

Appunti di analisi dell'espressione genica su larga scala in viticoltura

Tratti dal corso di laurea in "Produzione e protezione delle piante"

Docente: Filippo Geuna

A.A. 2008/2009

Email: filippo.geuna@unimi.it


Sito Web del corso:

<http://users.unimi.it/geuna/mgv2>

<http://users.unimi.it/geuna/genetica/genetica.html>

Libro di testo





PIDICEUVE: una ricerca integrata per la creazione di una piattaforma diagnostica per la certificazione di uve destinate alla vinificazione

Approcci genomici innovativi per lo studio ed il miglioramento della qualità produttiva dell'uva

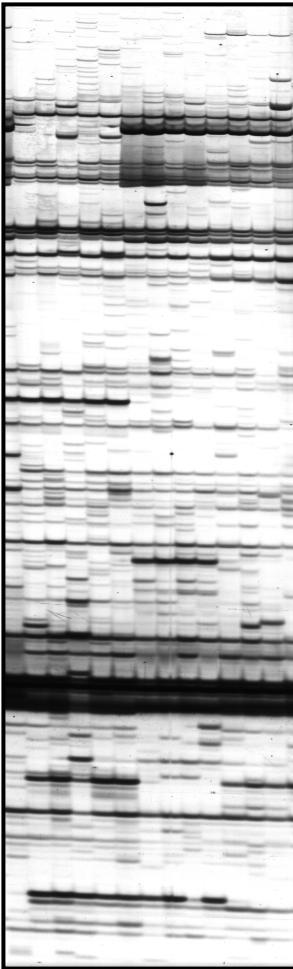
Obiettivi

- Ottenere marcatori molecolari di nuova generazione per l'identificazione varietale e clonale di vite
- Ottenere informazioni sull'espressione genica su larga scala per determinare differenze inter- o intra-varietali nella bacca in maturazione

Marcatori molecolari per il riconoscimento clonale

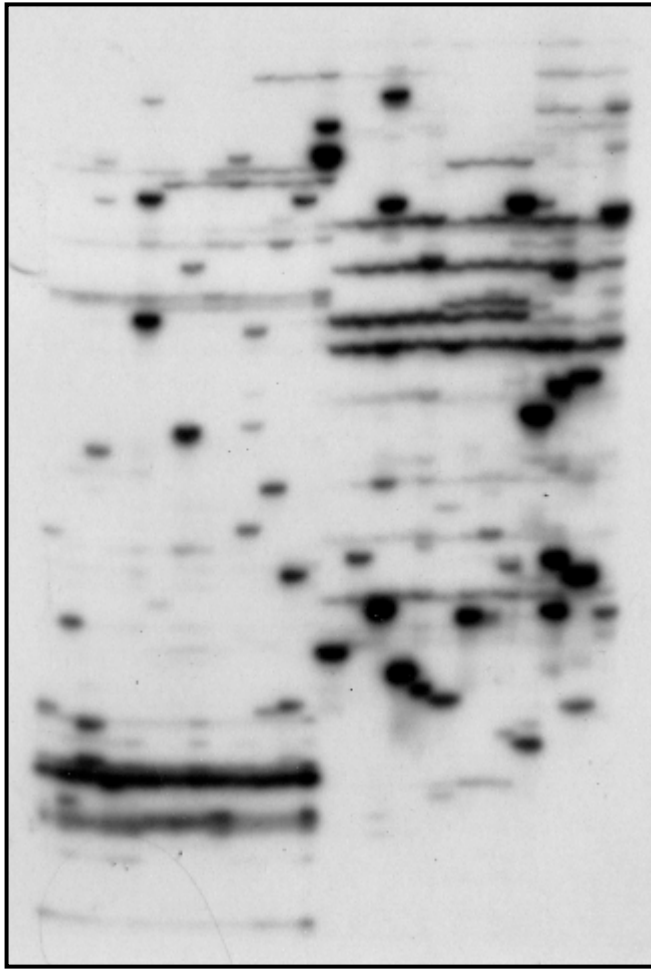
AFLP ancorato

P. NERO NEBB. CHARD.



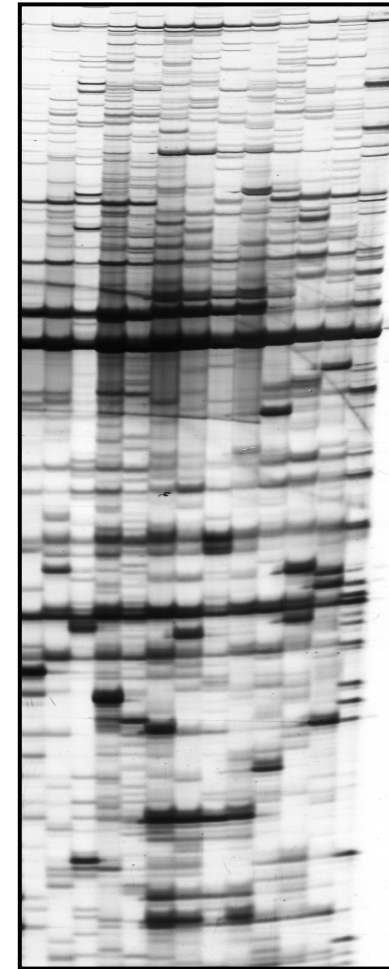
Ibridazione Southern

P. NERO NEBB. CHARD. P. NERO NEBB. CHARD.

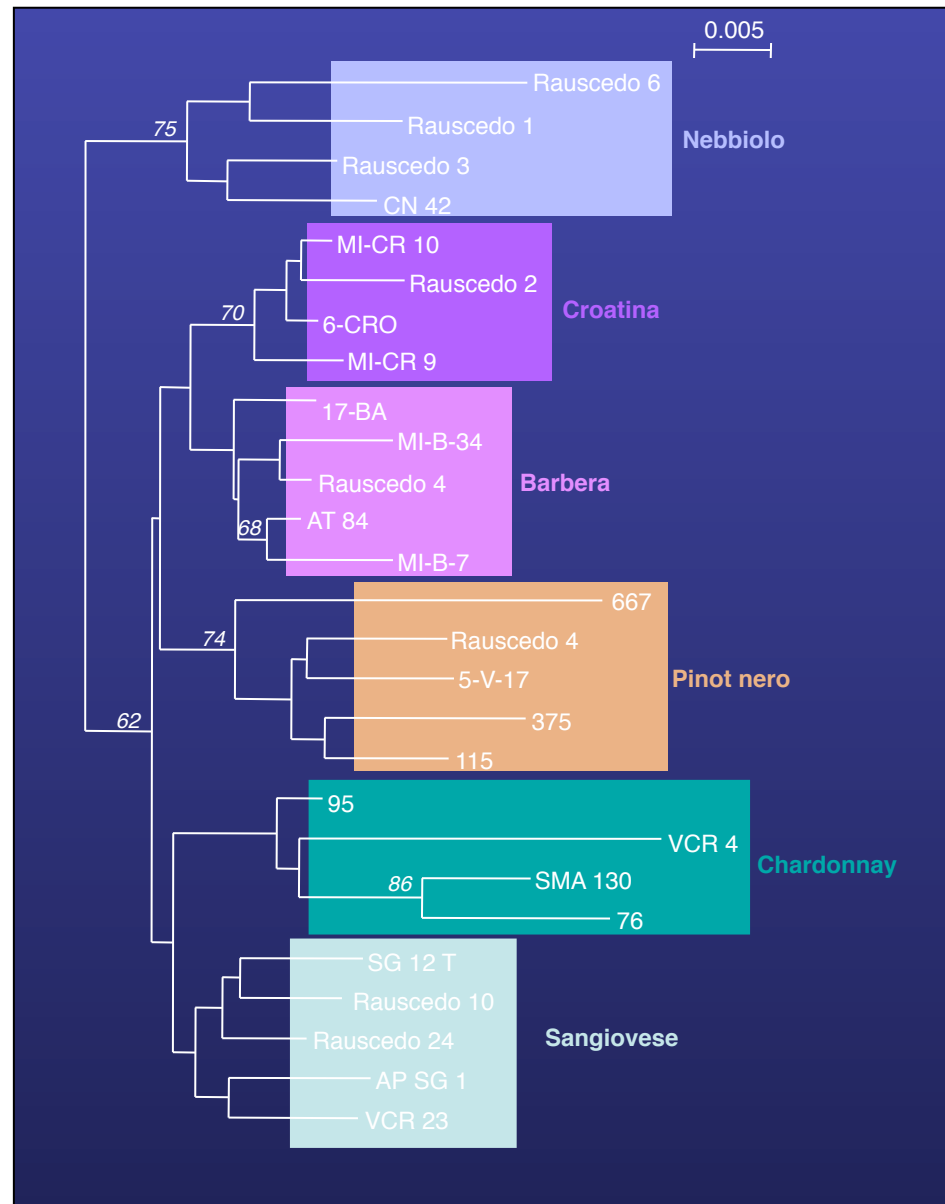


AFLP ancorato

P. NERO NEBB. CHARD.



Marcatori molecolari per il riconoscimento clonale



Marcatori molecolari per il riconoscimento clonale

Identificazione di SNP nelle regioni codificanti e fiancheggianti dei geni per la stilbene sintasi



Obiettivi

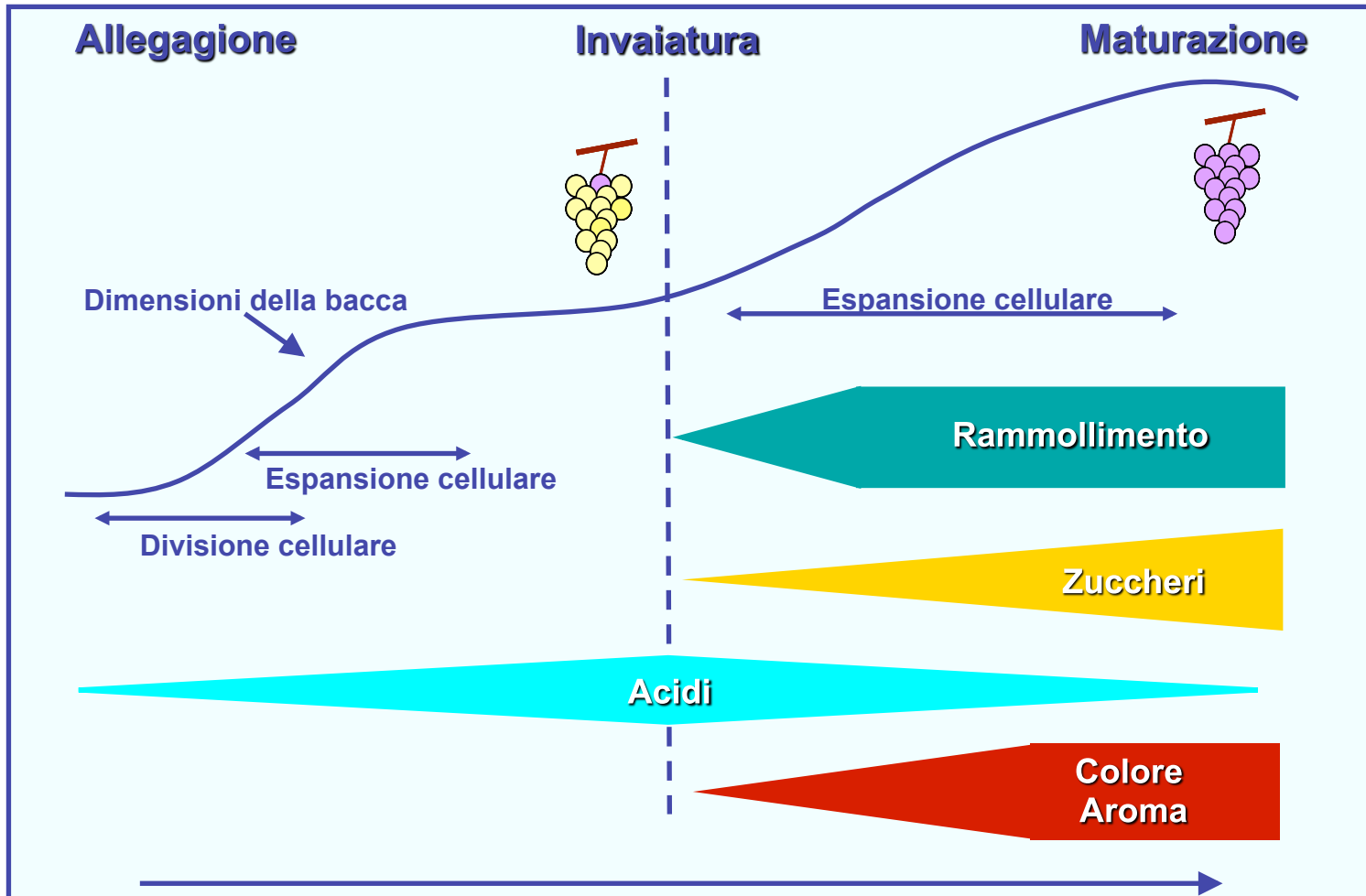
- Ottenere marcatori molecolari di nuova generazione per l'identificazione varietale e clonale di vite

- Ottenere informazioni sull'espressione genica su larga scala per determinare differenze inter- o intra-varietali nella bacca in maturazione

Argomenti trattati

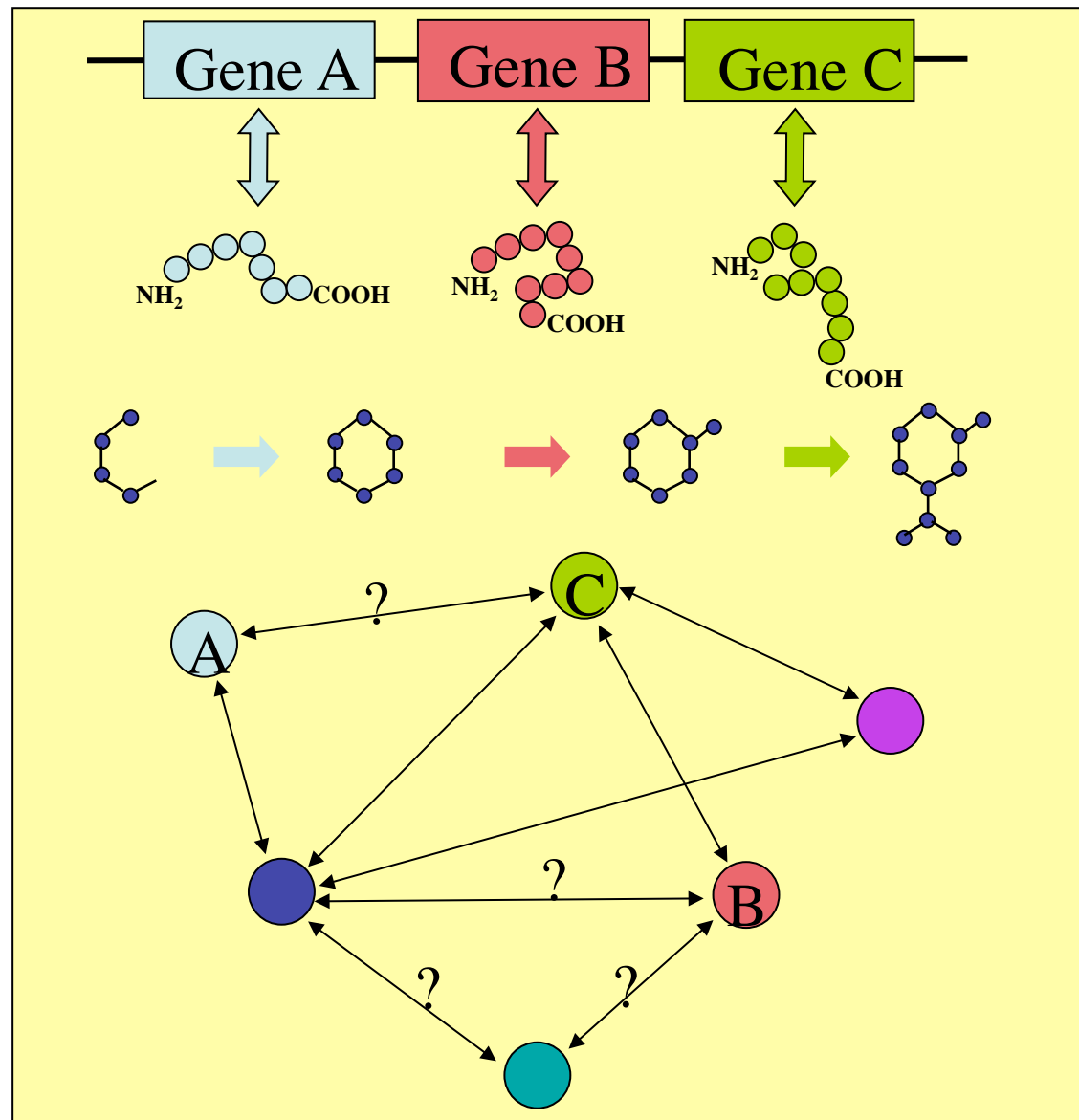
- Come si studia l'espressione di un gene. Il *Northern blot*:
 - Estrazione dell'RNA
 - Separazione elettroforetica
 - Trasferimento (blotting) su membrana
 - Ibridazione con sonda marcata (ad es. radioattivamente)
 - Simulazione di un esperimento
- Cosa succede quando si vogliono studiare migliaia di geni diversi?
- Il principio inverso del *Northern blot*: l'*array*
- Come si prepara un *Macroarray* (su filtro di nylon o nitrocellulosa)
- L'ibridazione con sonda radioattiva e l'autoradiografia
- L'evoluzione della tecnica del *macroarray*: *microarray* su vetrino da microscopio
- L'analisi e l'interpretazione dei risultati. L'uso di software dedicati per raggruppare i geni con profili di espressione simili (analisi *cluster*)
- Esempi di studio in vite (progetti sulla maturazione dell'uva in Oltrepo e sull'effetto dell'oscuramento dei grappoli)

La maturazione dell'uva

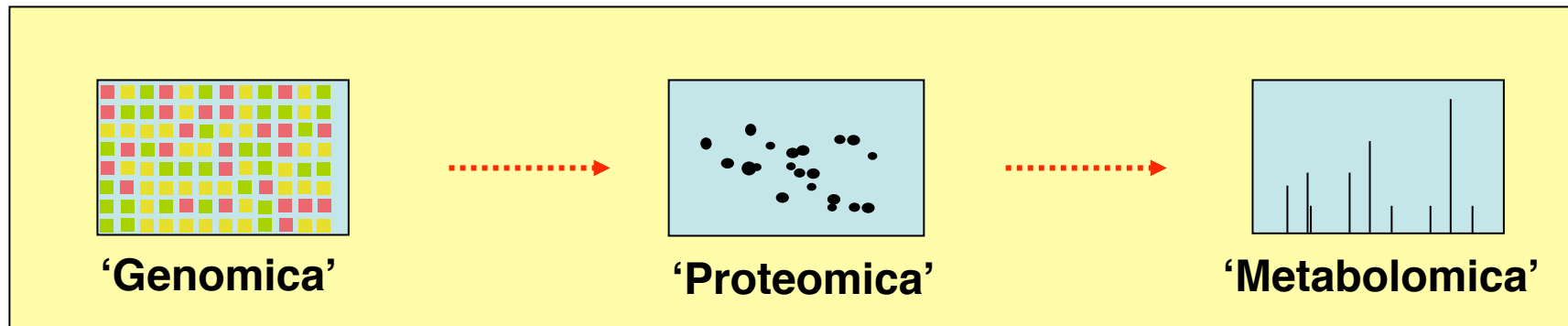


Tempo dalla Fioritura

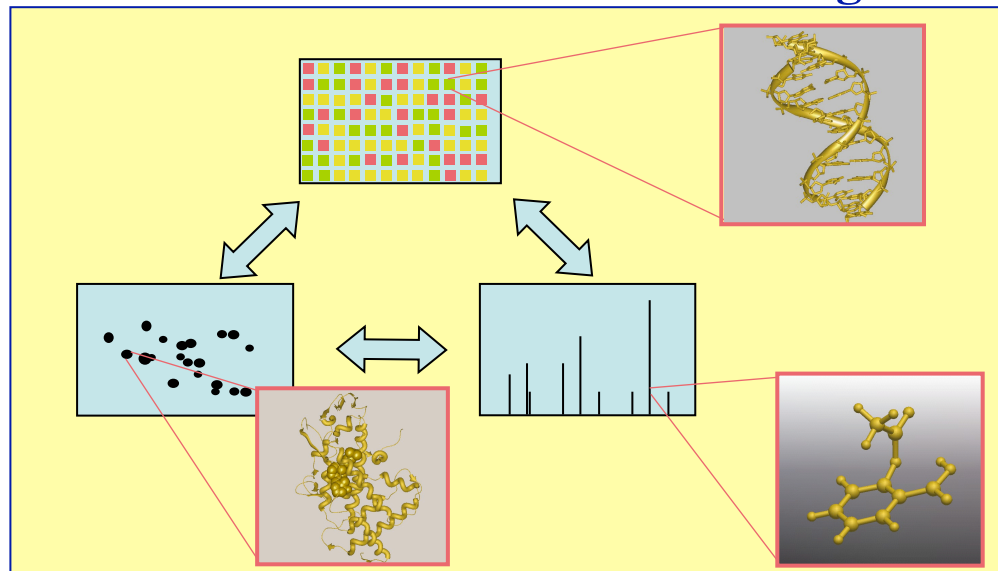
Per sintetizzare un qualunque metabolita vengono attivati molti geni



Obiettivo generale del progetto è quello di individuare marcatori molecolari da impiegare per l'identificazione varietale e clonale dei vitigni e per la valutazione delle caratteristiche qualitative dell'uva.

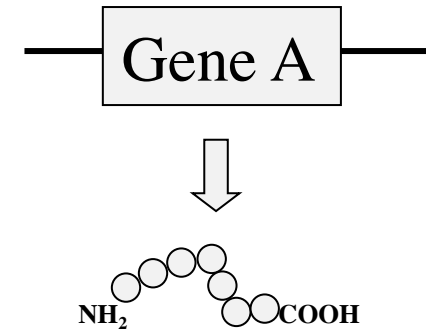
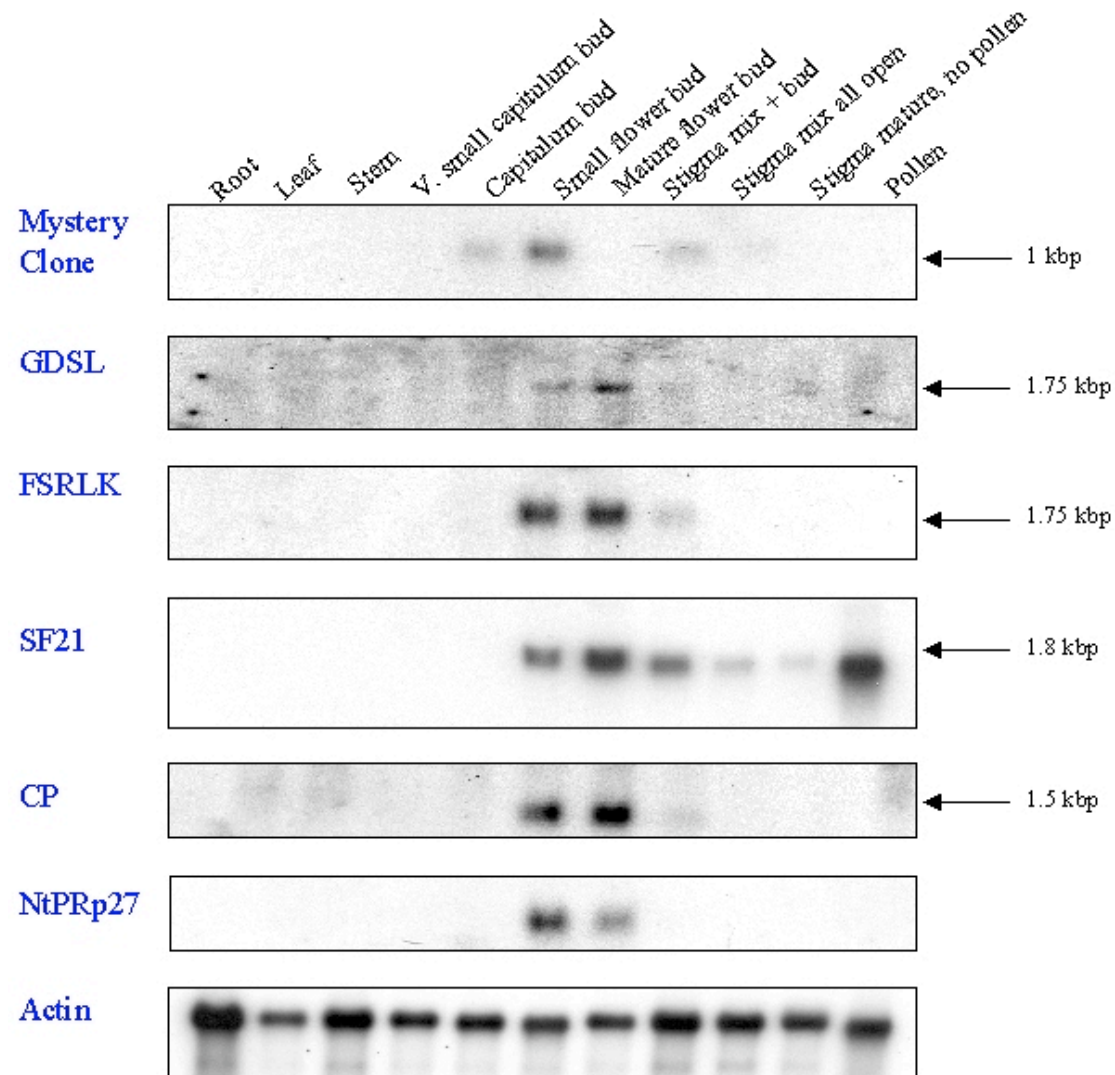


Identificazione di molecole bersaglio



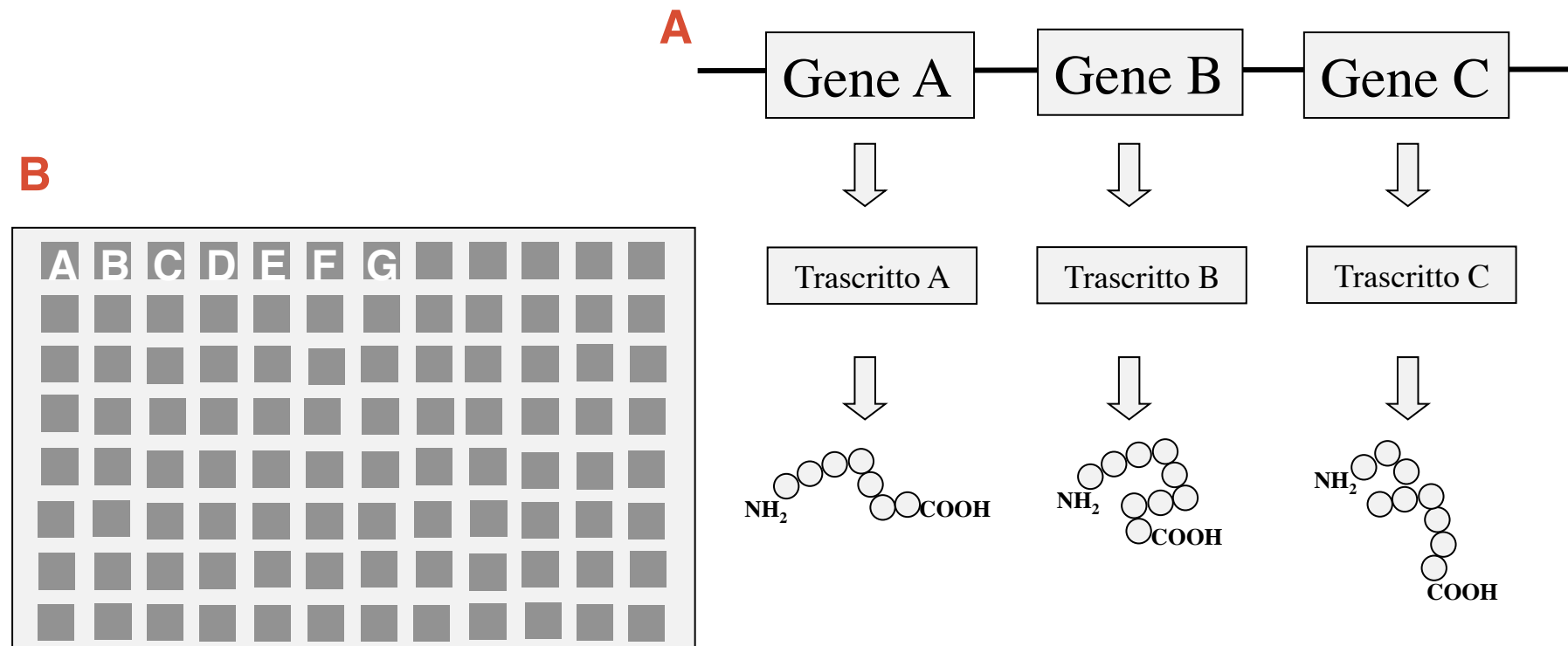
Creazione di un sistema diagnostico qualitativo e quantitativo utile per la certificazione del prodotto di filiera

La tecnica *Northern blot*



<http://www.bio.bris.ac.uk/research/plantrepro/images/northerns.jpg>

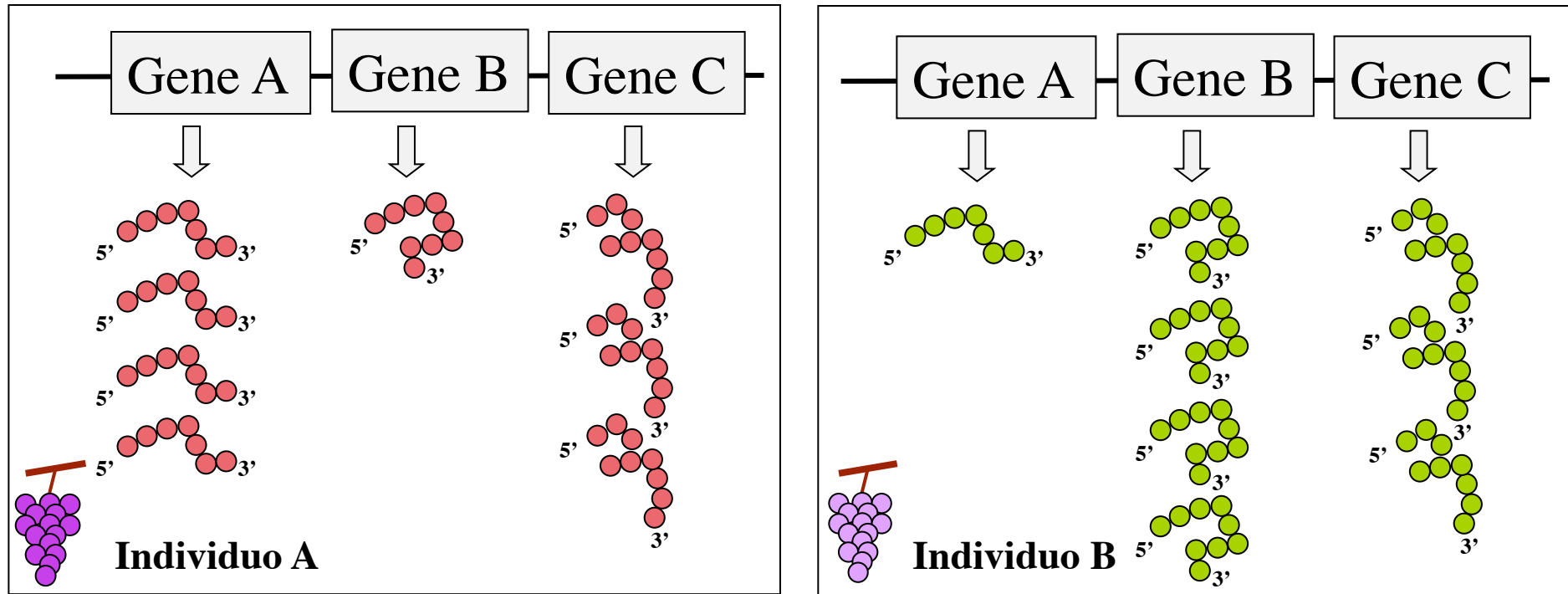
Il concetto di *microarray*



E' noto che migliaia di geni e relativi prodotti (RNA e proteine, **A**) in un dato organismo funzionano in modo correlato e altamente controllato.

Tuttavia i metodi tradizionali della biologia molecolare lavorano considerando "un gene alla volta", il che significa una ridotta possibilità di inquadrare l'insieme completo dei geni. Negli ultimi anni una nuova tecnologia, nota come "DNA microarray", è stata ideata per rispondere a questa esigenza, attirando incredibilmente l'attenzione dei ricercatori. Tale tecnologia permette di studiare il genoma intero utilizzando "chip" di vetro o silicio delle dimensioni di un'unghia su cui sono depositati i filamenti di DNA relativi a migliaia di geni (**B**).

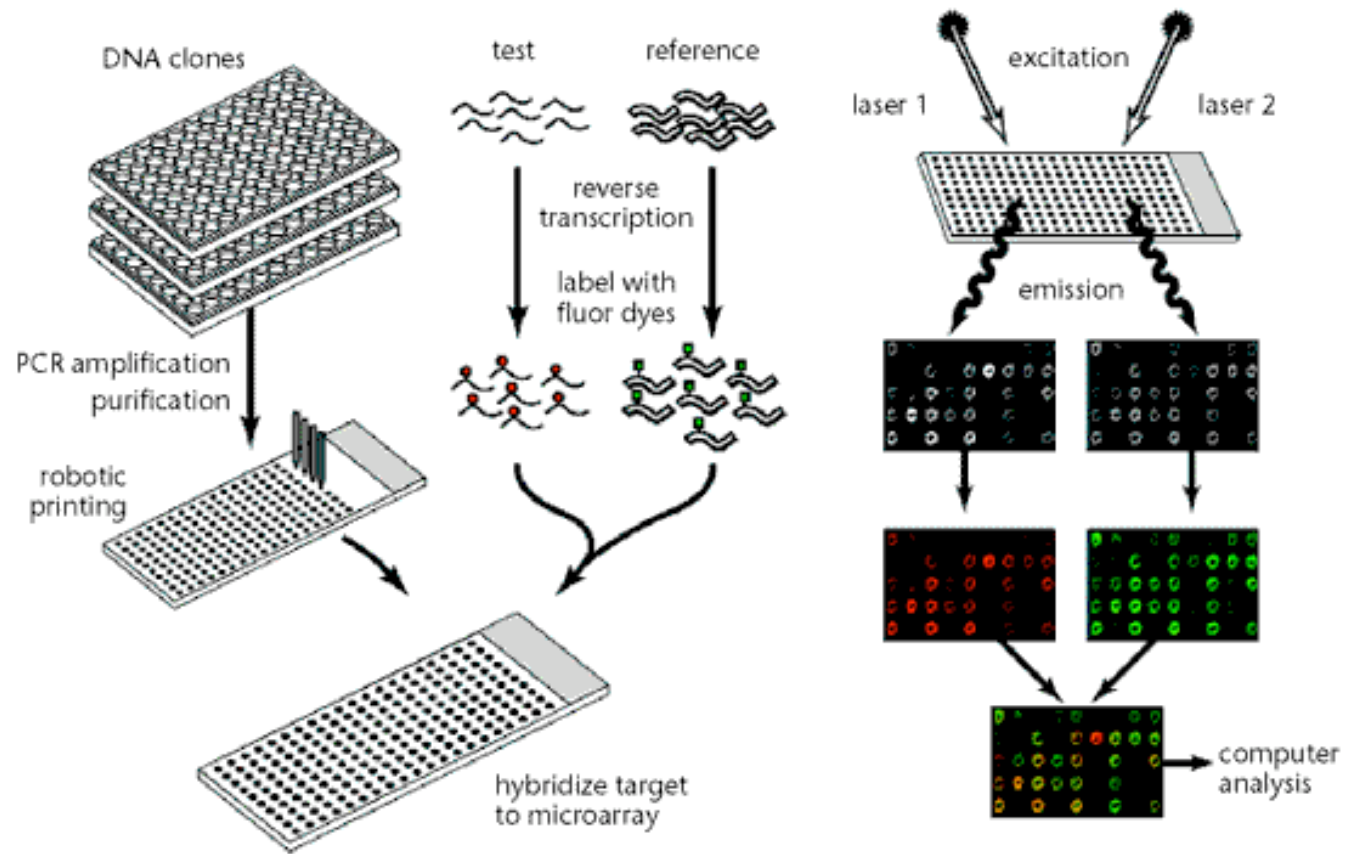
Il concetto di *microarray*



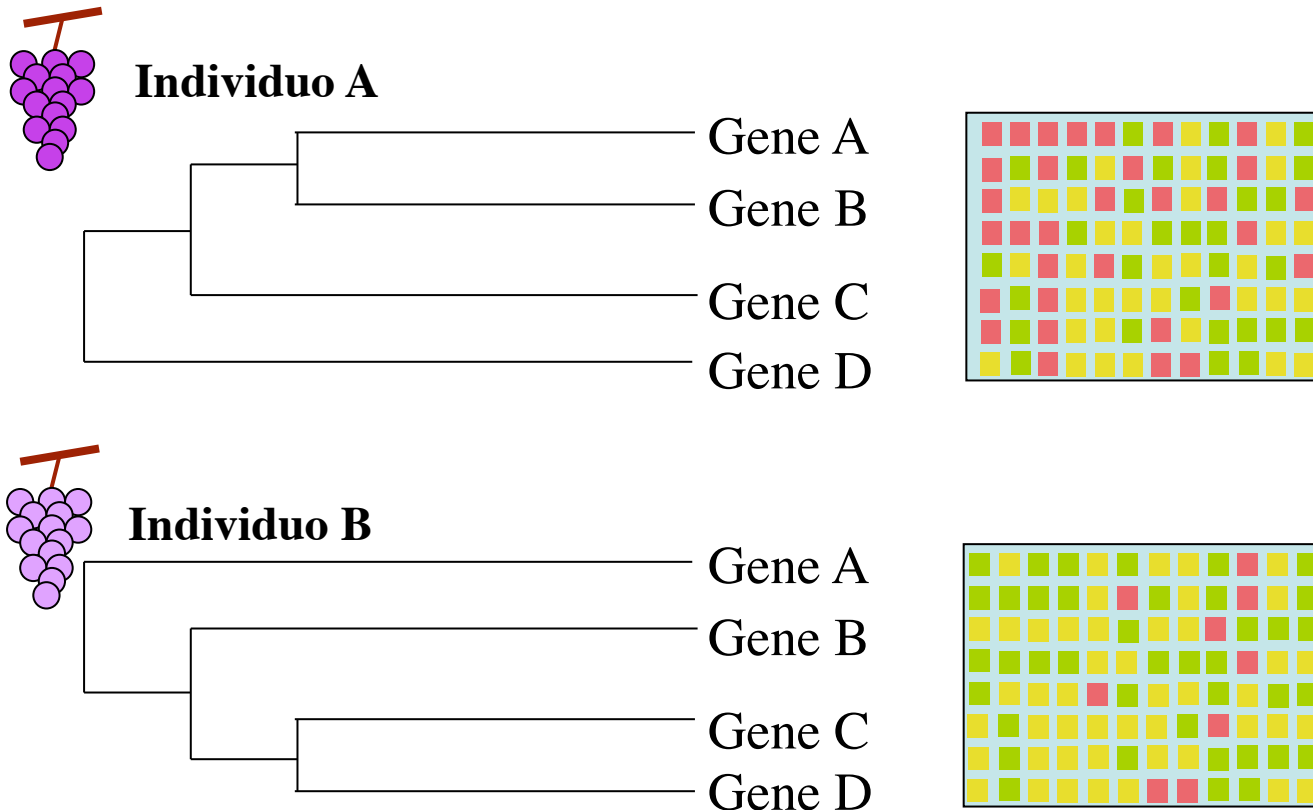
Fisicamente, i *microarray* (anche noti come “gene chip”, “DNA array” o “gene array”) sono dei chip (spesso costituiti da un supporto di vetro) con migliaia di microscopici campioni di acidi nucleici (i quadrati nella figura 1B). Ciascuno spot rappresenta un gene e tutti i geni di un genoma intero possono essere rappresentati su un unico chip. Ciascuno spot è in grado di legare DNA o RNA marcato con un colorante fluorescente proveniente da un determinato campione.

I livelli di colore di ciascuno spot possono essere analizzati otticamente e usati per stabilire i livelli di espressione relativa di ciascun gene.

Il principio costruttivo dei *microarray*



Gruppi di geni con profili di espressione simili

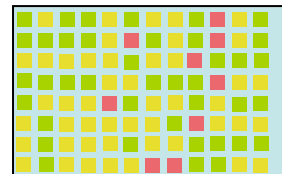
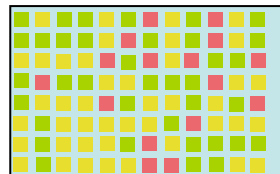
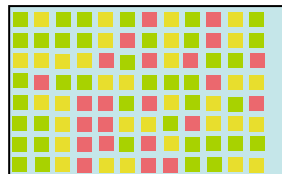
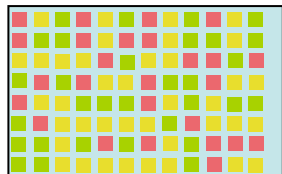
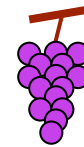
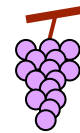


Individui diversi sono caratterizzati da profili globali di espressione diversi. L'analisi statistica permette di confrontare livelli di espressione di migliaia di geni contemporaneamente e di generare delle "fotografie" dello stato genetico e metabolico di un individuo.

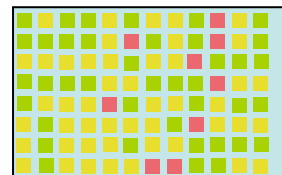
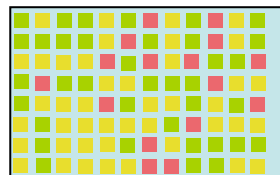
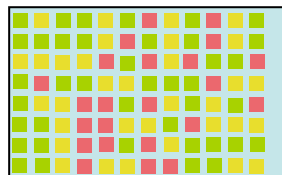
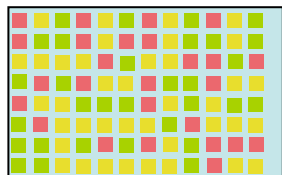
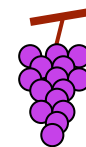
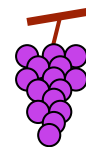
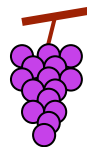
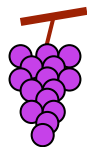
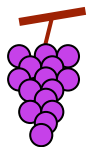
In questo modo è possibile anche studiare gruppi di geni specifici di determinati metabolismi (ad esempio quello per la sintesi degli antociani o dei terpeni).

Analisi dei profili di espressione genica

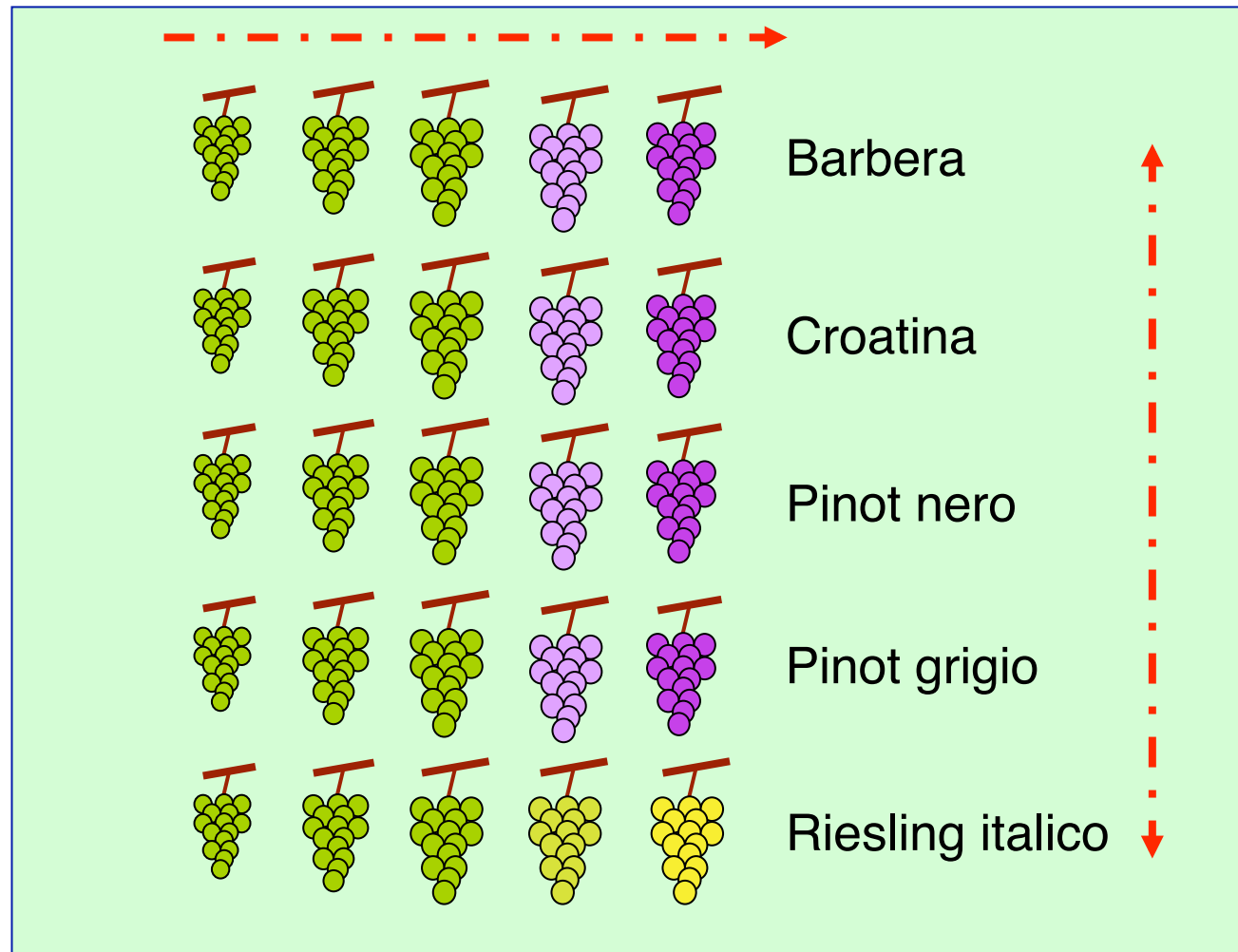
Variazione dell'espressione genica di una pianta in stadi diversi



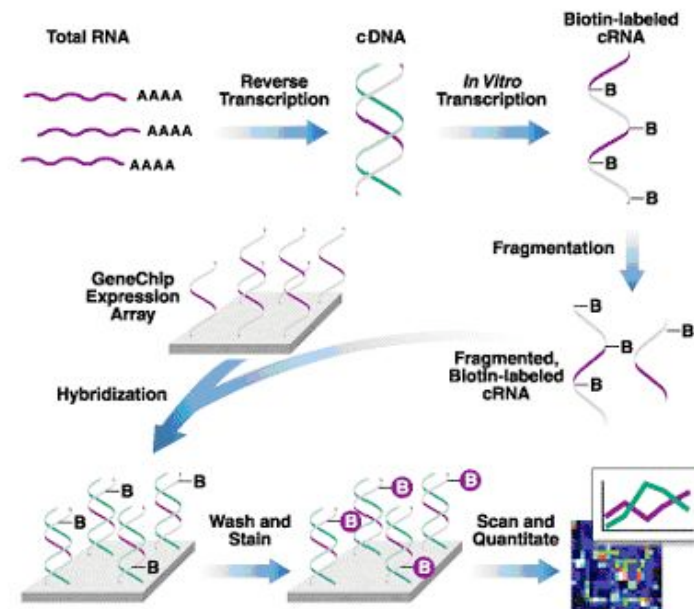
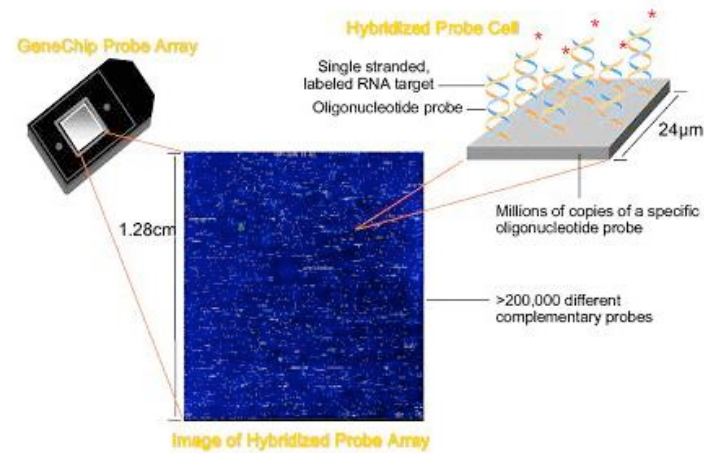
Variazione dell'espressione genica tra piante diverse (varietà o cloni)



Si sono analizzati campioni di bacche prelevate da piante delle cinque varietà a diversi stadi della maturazione dall'invasatura alla maturazione completa



La tecnologia GeneChip™ di Affymetrix



Vitigni scelti per la ricerca

Pinot grigio



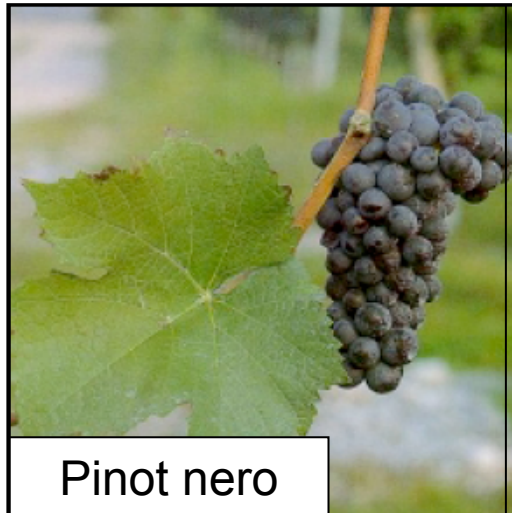
Riesling italico



Croatina



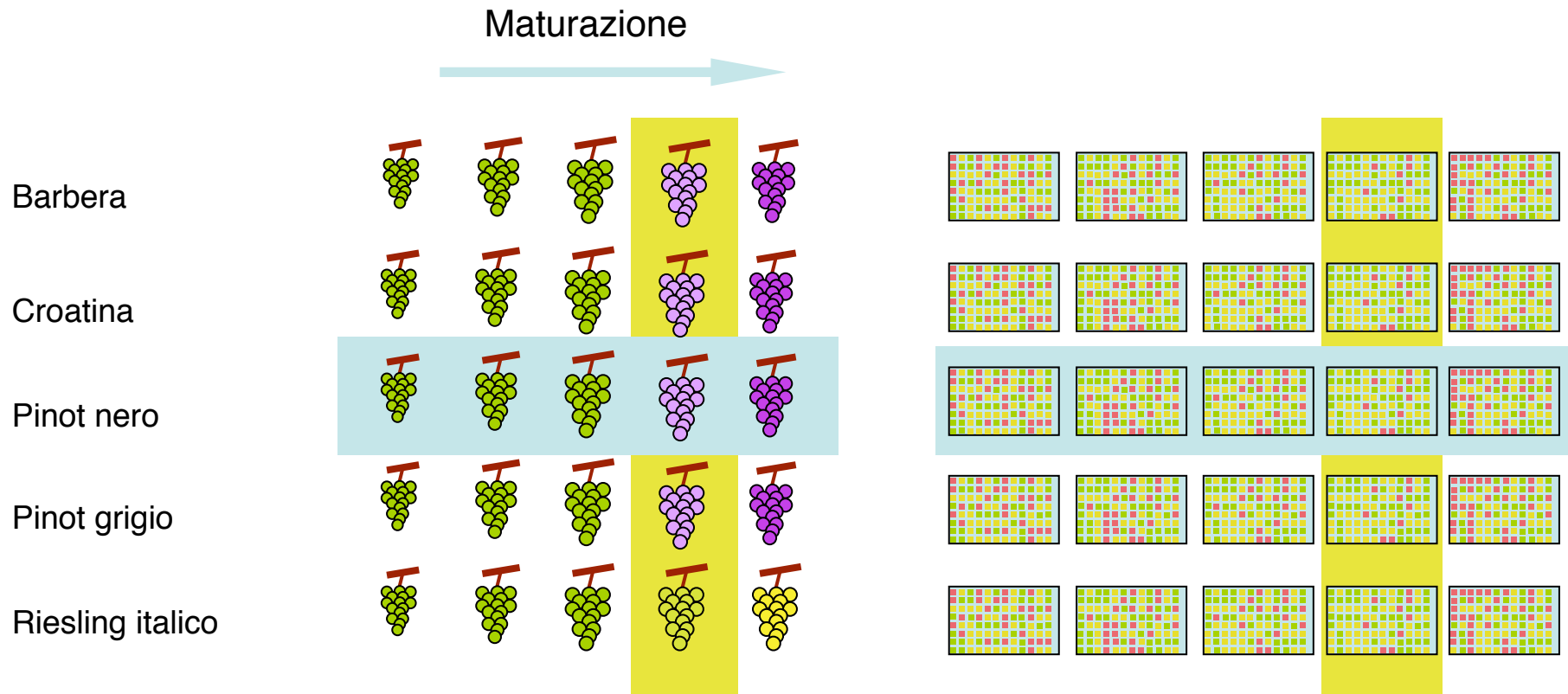
Pinot nero



Barbera



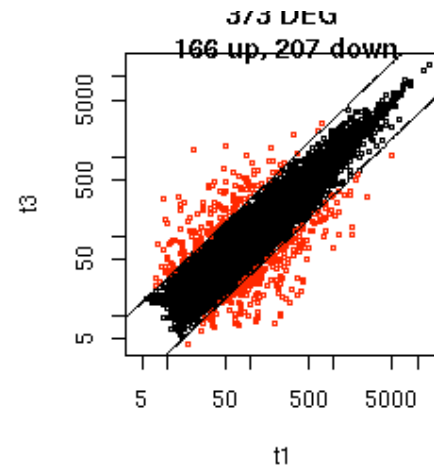
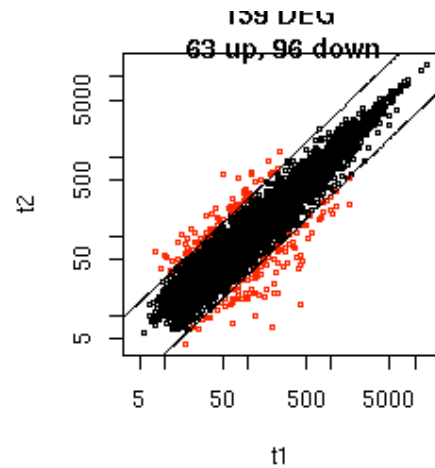
PIDICEUVE: il piano sperimentale per l'espressione genica



Quali geni sono importanti per la maturazione?

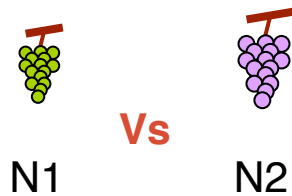
Quali geni differenziano varietà diverse?

I geni differenzialmente espressi (DEG)



Pinot nero

Considerati tutti i geni con differenze di espressione di **almeno** 3 volte (up o down)

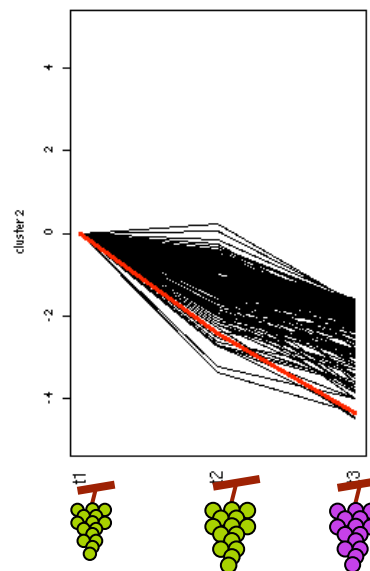
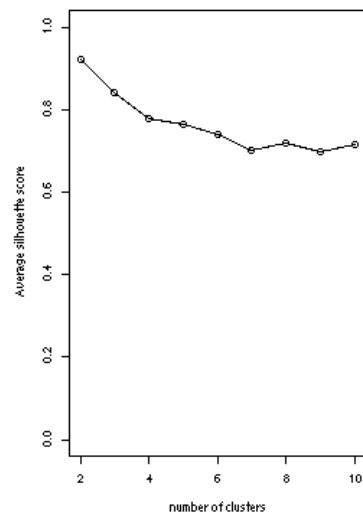


$63 + 96 = 159$ geni differenzialmente espressi

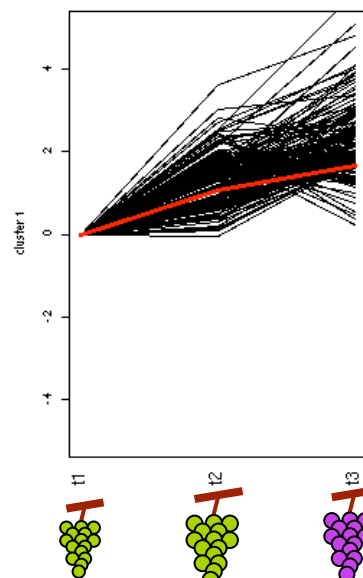
$166 + 207 = 373$ geni differenzialmente espressi

Gruppi di geni con profili di espressione simili

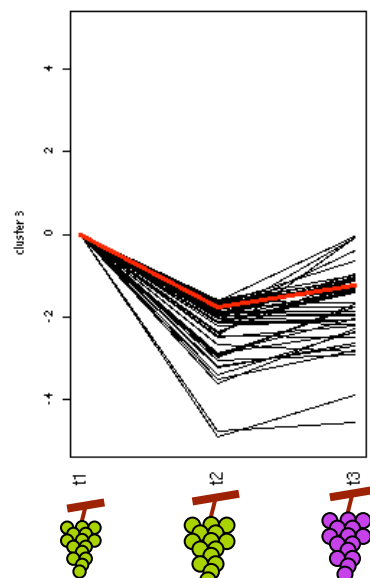
Pinot nero



Gruppo 2
182 geni

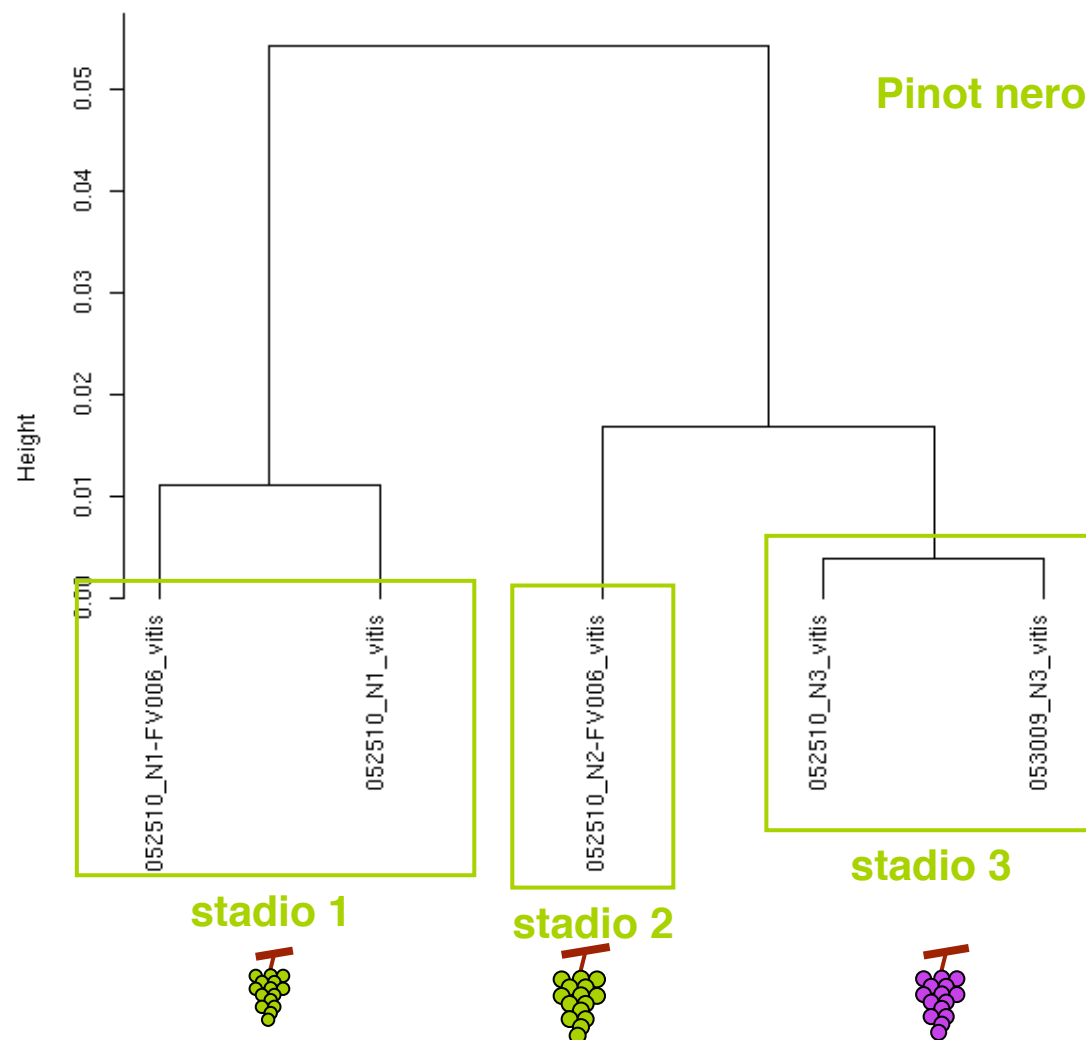


Gruppo 1
190 geni

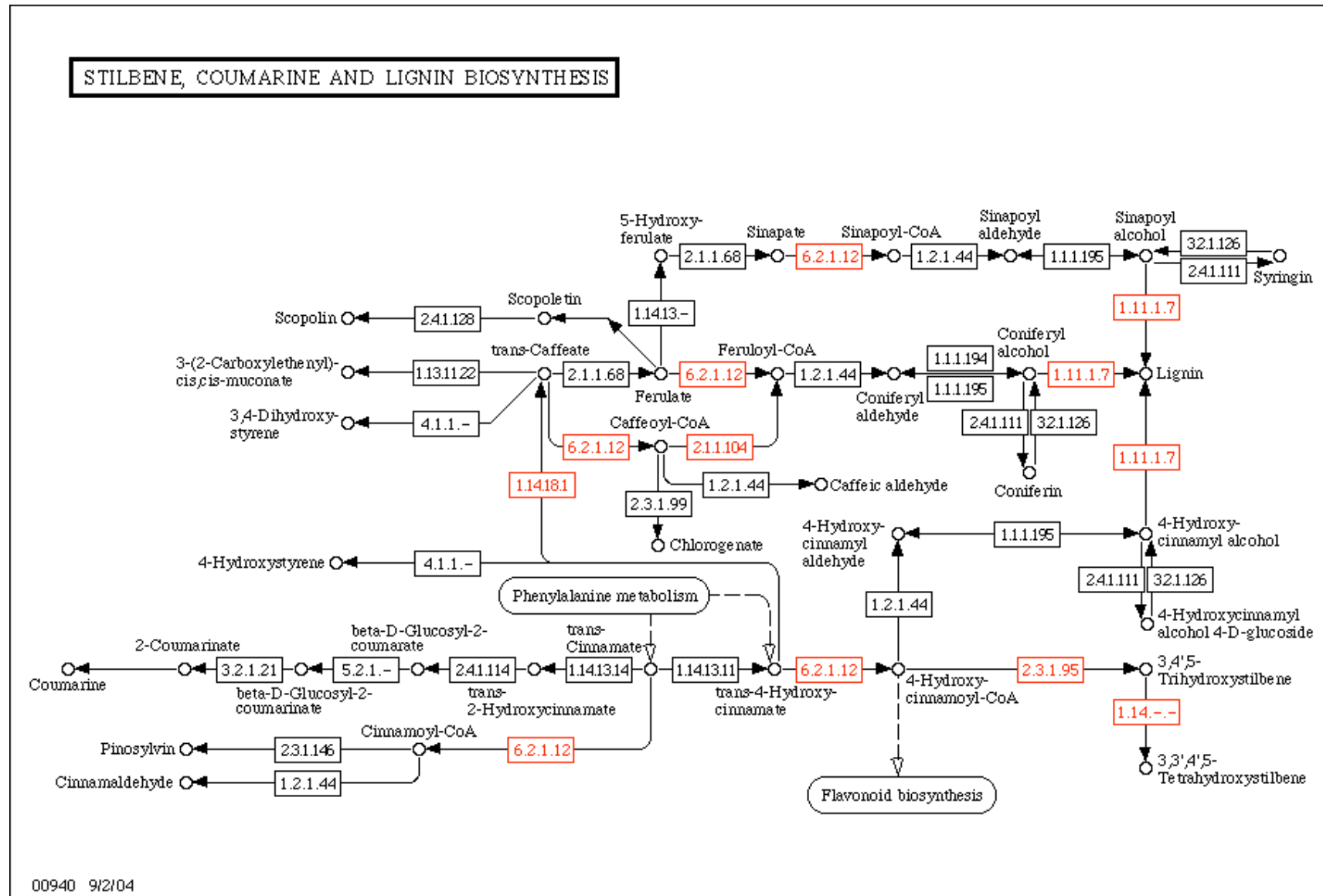


Gruppo 3
52 geni

La riproducibilità dei dati



Esempio di metabolismi di interesse

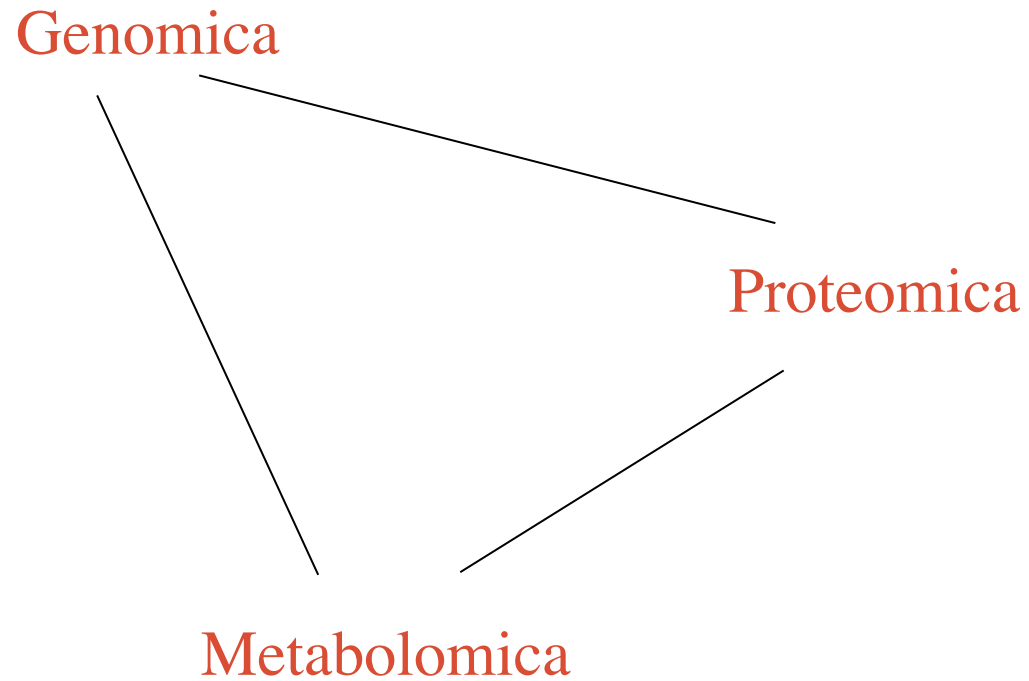


Il problema dell'annotazione dei geni

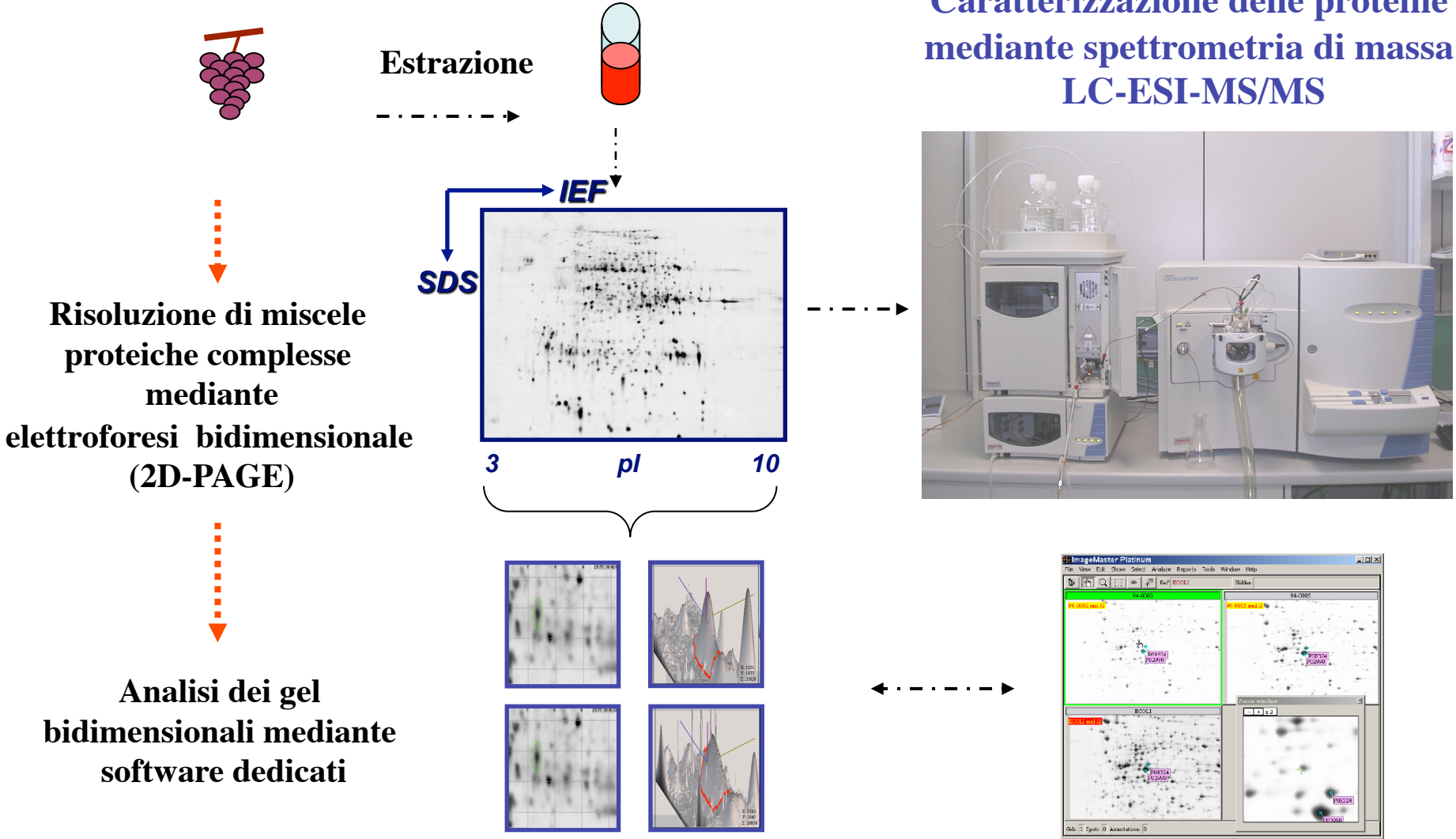
Gene	Annotazione
1606368_s_at	Cultivar Riesling actin
1606427_at	Transcribed locus, weakly similar to NP_174029.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]
? → 1606428_at	---
1606429_at	Transcribed locus, weakly similar to NP_201042.2 enzyme inhibitor/ pectinesterase/ pectineste
1606430_at	Transcribed locus, moderately similar to NP_173115.1 transcription cofactor/ zinc ion binding [A
1606431_at	Transcribed locus, weakly similar to XP_472308.1 OSJNBa0055C08.14 [Oryza sativa (japonica
1606432_at	Transcribed locus, moderately similar to NP_568066.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]
1606433_at	Transcribed locus
1606434_at	Transcribed locus, strongly similar to NP_199088.1 glucose-6-phosphate isomerase [Arabidopsi
? → 1606435_at	---
1606436_s_at	Transcribed locus, moderately similar to NP_194534.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]
1606437_at	Transcribed locus, strongly similar to XP_477993.1 putative DNA-directed RNA polymerase Iia [
1606438_at	Transcribed locus, weakly similar to NP_850013.1 ubiquitin-protein ligase/ zinc ion binding [Ara
1606439_s_at	Transcribed locus, weakly similar to NP_197917.1 EBF2 (EIN3-BINDING F BOX PROTEIN 2) [Ar
? → 1606440_at	Transcribed locus
? → 1606441_at	Transcribed locus
1606442_at	Transcribed locus, moderately similar to NP_851228.1 ADF4 (ACTIN DEPOLYMERIZING FACTOR
? → 1606443_at	Transcribed locus
1606444_at	Transcribed locus, moderately similar to NP_187982.1 ATP binding / kinase/ protein kinase/ pr
1606445_a_at	Transcribed locus, moderately similar to NP_192237.1 PETC (PHOTOSYNTHETIC ELECTRON TR
? → 1606446_at	Transcribed locus
? → 1606447_at	Transcribed locus
1606448_at	Transcribed locus, moderately similar to NP_567180.1 unknown protein [Arabidopsis thaliana]
1606449_at	Transcribed locus, moderately similar to XP_476952.1 putative 1-deoxyxylulose 5-phosphate s
? → 1606450_at	Transcribed locus
? → 1606451_at	---
? → 1606452_at	Transcribed locus
? → 1606453_x_at	---
.....	
.....	
.....	

...dal sito Affymetrix (giugno 2006)

L'interazione con le altre “omiche”

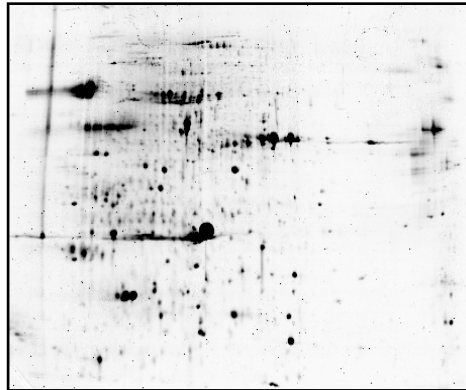


Schema di lavoro dell'analisi proteomica

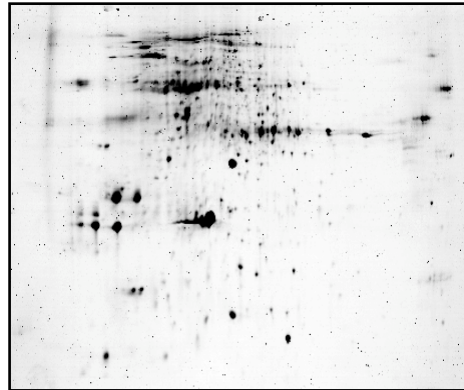
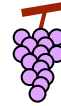


Variazioni della composizione proteica durante la maturazione del Barbera

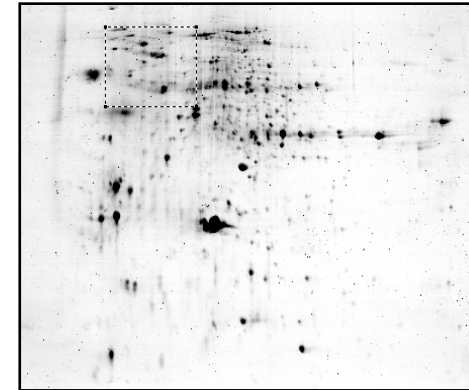
4-08-2005



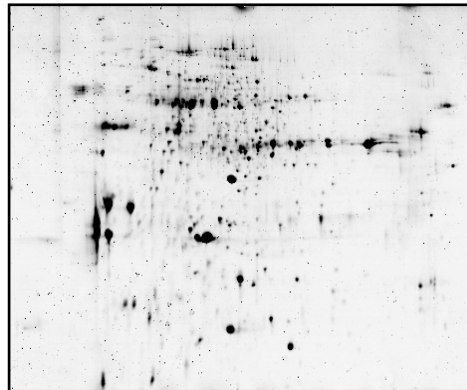
18-08-2005



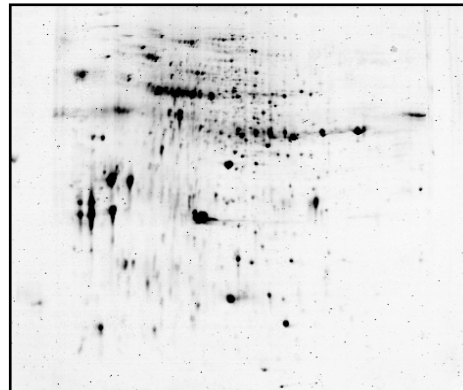
1-09-2005



15-09-2005

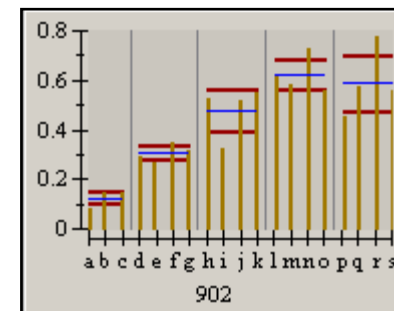
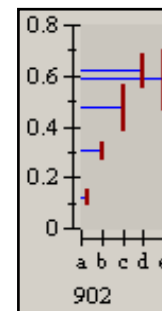
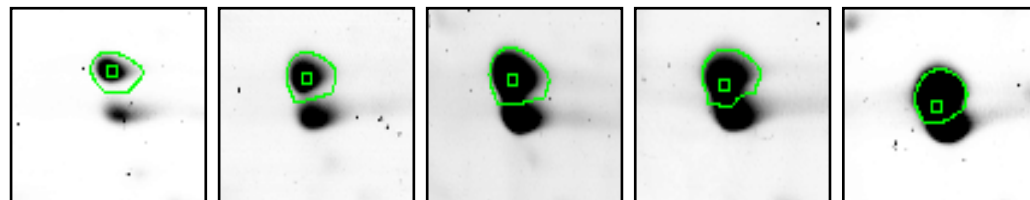
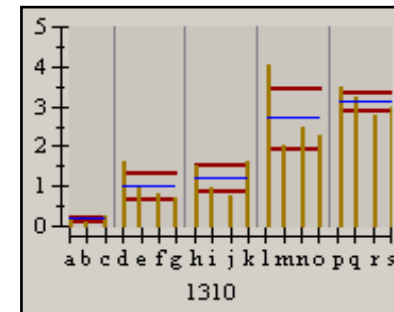
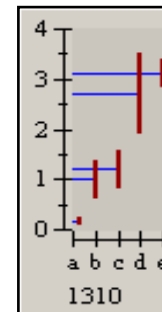
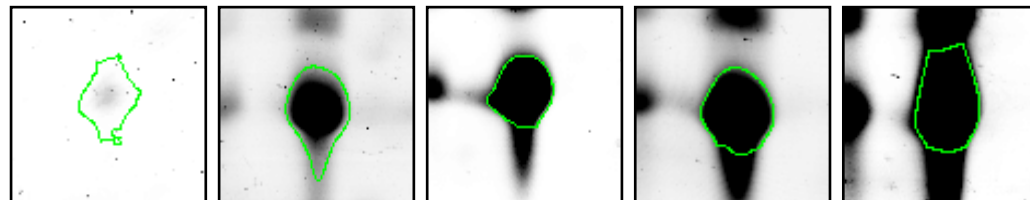
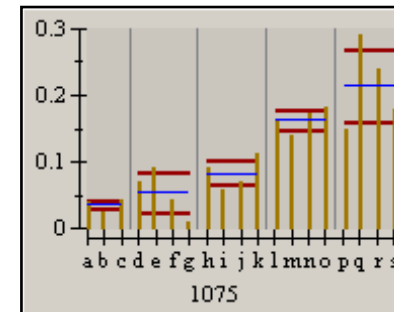
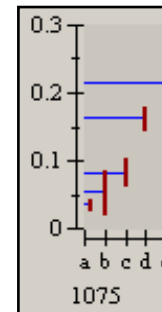
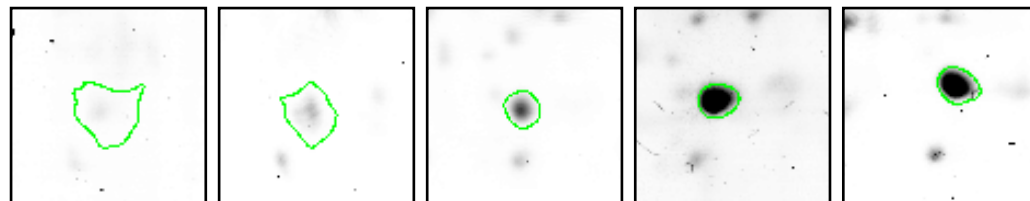
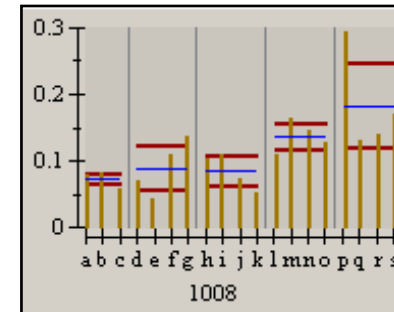
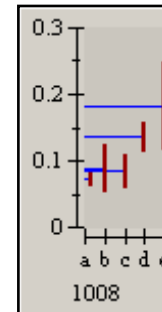
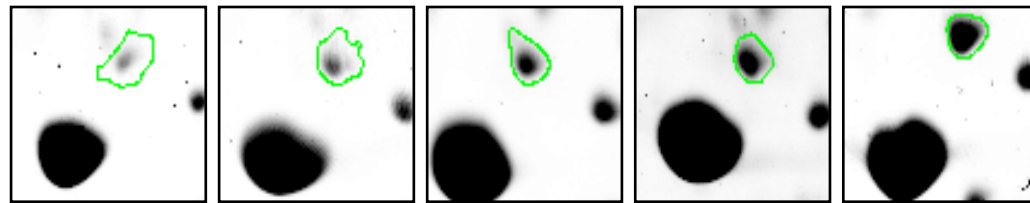


29-09-2005

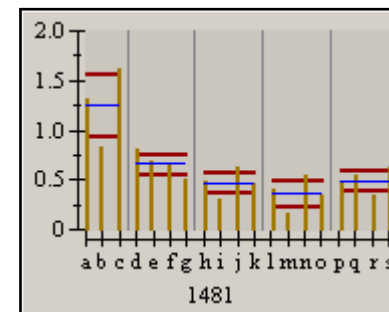
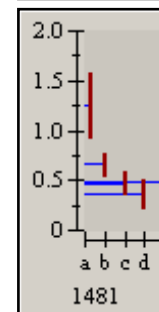
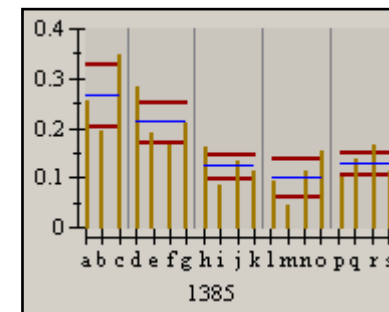
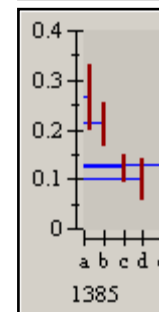
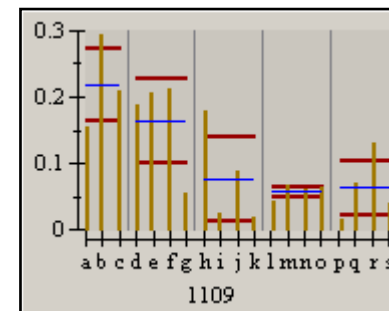
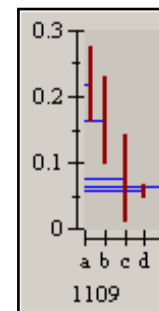
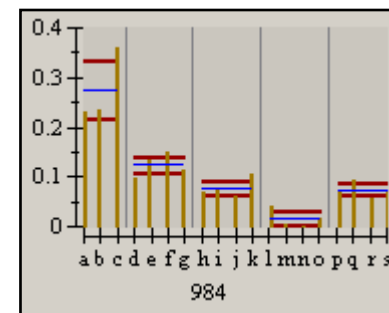
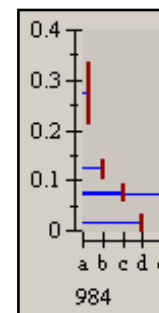
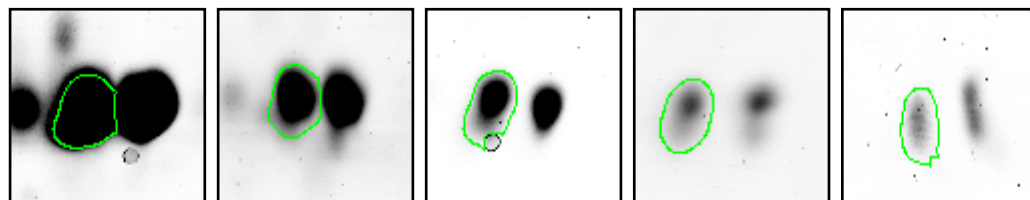
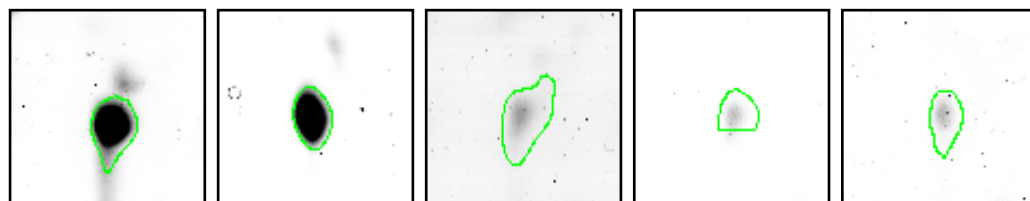
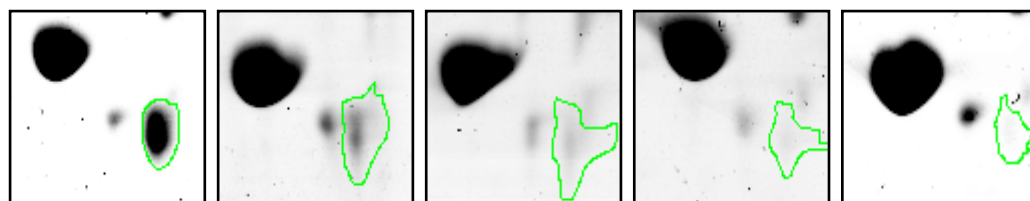


**Circa 100 proteine
risultano
differentemente
espresse durante la
maturazione**

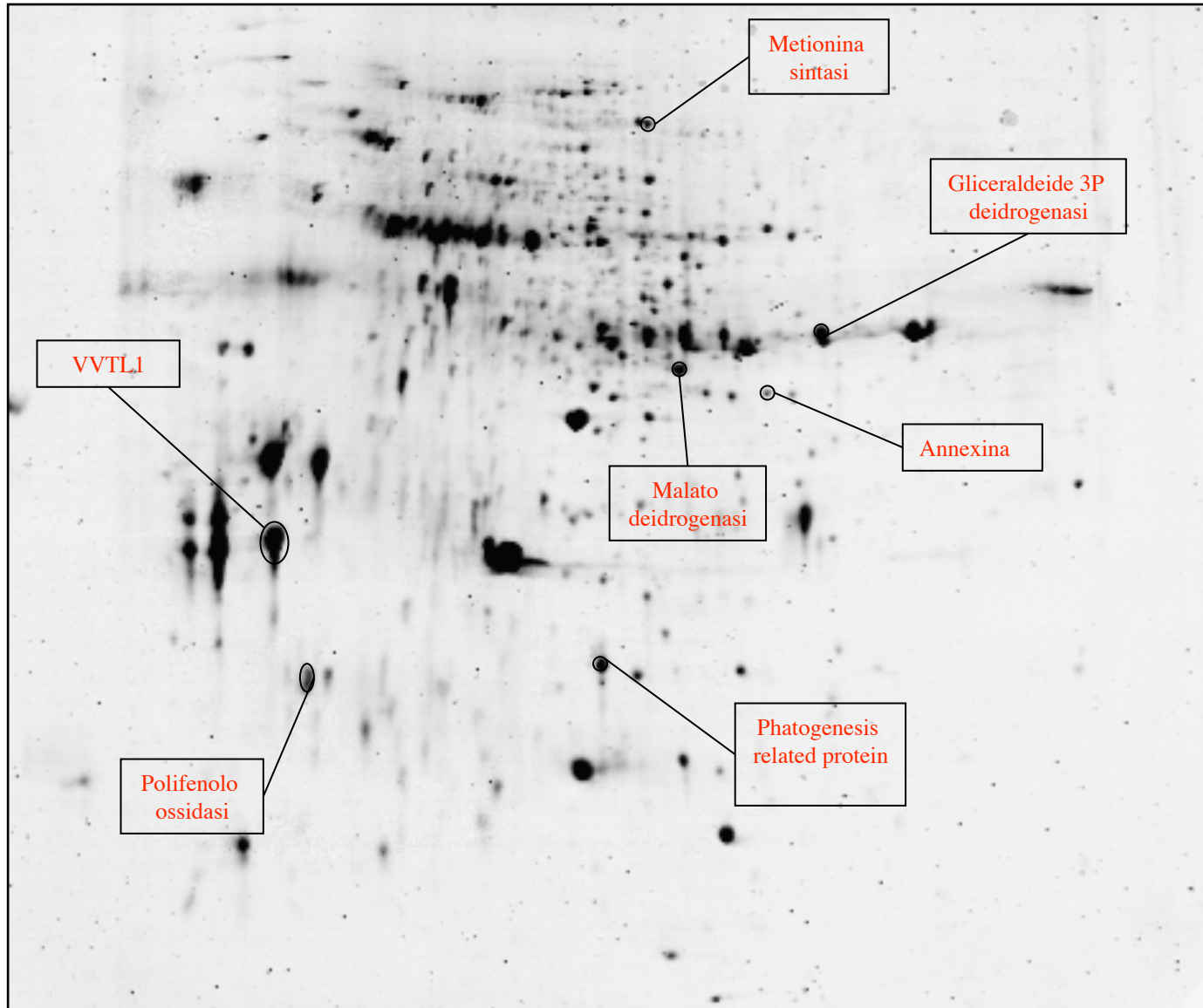
Esempio di proteine che aumentano



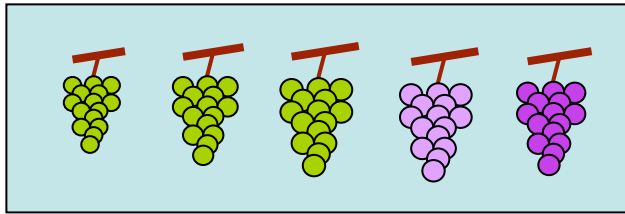
Esempio di proteine che diminuiscono



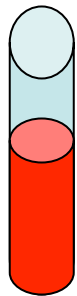
Le proteine vengono separate e caratterizzate



Studio del profilo d'espressione dei metaboliti



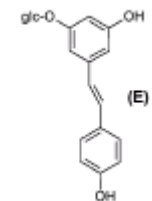
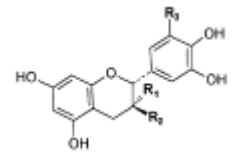
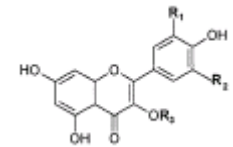
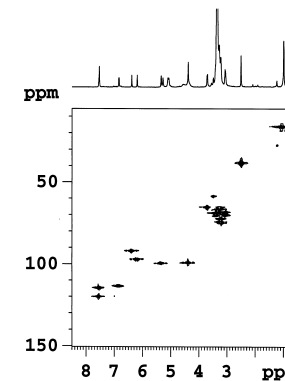
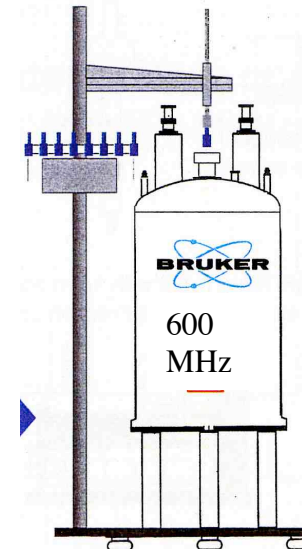
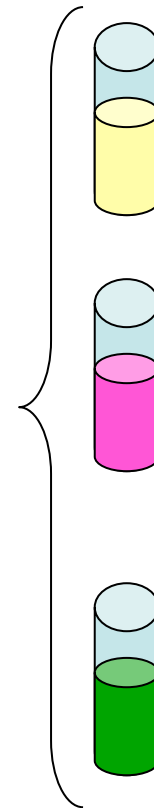
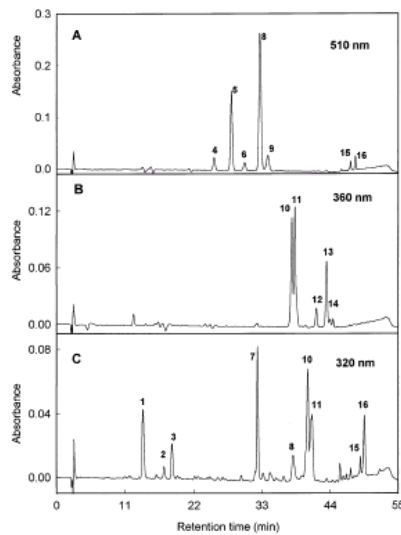
Estrazione



Purificazione



HPLC



Lezioni tenute nell'A.A. 2008-2009

- Programma delle lezioni tenute per gli studenti del terzo anno della laurea triennale in "Viticultura" del prof. Valenti

- MA 26-05-2009

- Cantina Sociale di Casteggio

- Dalle 15:00 alle 19:00

- ME 27-05-2009

- Aula C01 settore didattico nuovo di via Mangiagalli, Facoltà di Agraria

- Dalle 11:00 alle 13:00