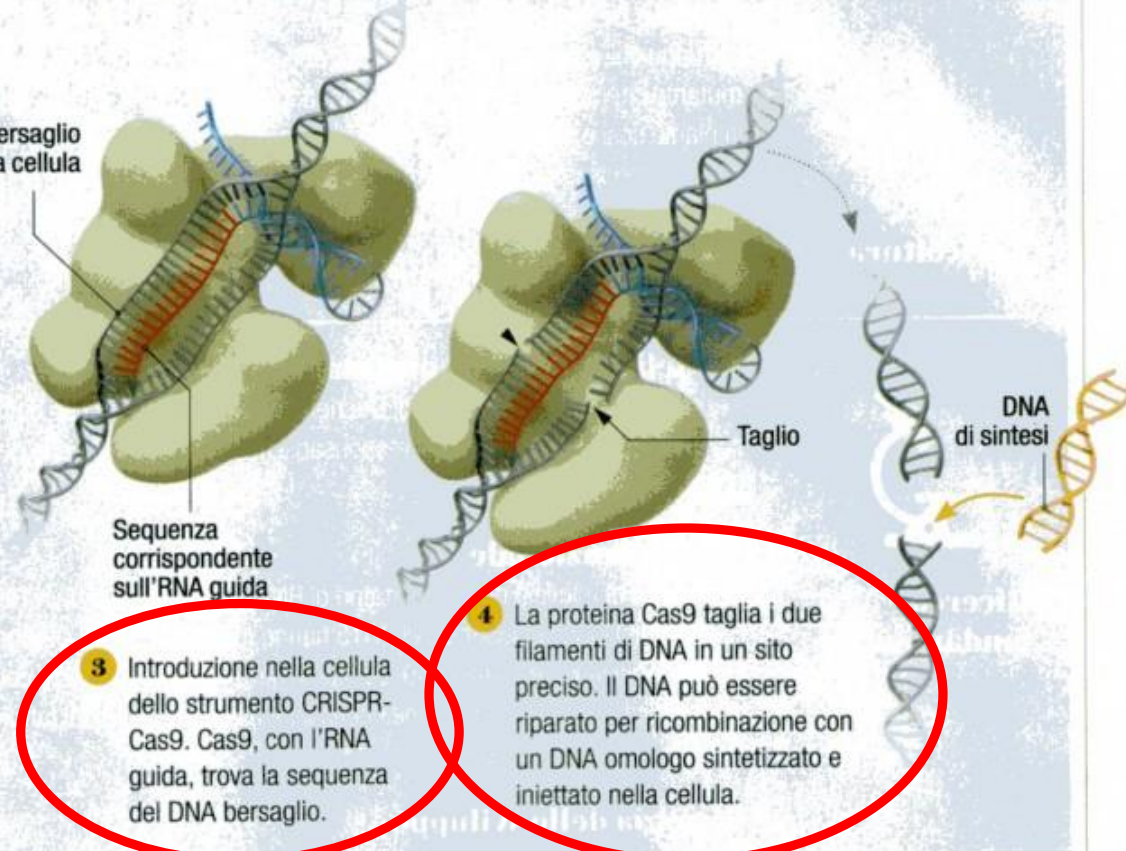
I batteri hanno sviluppato un'arma precisa ed efficace, CRISPR-Cas9, contro le invasioni virali. I biologi l'hanno sfruttata per farne forbici molecolari che tagliano, nelle cellule, il DNA in un sito bersaglio. Contrariamente ai metodi precedenti per modificare il genoma, i quali richiedono enzimi spe-

cifici in ciascuna situazione, lo strumento CRISPR-Cas9 utilizza la stessa proteina, l'enzima Cas9, per ogni situazione. Il solo elemento specifico da costruire è un RNA, che guida l'enzima Cas9 nel punto del genoma da tagliare. E gli RNA sono molto più semplici da sintetizzare degli enzimi.

- 1 Costruzione di un RNA guida per fusione delle sequenze di un RNA batterico (tracrRNA) e di un RNA specifico (complementare) della sequenza del DNA bersaglio.



DNA bersaglio nella cellula



## 2 Agendo sull'RNA andiamo ad agire su un prodotto, senza quindi modificare il codice genetico.

La tecnica di interferenza dell'RNA deriva dal concetto generale che:

**Un RNA in presenza di una catena complementare di RNA forma un doppio filamento molto stabile che non può essere tradotto**

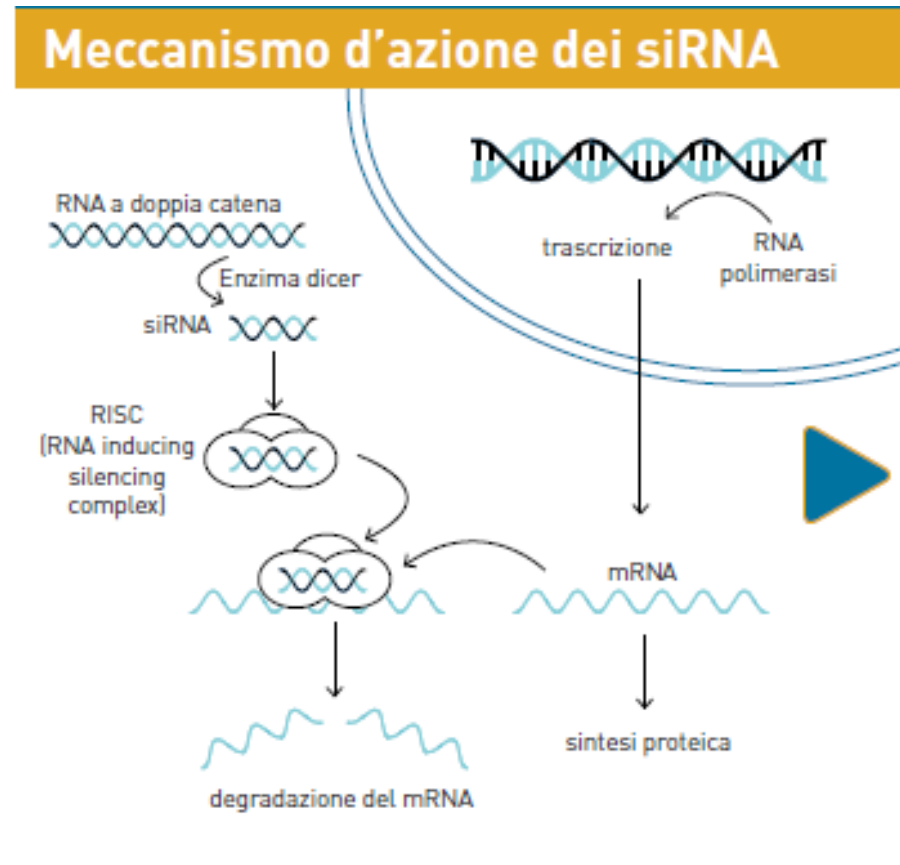
**= sintesi proteica abolita**

**Andrew Fire and Craig Mello  
nel 2006 premio Nobel**

Scoprirono che quando una cellula è esposta ad un **RNA a doppio filamento** si può avere un silenziamento genico specifico perché:

**1<sup>^</sup>- si attivano delle RNA endonucleasi che lo tagliano in piccoli frammenti** perché lo riconoscono come estraneo (**siRNA**)

**2<sup>^</sup>- i siRNA si associano al complesso RISC che li guida verso l'RNA complementare → a cui si legano favorendone la degradazione**



**SILENZIAMENTO POST-TRASCRIZIONALE**



# Real Time qPCR

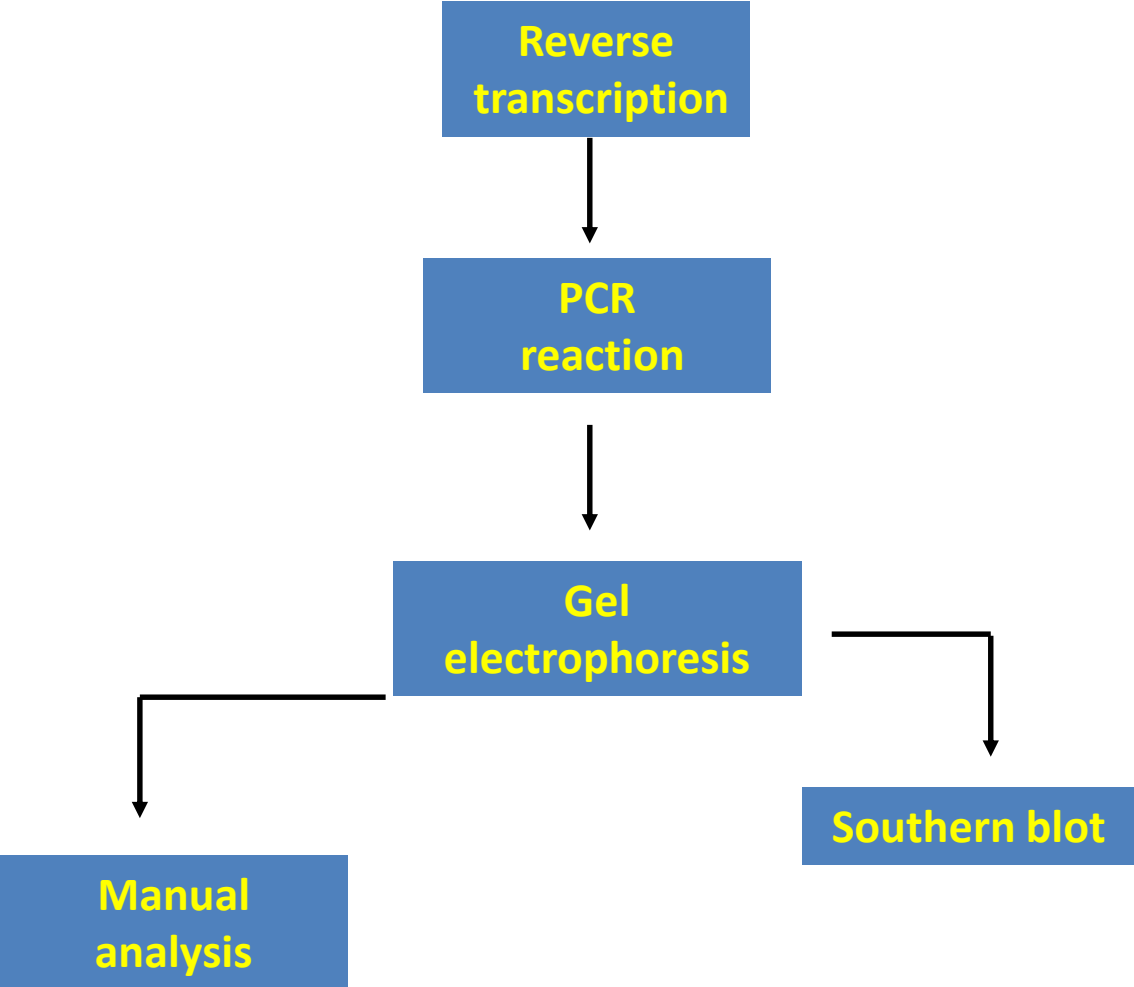
## La PCR

**una tecnologia che consente di amplificare una specifica sequenza di DNA milioni di volte in poche ore**

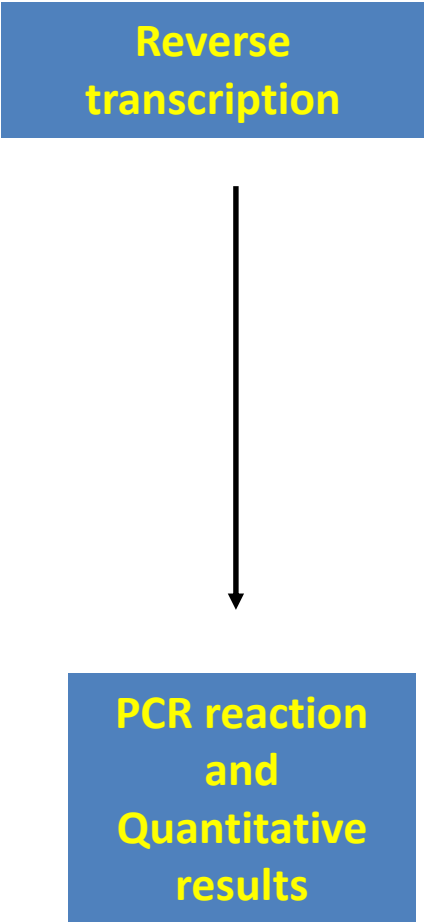
**quando siano note le estremità 5' e 3' della sequenza del gene di interesse**

- 1. Retrotrascrizione dell'RNA in cDNA**
- 2. Amplificazione del cDNA tramite PCR**
- 3. Quantifica dei prodotti amplificati**

# RT-PCR convenzionale



# Real-time RT-PCR



# 1- RETROTRASCRIZIONE (o **reazione di trasrizione inversa**)

è una fase comune sia a quella tradizionale che alla Real Time

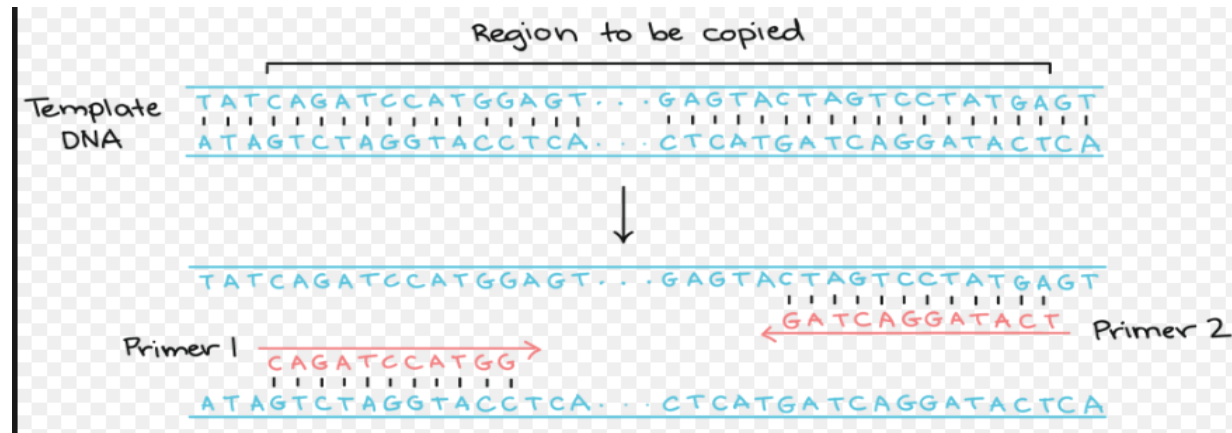
Consente di produrre una molecola di cDNA (**DNA complementare**) partendo da una molecola di RNA, grazie all'utilizzo dell'enzima Trascrittasi Inversa

che viene sfruttata in laboratorio per retrotrascrivere molecole di RNA (essenzialmente mRNA) in DNA complementare.

➤ e che possedendo attività **RNase H =>** degrada gli ibridi DNA-RNA che si formano durante la retrotrascrizione.

## 2- PCR

1. “Stampo”: una piccola quantità di DNA che si vuole amplificare (**templato**)
2. Il cosiddetto “enzima operaio”, l’enzima **Taq Polimerasi che sintetizza il DNA**
3. **“mattoni”**: riserva di nucleotidi liberi costituiti da Adenina, Timina, Citosina, Guanina (**dNTPs** : Miscela equimolare di dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
4. **Primers (oligonucleotidi)**: sequenze di DNA a singola filamento (20-30 nucleotidi) che hanno la funzione di innescare la reazione di sintesi [un primer **Forward** complementare a un filamento di DNA all’inizio della regione bersaglio; l’altro **Reverse** complementare all’altro filamento, alla fine della regione bersaglio]
5. **Probe fluorescente**



## La **DNA Polimerasi** che sintetizza il DNA

è una DNA polimerasi **termostabile** (isolato dal batterio *Termophilus aquaticus*, **Taq polimerasi**), che resiste alle temperature elevate (80-90°C) rimanendo funzionale anche durante la fase di denaturazione a 94°C. Questa proprietà ha permesso l'automatizzazione dell'intera procedura, e un deciso miglioramento della specificità della reazione.

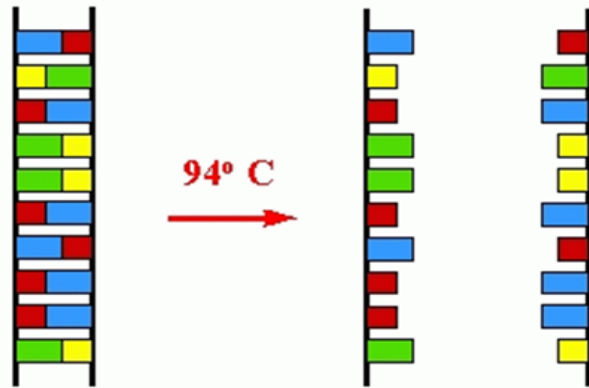
La Polimerasi **catalizza l'inserimento dei dNTP nella catena in formazione;** dispone i dNTP nella corretta sequenza complementare a quella del DNA di interesse.

**La PCR avviene in tre fasi successive, ognuna delle quali si svolge ad una temperatura specifica.**

- 1. Denaturazione del template:** si svolge a **94-96°C** per consentire ai 2 filamenti di DNA complementari di separarsi
- 2. Appaiamento dei primers - annealing:** il DNA template rimane denaturato perché gli strands si trovano a concentrazioni troppo basse nella miscela di reazione per potersi ri-appaiare durante il breve periodo di incubazione. I primers si appaiano alle sequenze complementari al gene target
- 3. Elongation - sintesi del DNA:** in cui l'enzima DNA polimerasi aggiunge dNTP in direzione 5'→3'

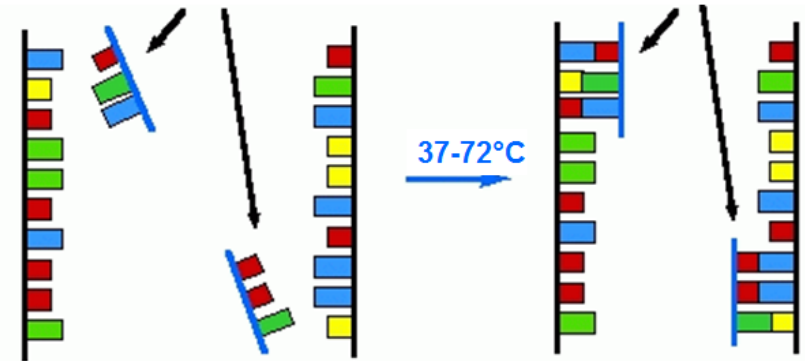
### fase 1: DENATURAZIONE

La doppia elica di DNA stampo è aperta al calore



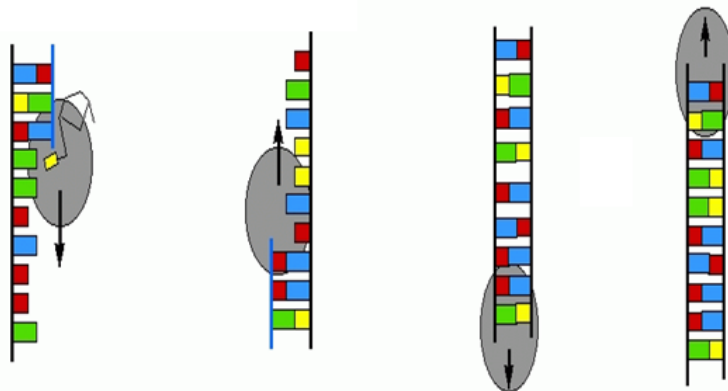
### fase 2: ANNEALING

I primers si appaiano alle sequenze complementari sul DNA stampo

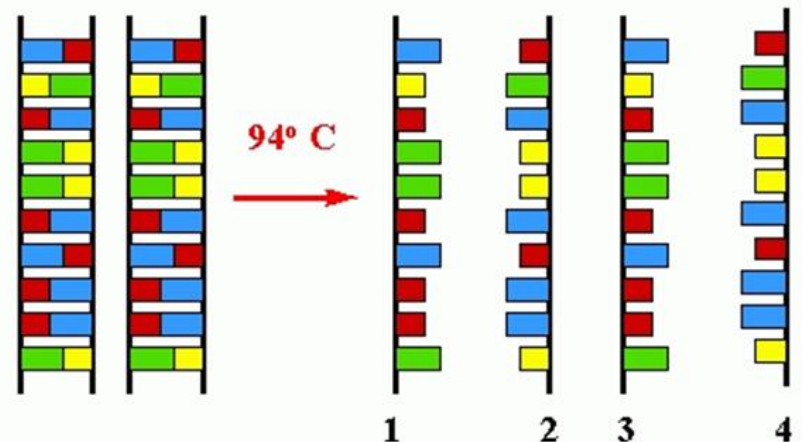


### fase 3: ESTENSIONE

La DNA polimerasi allunga gli inneschi e produce 2 nuove catene di DNA

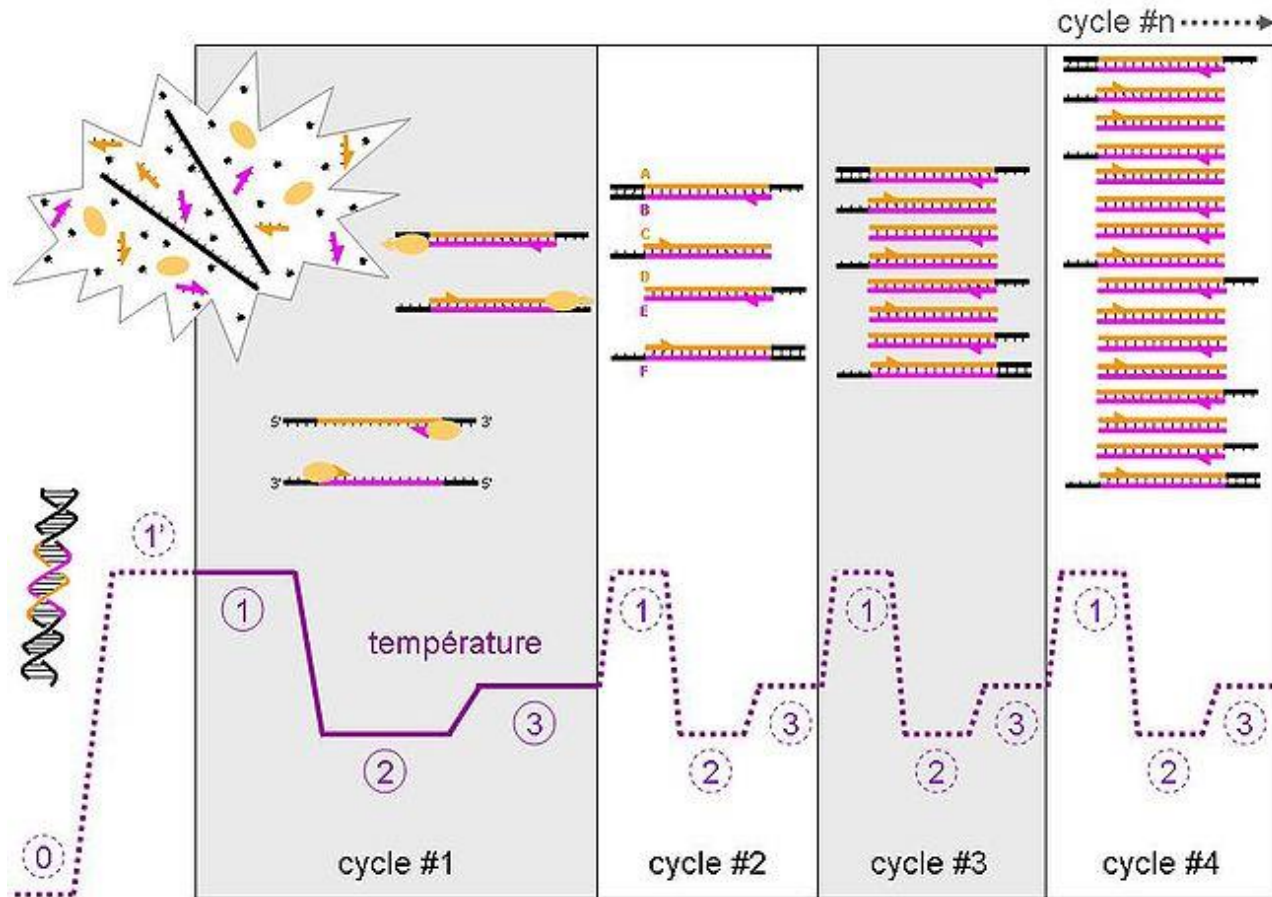


### IL PROCESSO SI RIPETE





# AMPLIFICAZIONE ESPONENZIALE



Un ciclo di sintesi risulta in due nuovi strand complementari, che, come le eliche parentali, possono ibridizzare con i primer a seguito di un successivo ciclo di denaturazione e *annealing* e **funzionare quindi a loro volta da template**.

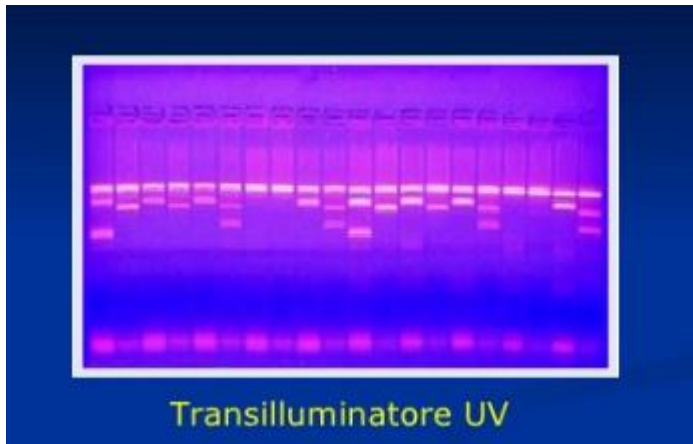
**La quantità del template si duplica ad ogni ciclo di denaturazione, annealing ed estensione, accumulandosi in maniera esponenziale.**

## RT-PCR convenzionale

I geni amplificati vengono separati mediante elettroforesi su gel di agarosio.

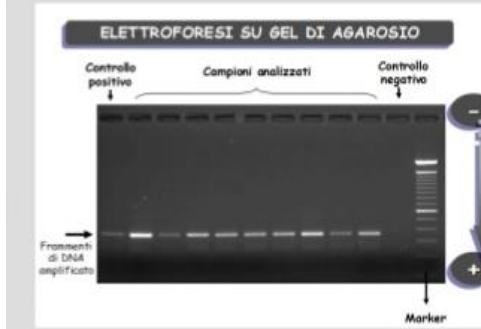
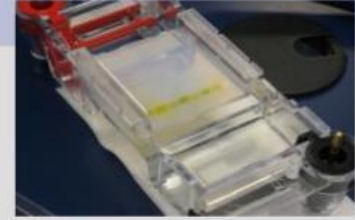
Il risultato dell' elettroforesi viene considerato **positivo** se si rileva il **frammento della lunghezza attesa** e su questo frammento si procede alla quantifica del prodotto di amplificazione (che è appunto il nostro gene d'interesse).

I prodotti di amplificazione vengono visualizzati nel gel mediante trattamento con un colorante fluorescente, come ad es. il bromuro di Etidio (EtBr). **Oggi si usano sostanze più sicure!!**



Elettroforesi su gel d'agarosio:

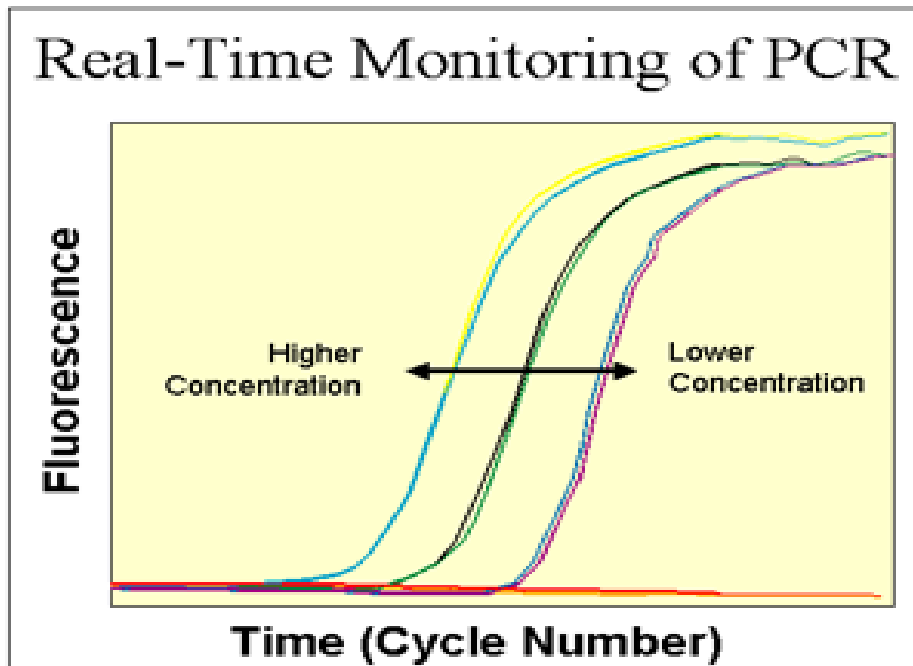
- agarosio 1%
- colorante gel
- loading dye
- marcatore di peso molecolare



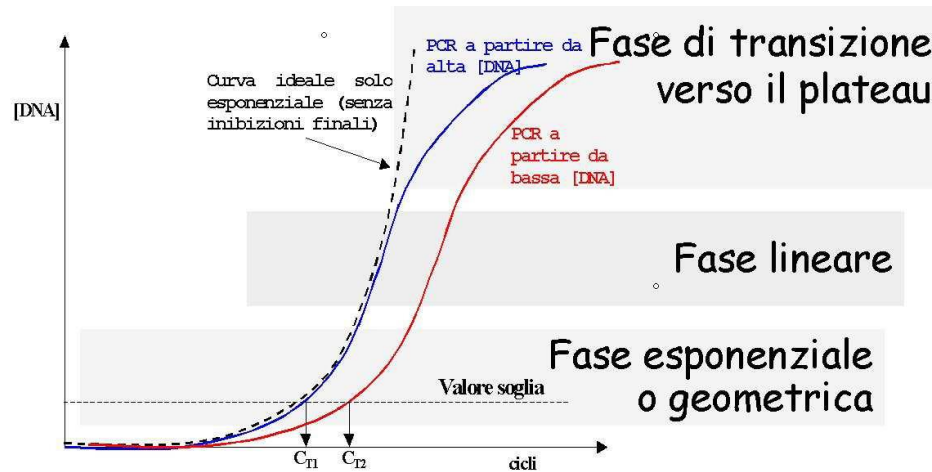
I raggi UV eccitano il bromuro di etidio intercalato tra due molecole di Timina. L'eccitazione UV provoca emissione di fluorescenza

## Perché è chiamata real time PCR?

Misura l'amplificazione in tempo reale durante la fase esponenziale della PCR, quando cioè l'efficienza di amplificazione è influenzata minimamente dalle variabili di reazione, permettendo di ottenere risultati molto più accurati rispetto alla PCR tradizionale.



**Fase esponenziale:** i reagenti sono in eccesso, templato e prodotto sono a concentrazioni talmente basse che la rinaturazione del prodotto non compete con il legame dei primers. L'amplificazione procede ad una velocità **esponenziale** costante. L'efficienza è assimilabile al 100%.



**Lineare:** l'efficienza della reazione di amplificazione diminuisce. Il DNA si amplifica più lentamente, i reagenti iniziano ad essere consumati. Il momento in cui la velocità di reazione entra nella fase **lineare** di amplificazione è estremamente variabile.

**Plateau:** La reazione di amplificazione si ferma. Il DNA non viene più amplificato, i reagenti sono tutti esauriti (END-POINT).

# Probes fluorescenti

Esistono numerosi protocolli e **chimiche** diverse per Real-time PCR. Sono tutti basati sulla *detection* di prodotti di PCR attraverso la generazione di segnali fluorescenti.

Quelli usati più frequentemente sono:

- SYBR GREEN
- TAQMAN PROBES

Il SybrGreen è un colorante fluorescente che ha bassa fluorescenza in soluzione ma emette un forte segnale fluorescente quando si lega al dsDNA, mano a mano che i prodotti di PCR si accumulano, la fluorescenza aumenta.

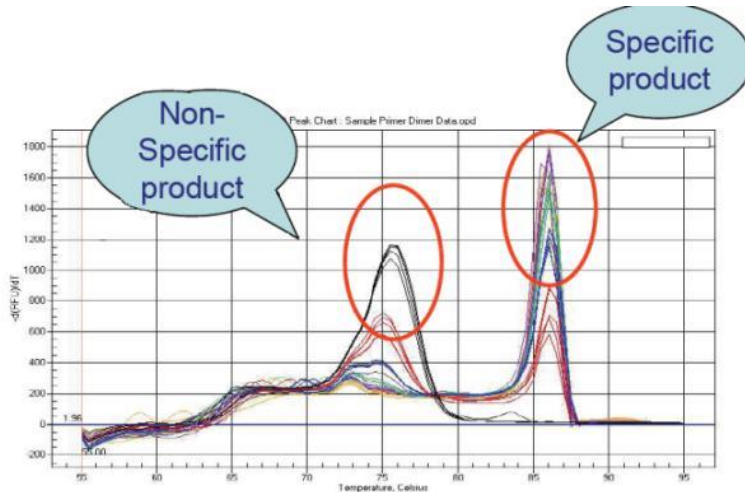
**E' il metodo più semplice ed economico per fare Real-Time.**



**Poiché il SybrGreen si lega a qualsiasi dsDNA presente nella reazione, compresi i dimeri di primers e i prodotti aspecifici, il che può indurre una sovrastima della concentrazione del target.**

## **ANALISI della CURVA di MELTING**

**Consente di identificare il prodotto di amplificazione specifico rispetto a prodotti aspecifici.**



Al termine della PCR la temperatura viene lentamente aumentata inducendo un decremento della fluorescenza.

La temperatura in corrispondenza della quale si ha un repentino decremento della fluorescenza corrisponde alla  $T_m$  (temperatura di melting a cui i primers si disaccoppiano dal template) del prodotto

# TaqMan Probes

Le sonde TaqMan sono oligonucleotidi disegnati, esattamente come i primers delle PCR, per essere complementari alla sequenza bersaglio da amplificare

Il sistema TaqMan è costituito da 2 primers + 1 sonda (probe)

Il probe è costituito da un oligonucleotide marcato con fluorocromi alle estremità 5' e 3'

• *Fluorocromo 5'* →

REPORTER

R = possiede un elevata energia ed è in grado di emettere fluorescenza

• *Fluorocromo 3'* →

QUENCHER

Q = è una molecola a bassa energia con il ruolo di spegnere la fluorescenza di R.

**l'aumento della fluorescenza emessa da R è direttamente proporzionale al numero di ampliconi generati.**

## Analisi Quantitativa relativa

Questo tipo di approccio viene **usato soprattutto in studi di gene-expression.**

L'approccio si basa sull'uso di uno **standard interno** che in genere è un house-keeping gene (gene che non “dovrebbe” variare nell'espressione), dotato delle seguenti caratteristiche:

- Stesso numero di copie in tutte le cellule
- Espresso in tutte le cellule

I più usati sono:

- ✓ **Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)**
- ✓ **Beta-actina**

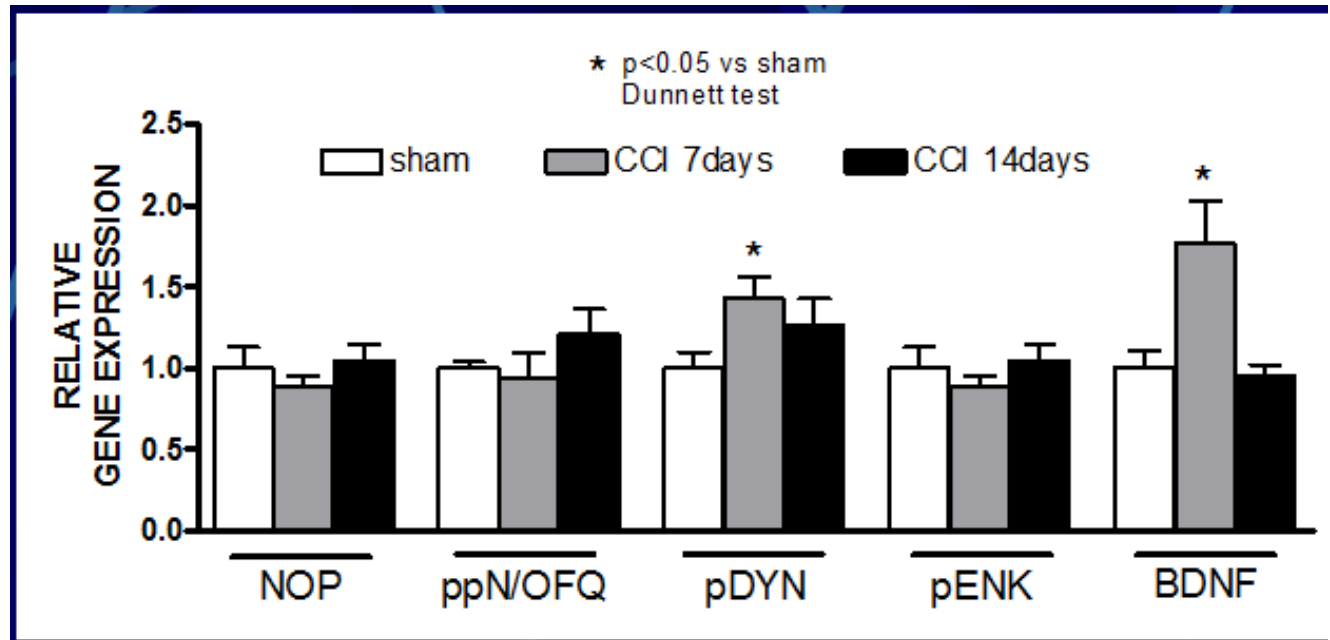


# Metodo comparativo del $\Delta\Delta Ct$

La quantità del target viene normalizzata rispetto al controllo endogeno (**house-keeping gene**) ed espressa relativamente ad un campione di **controllo**.

$$\Delta\Delta Ct = (Ct \text{ campione} - Ct \text{ reference}) - \text{media campione controllo}$$

**Esempio di analisi quantitativa tramite PCR dei geni di interesse in un modello di dolore neuropatico**



Sham= falsamente operati

CCI 7days= operati e sacrificati al giorno 7

CCI 14days= operati e sacrificati al giorno 14

# Tutti gli impieghi della Real Time PCR:

- ✓ Clonaggio DNA e cDNA, di geni o frammenti genici
- ✓ Mutagenesi *in vitro*
- ✓ Ingegnerizzazione DNA
  
- ✓ Test diagnostici per la presenza di agenti infettivi
- ✓ Diagnosi prenatale di malattie genetiche
- ✓ Analisi di predisposizione genetica a patologie
  
- ✓ analisi di variazioni di sequenza alleliche
- ✓ sequenziamento di DNA e cDNA
  
- ✓ Quantificazione delle differenze nell'espressione genica
- ✓ Identificazione di cambiamenti nell'espressione di geni sconosciuti
- ✓ Analisi forense di situazioni criminose (scienze forensi)
- ✓ Controllo di qualità industriale

# **Analisi delle modifiche istoniche**

# Chip = CHROMATIN IMMUNO PRECIPITATION

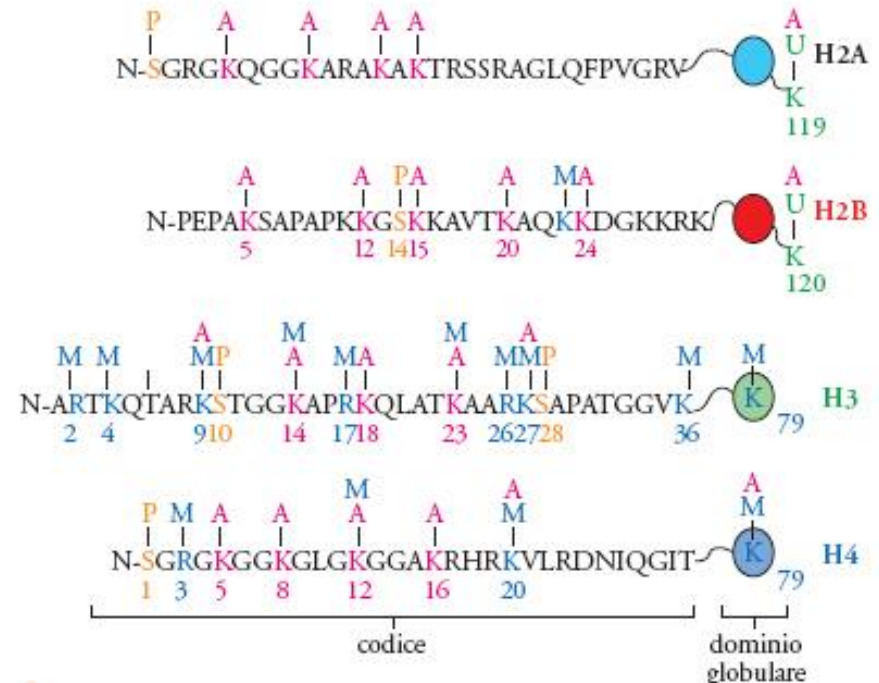
Tecnica che serve a fornire informazioni sulle interazioni DNA e proteine

## ISTONI:

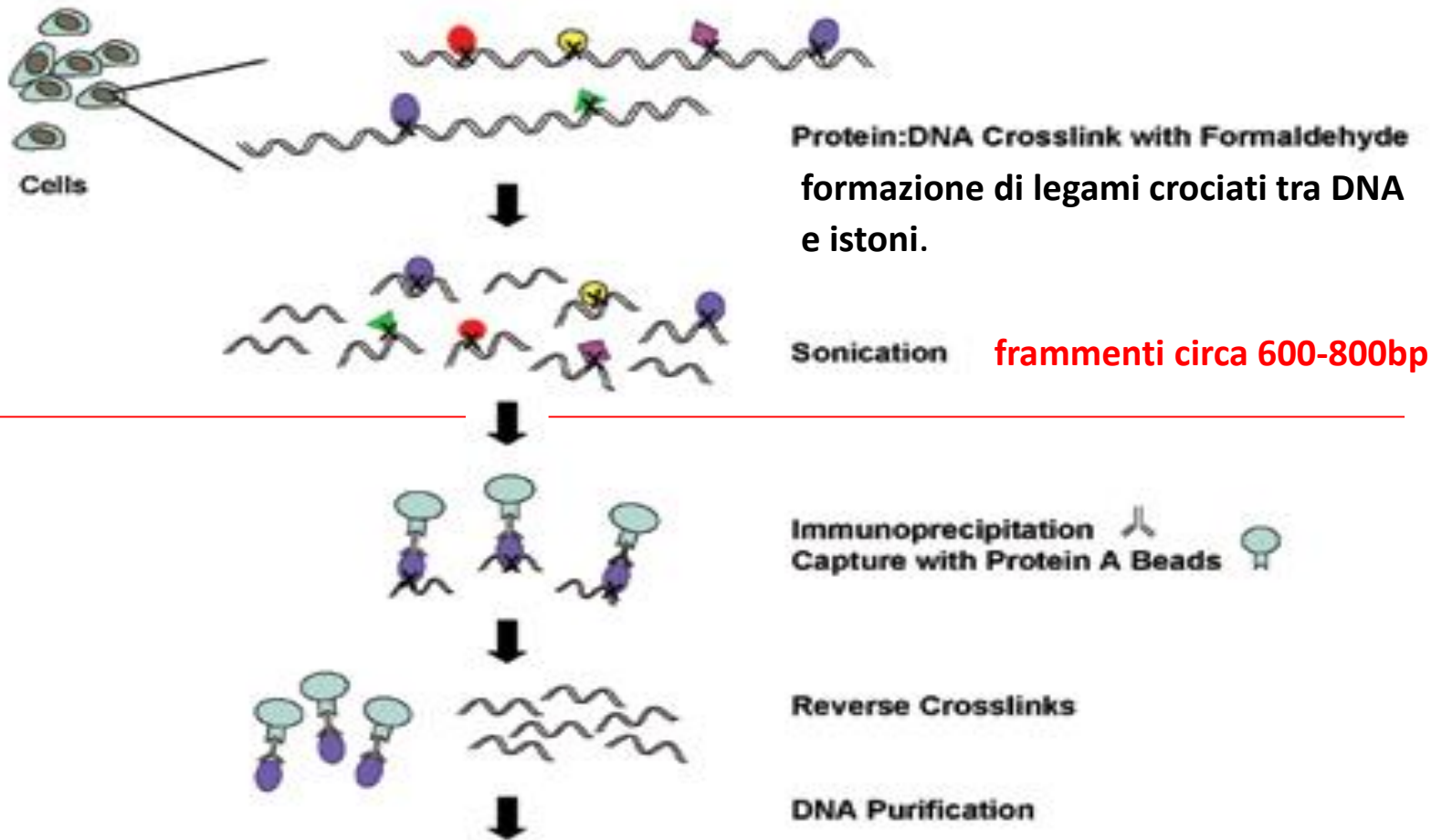
Sono proteine basiche con cariche + (Lys e Arg) costituiscono la componente strutturale della cromatina; ruolo fondamentale nel suo compattamento

Le code N-Terminali degli istoni possono subire una serie di modificazioni (acetilazione, metilazione, fosforilazione, ubiquitinazione e sumoilazione).

Il livello di queste modifiche può essere misurato all'interno di un campione biologico (cellule-sistema in vitro; o tessuti) tramite ChIP



## 1^ Estrazione della cromatina



## 2^ Immunoprecipitazione e purificazione prodotti

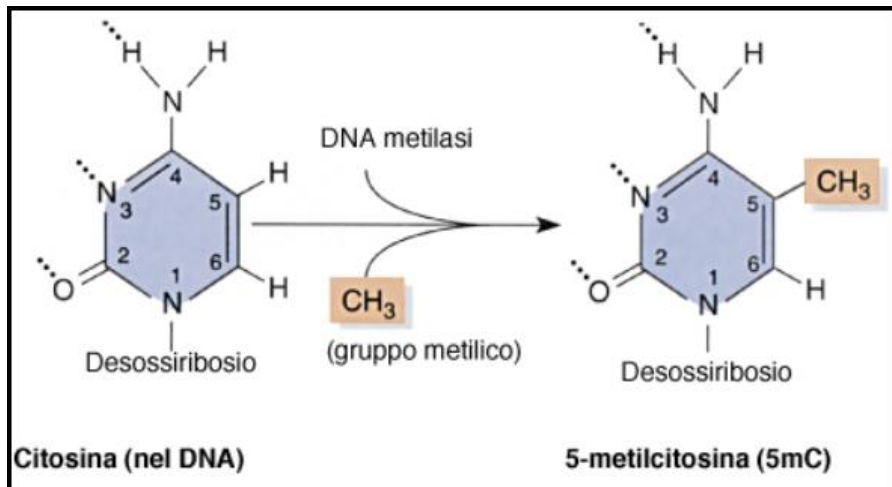
## 3^ Real Time PCR

# Analisi del grado di Metilazione del DNA

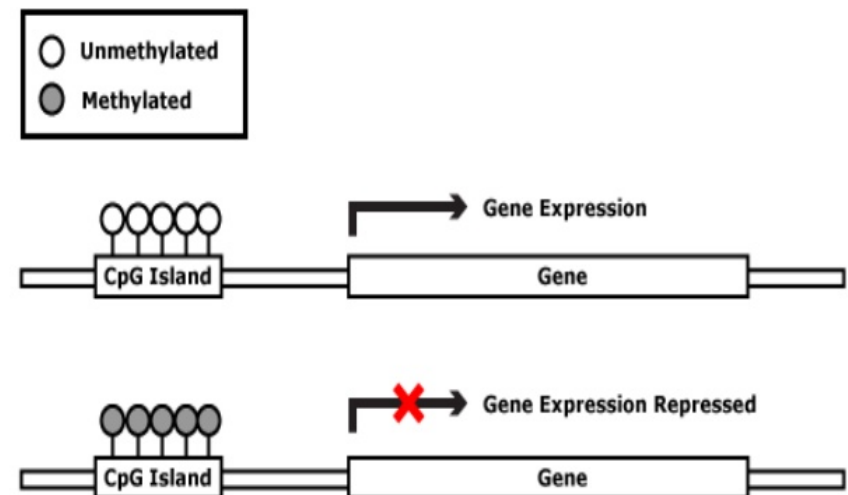
Dei circa 3 miliardi di coppie di basi che costituiscono il genoma di mammifero, circa il **40% sono coppie CG e il 2-7% di esse è metilato.**

Nelle cellule eucariotiche la metilazione è a carico della Citosina (C) delle **isole CpG** che sono tratti di genoma, nei quali le sequenze CpG sono 10 volte più frequenti, si trovano soprattutto in prossimità dei siti di inizio della trascrizione.

L'enzima DNA metiltrasferasi (DNMT) opera una metilazione in posizione 5 della citosina



## DNA Cytosine Methylation

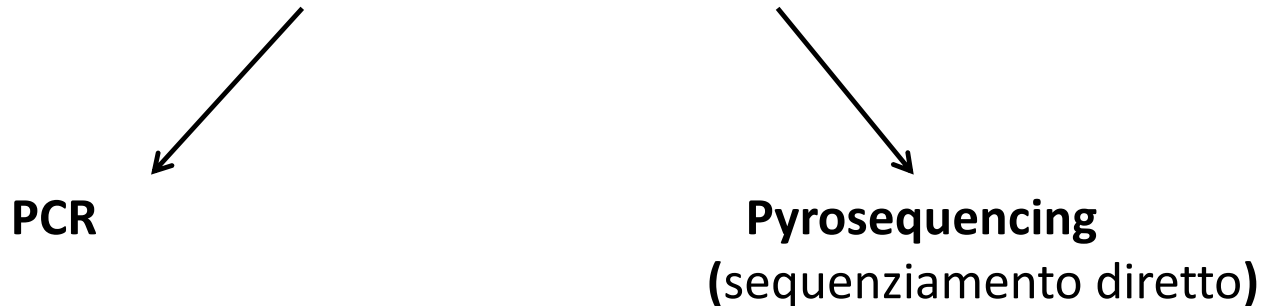


# La metilazione del DNA è associata al silenziamento genico

Esistono diverse metodiche per valutare il grado di metilazione di un gene:

- Metodiche **ELISA** che valutano il grado totale di metilazione in un campione biologico
- **Tecnica della bisulfitazione** → una reazione chimica che causa la deaminazione delle citosine, ma non quella delle metil-citosine.

In seguito è possibile analizzare la percentuale di metilazione attraverso



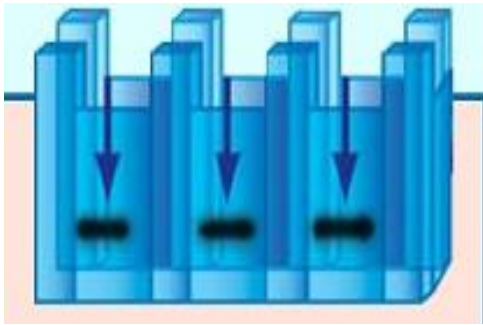
Le ultime due possono essere effettuate con precisione in specifiche regioni promotore dei geni di interesse.

**Pyrosequencing** è quella che più delle altre permette una quantificazione accurata di ogni singola citosina e una variabilità tra i diversi run molto bassa

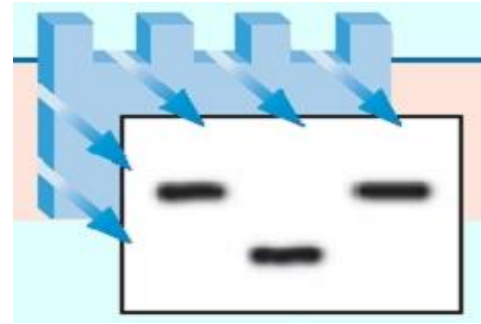
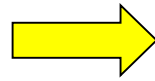
# **Analisi dei livelli di proteine**



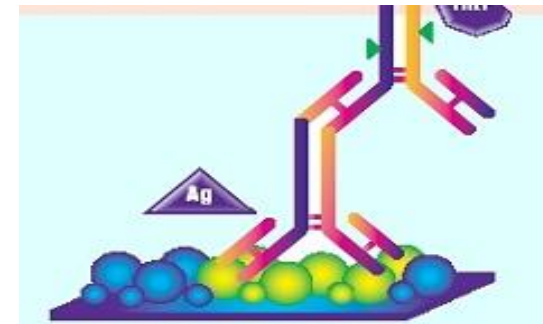
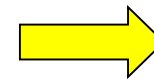
# Meccanismi di trasduzione del segnale: WESTERN BLOTTING



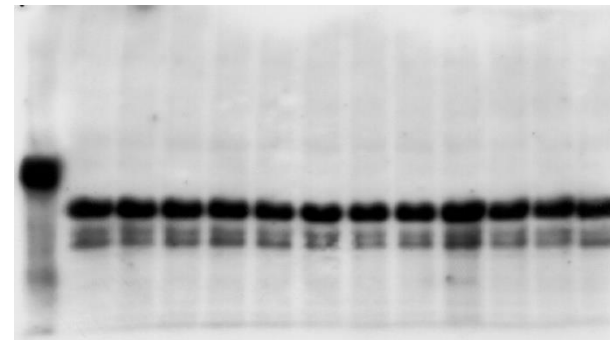
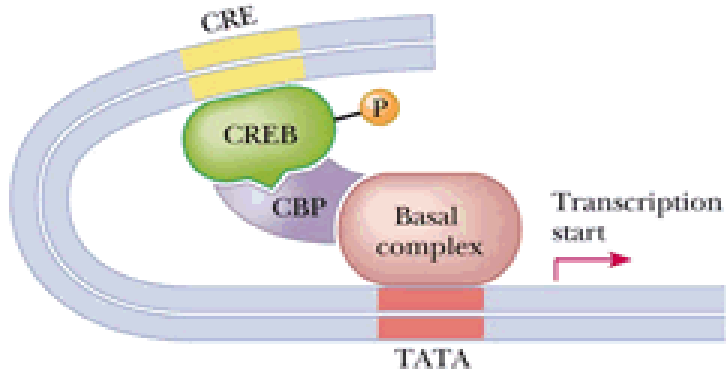
SDS-PAGE



ELECTRO-TRANSFER



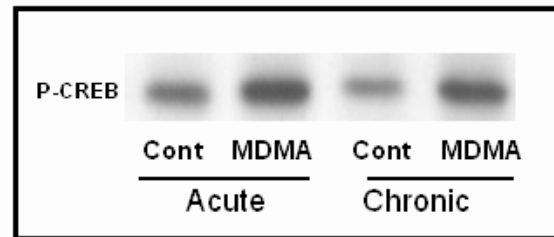
METODO  
IMMUNOENZIMATICO



← Banda di CREB

# Esempio di immuno-blot con relativa quantifica tramite analisi statistica dei livelli di proteina fosfo-CREB

a.



b.

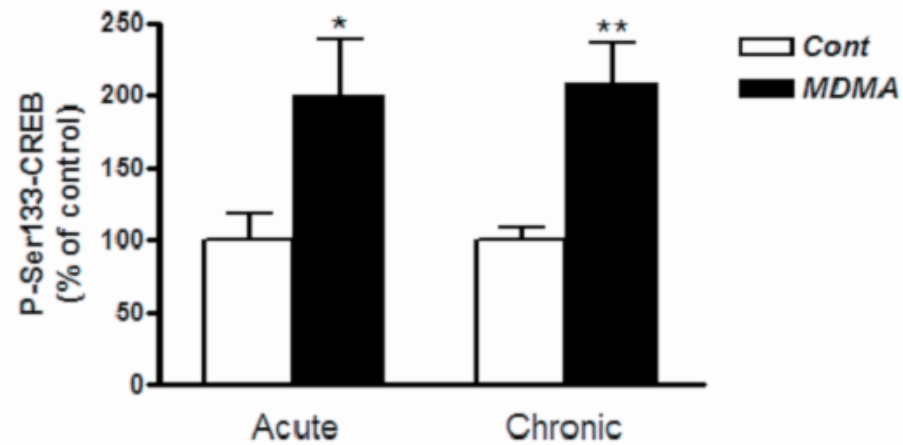


Figure 2