

Malattie genetiche e progetto genoma: a che punto siamo arrivati?

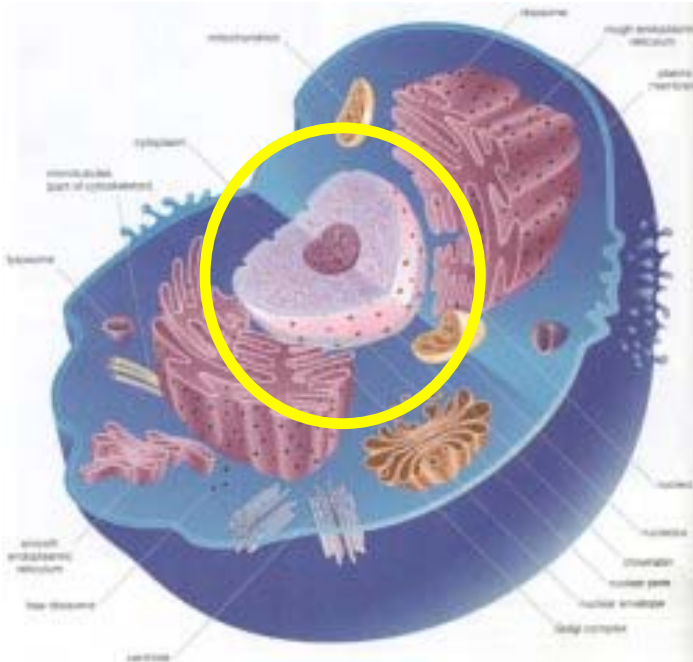
dott. Elena Belloni

Gruppo di ricerca IEO:
Meccanismi molecolari del cancro e dell'invecchiamento
(responsabile prof. Pier Giuseppe Pelicci)

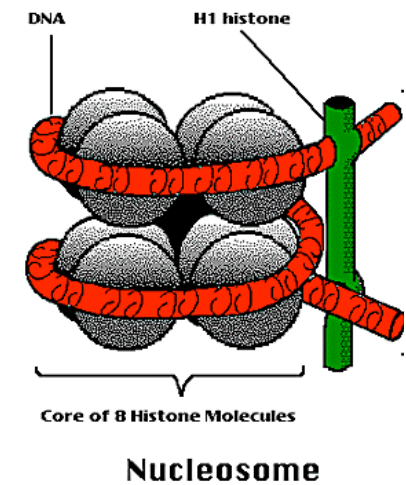
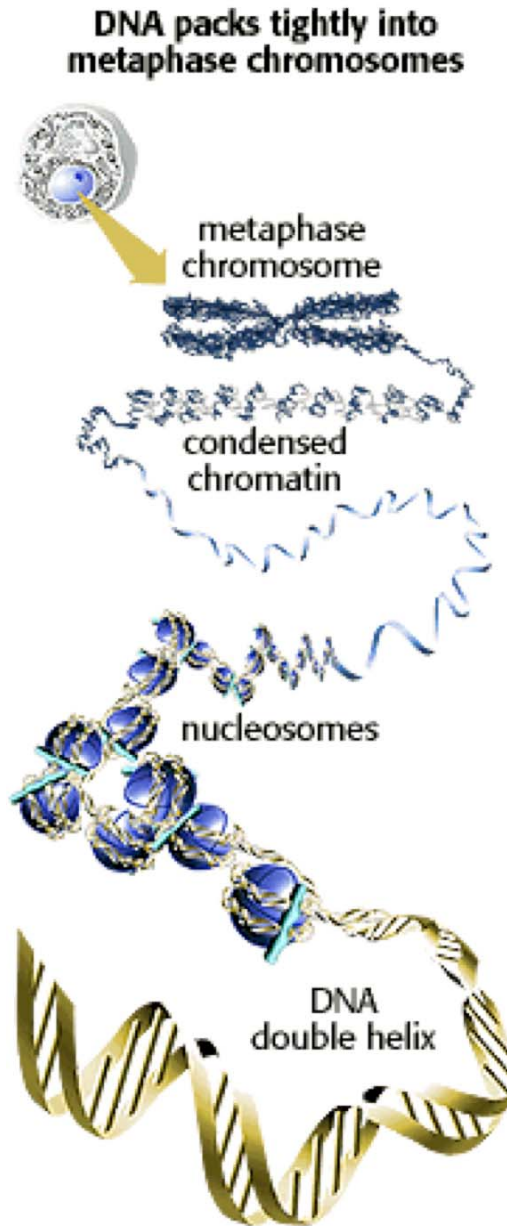
17 aprile 2007

1. DNA e CROMOSOMI

Cellule eucariote --> DNA --> nucleo



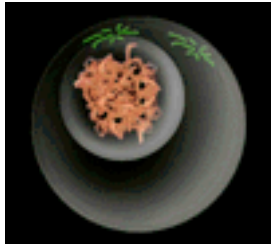
Molecola di DNA: 1.8m



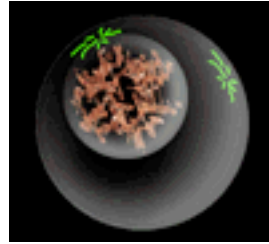
1. DNA e CROMOSOMI

Mitosi

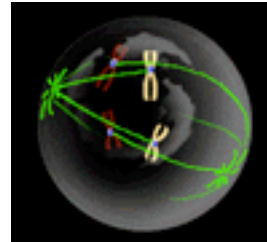
interfase



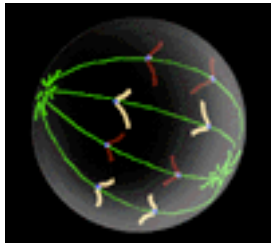
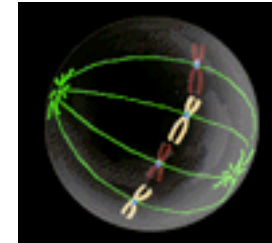
profase



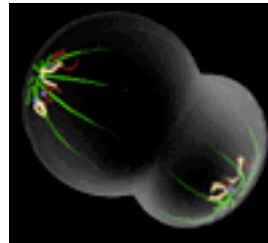
prometafase



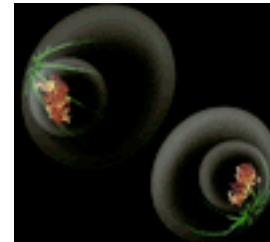
metafase



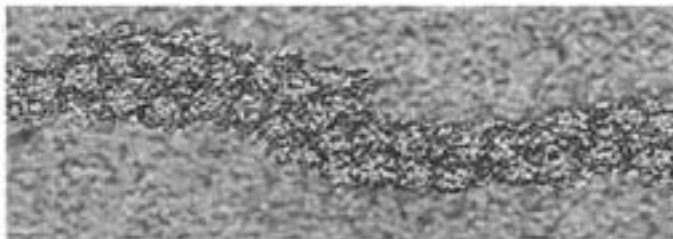
anafase



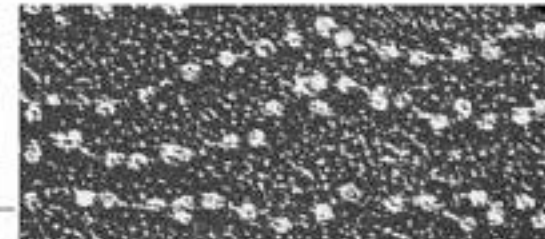
telofase



citochinesi

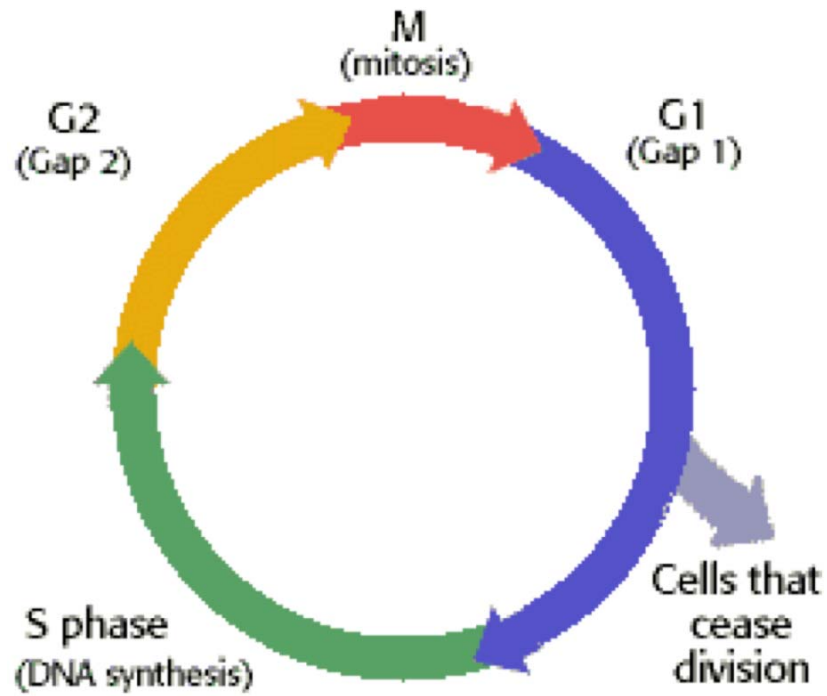


**Chromatin
fibers**



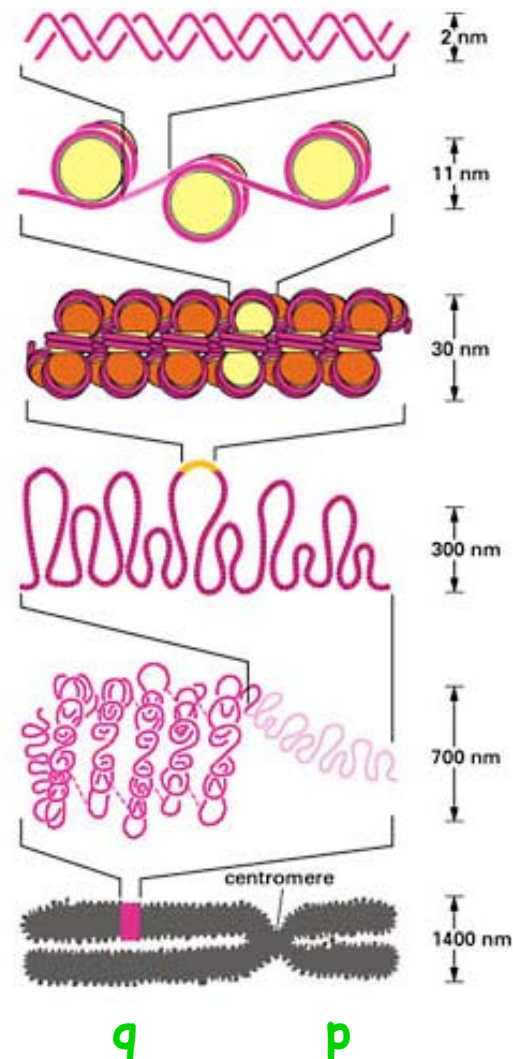
1. DNA e CROMOSOMI

Ciclo cellulare

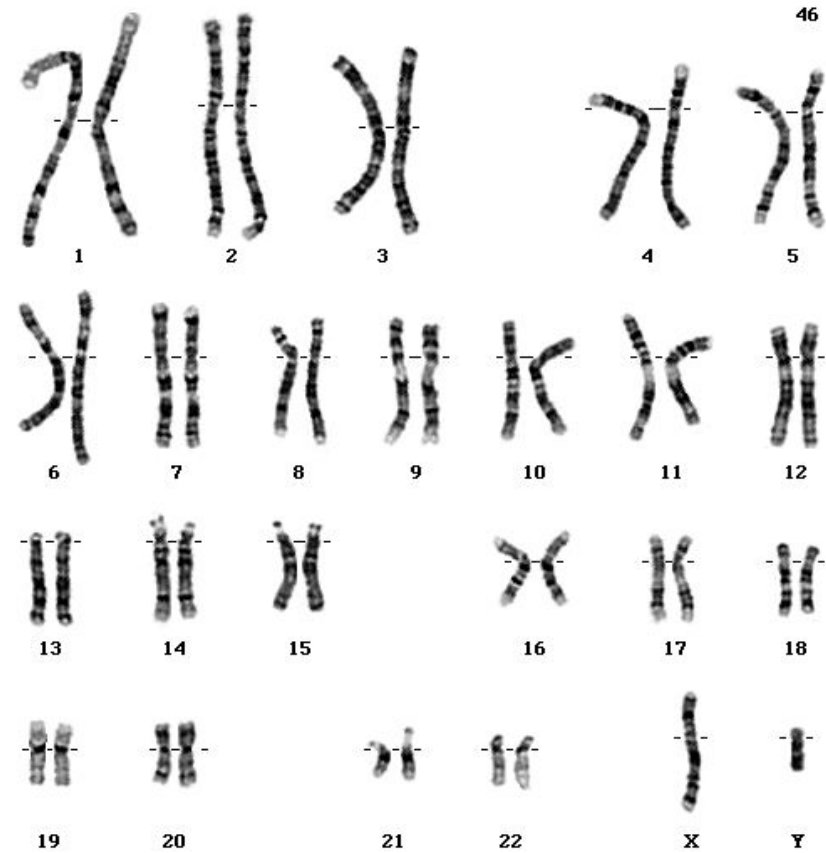


1. DNA e CROMOSOMI

All'interno del nucleo la molecola di DNA si condensa → cromosomi



1. DNA e CROMOSOMI



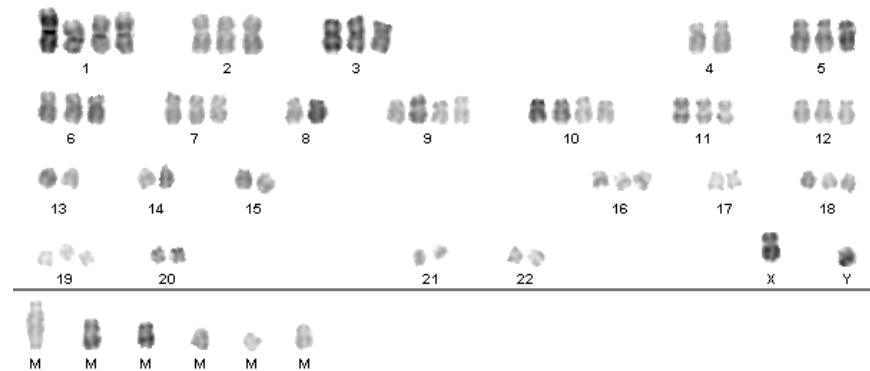
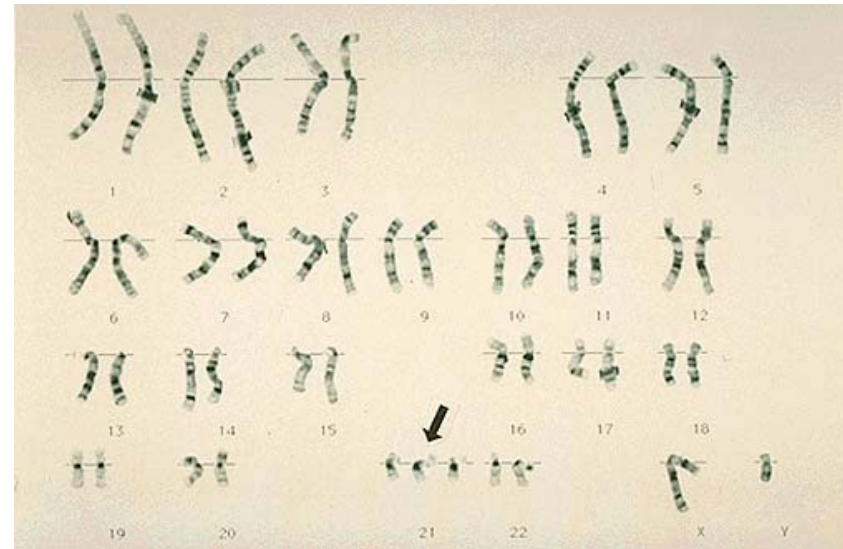
Cariotipo umano: 46 cromosomi

2. MUTAZIONI CROMOSOMICHE

Mutazione =
variazione del contenuto
genomico di una cellula

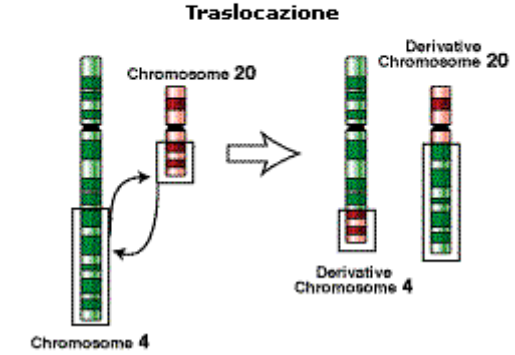
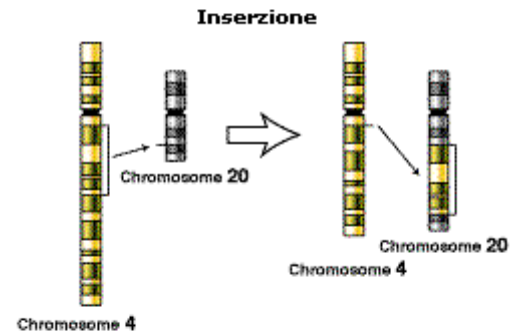
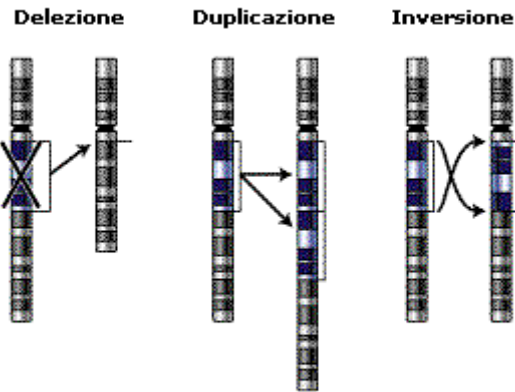
Mutazione macroscopica =

- **variazione del numero di cromosomi (aneuploidia)**
- **mutazione cromosomica**



2. MUTAZIONI CROMOSOMICHE

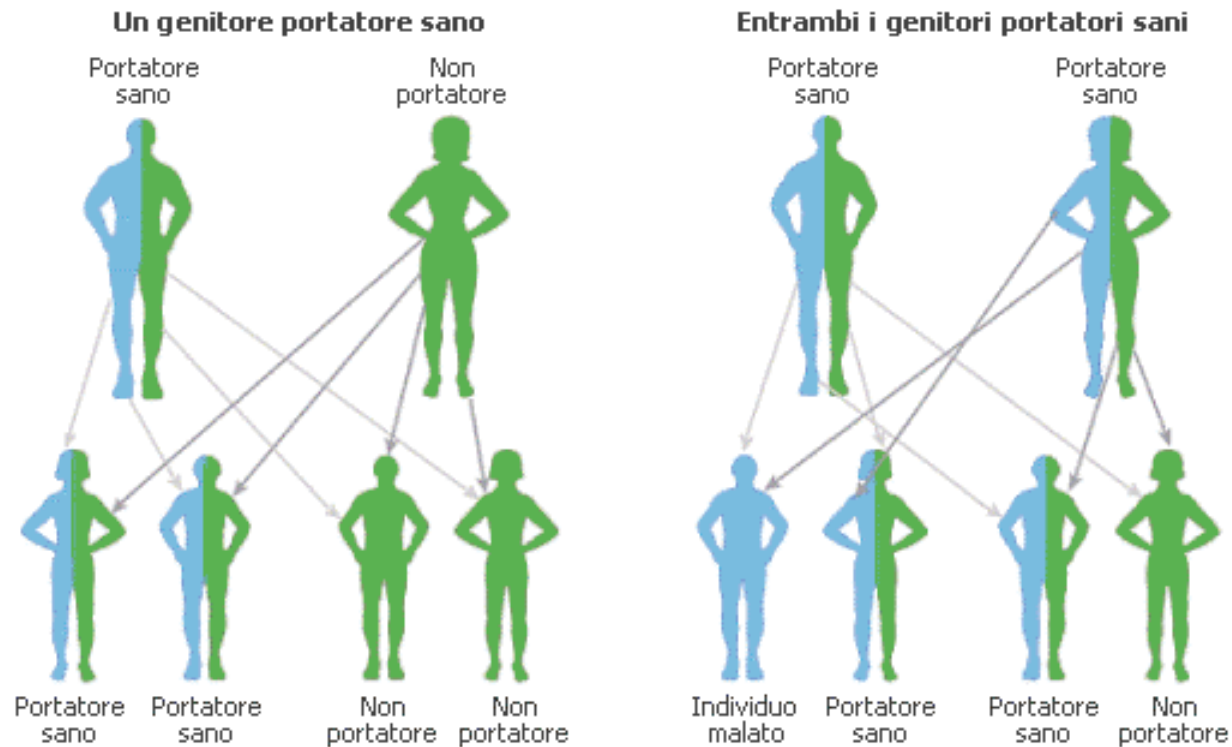
Mutazioni cromosomiche



3.EREDITARIETÀ

Malattie ereditarie

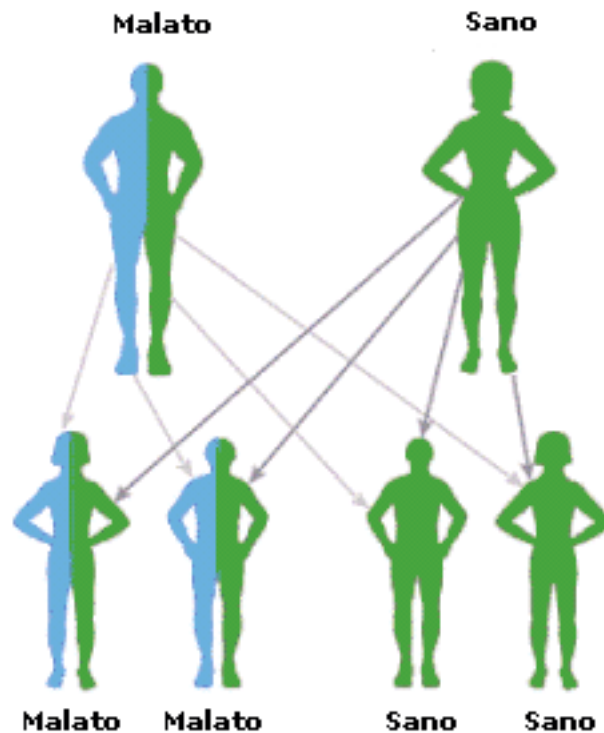
Mutazione recessiva (Fibrosi Cistica)



3.EREDITARIETÀ

Malattie ereditarie

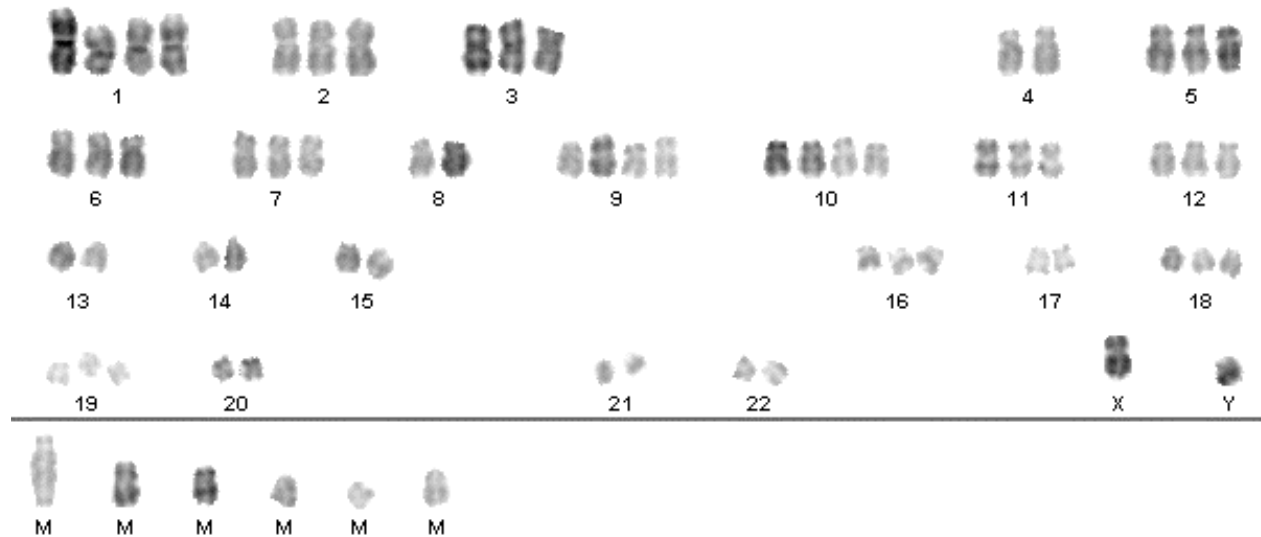
Mutazione dominante (Corea di Huntington)



NB: una malattia genetica non è necessariamente una malattia ereditaria

3.EREDITARIETÀ

NB: una **malattia genetica** non è necessariamente una **malattia ereditaria**



Cariotipo di una cellula di tumore del polmone

4. PROGETTO GENOMA

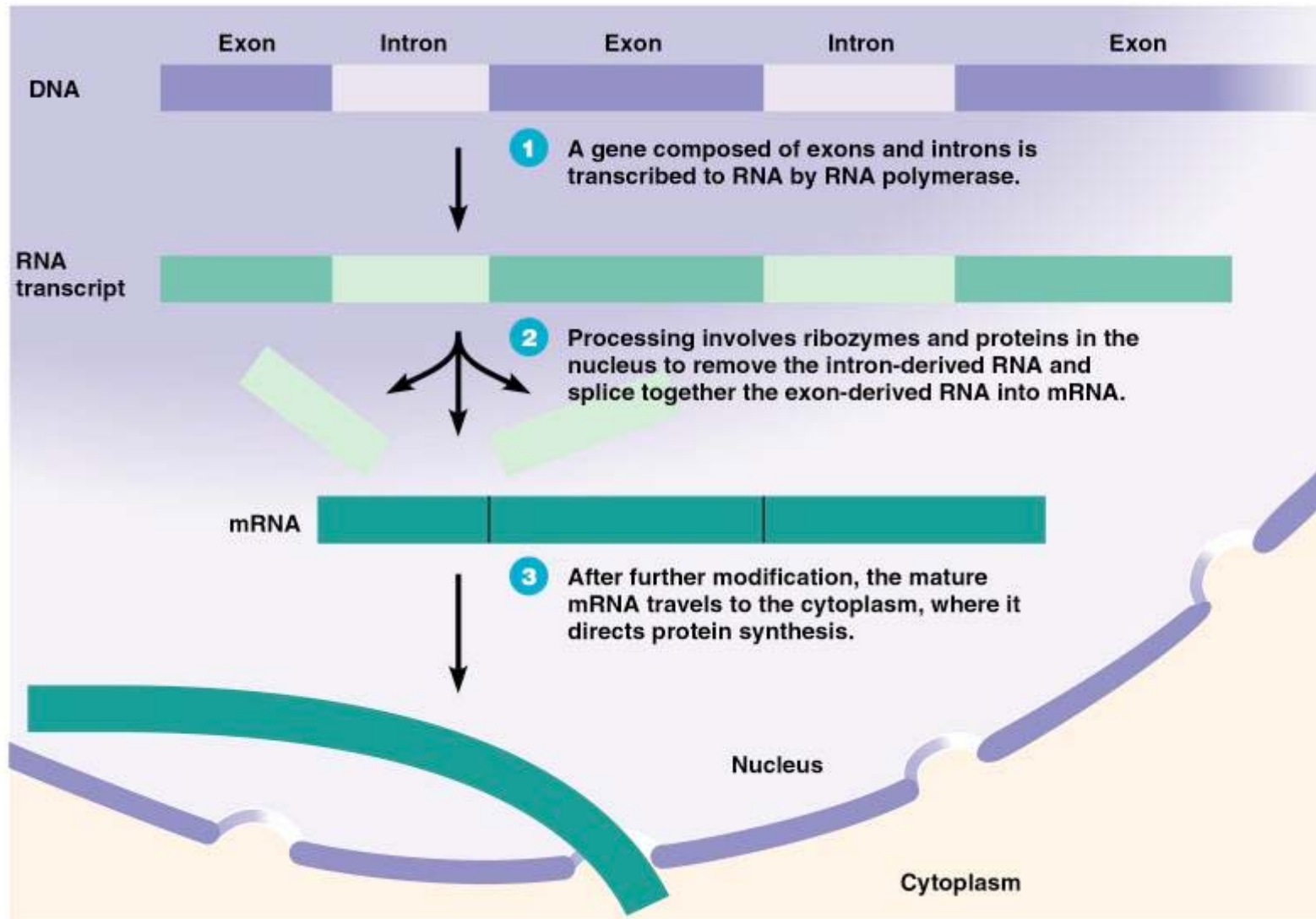
Genoma umano: insieme di tutte le informazioni genetiche contenute nella molecola di DNA di ogni cellula → sequenza della molecola di DNA.



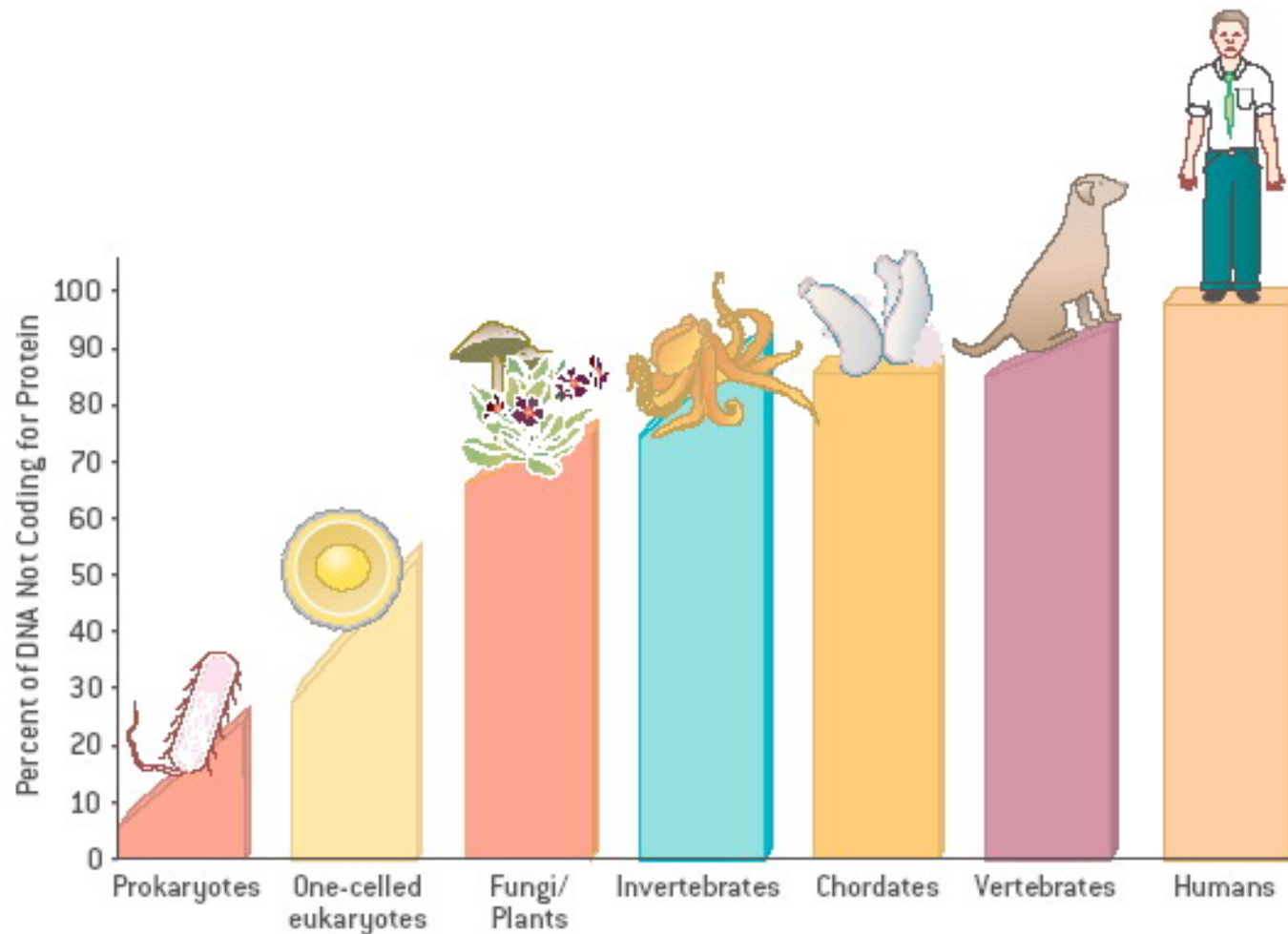
Progetto genoma: ha come scopo quello di arrivare a conoscere la sequenza completa della molecola del DNA (geni e non) e di conoscere tutti i geni presenti nel genoma umano (attesi: 20000-25000).

4.PROGETTO GENOMA

Molecola di DNA umano: 3×10^9 basi



4. PROGETTO GENOMA



NONPROTEIN-CODING SEQUENCES make up only a small fraction of the DNA of prokaryotes. Among eukaryotes, as their complexity increases, generally so, too, does the proportion of their DNA that does not code for protein. The noncoding sequences have been considered junk, but perhaps it actually helps to explain organisms' complexity.

4.PROGETTO GENOMA

Progetto genoma = conoscenza genoma umano



Studio di malattie genetiche



Regione con mutazione



Gene responsabile

4.PROGETTO GENOMA e MALATTIE GENETICHE

Regione genomica: porzione della molecola di DNA

Identificazione regione genomica = gene

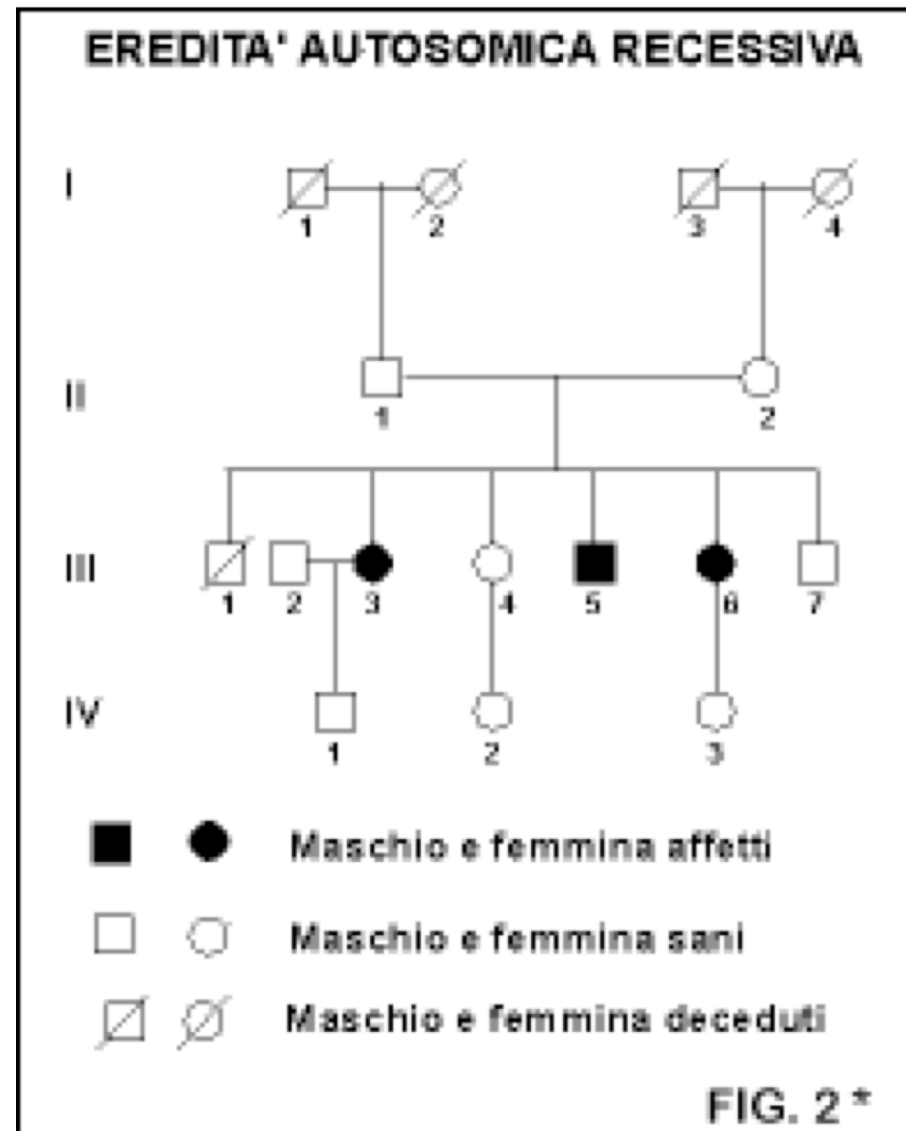
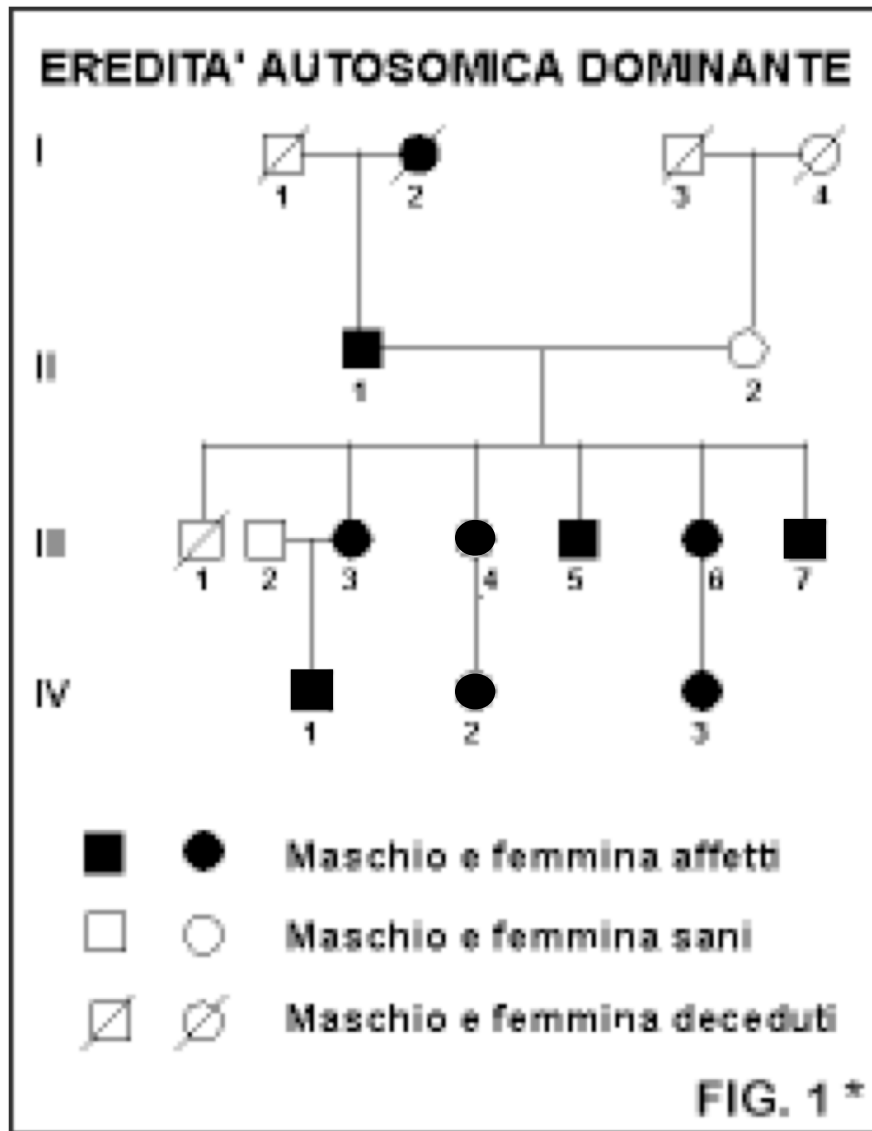
Come si indentifica una regione genomica legata a una malattia genetica:

a.Regione minima di delezione (Oloprosencefalia)

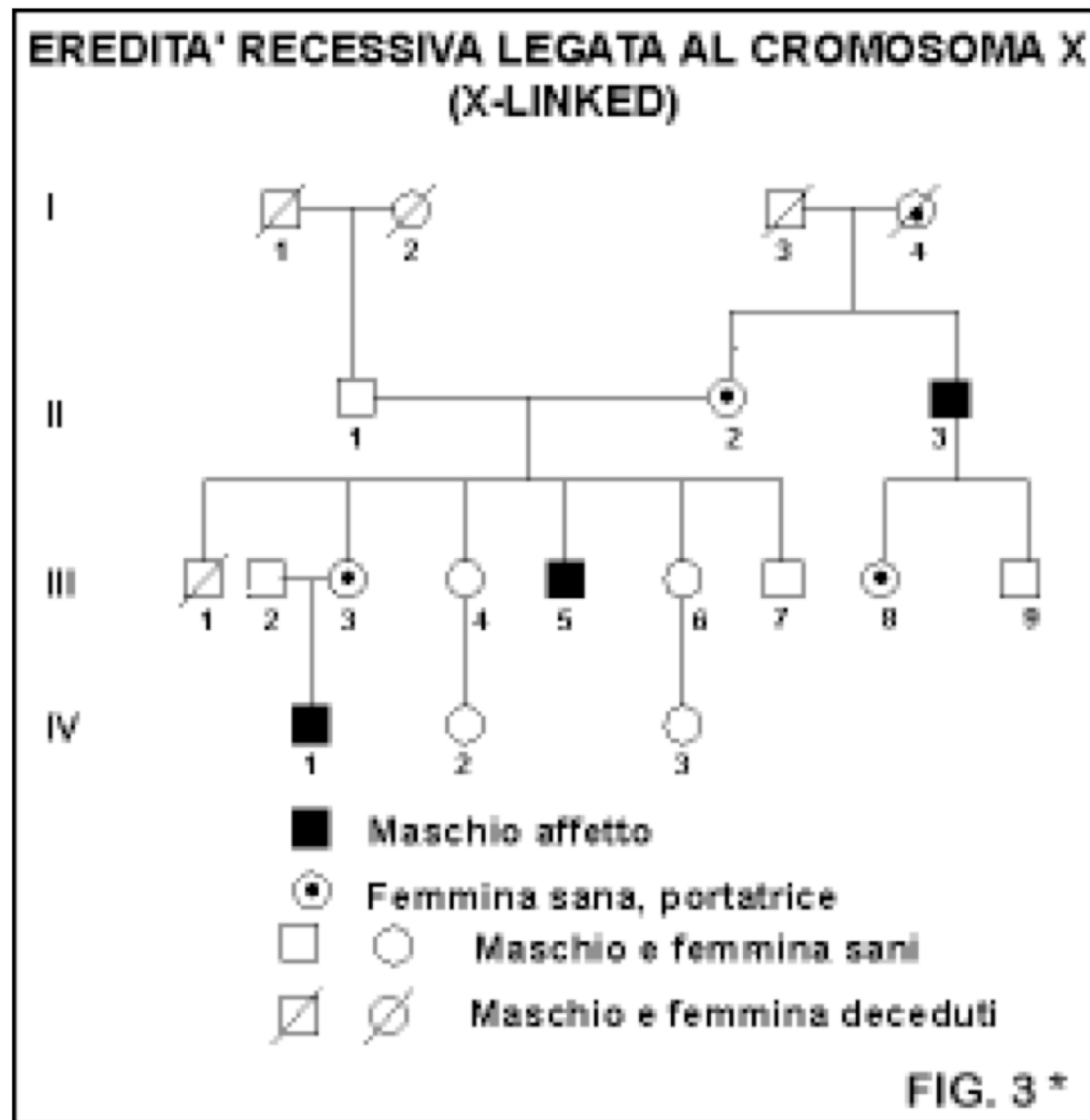
b.Citogenetica classica (AML)

c.FISH (AML)

4. PROGETTO GENOMA e MALATTIE GENETICHE



4. PROGETTO GENOMA e MALATTIE GENETICHE



4.PROGETTO GENOMA e MALATTIE GENETICHE

a.Regione minima di delezione:
Oloprosencefalia, 7q36

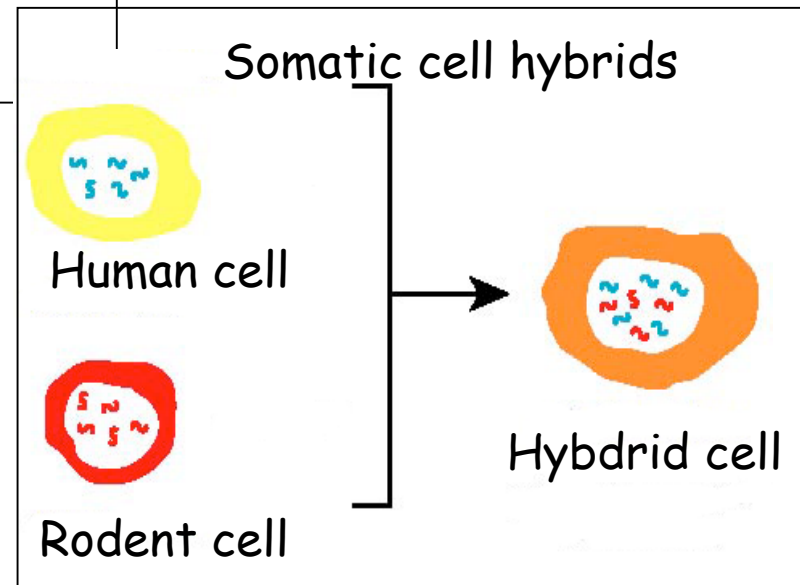


4. PROGETTO GENOMA e MALATTIE GENETICHE

Definizione di marcatore:

Un segmento di DNA con una posizione fisica identificabile su un cromosoma.

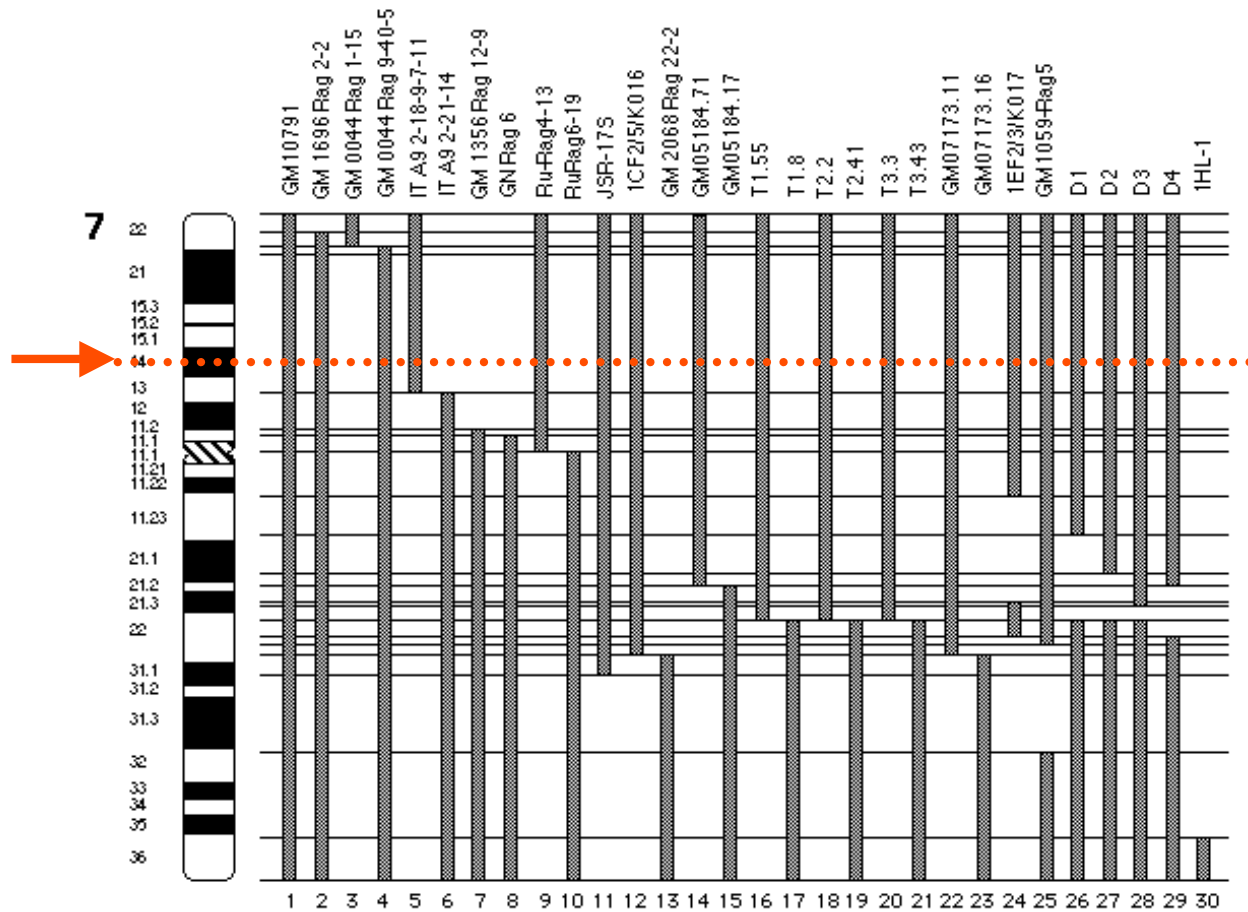
Un marcatore puo' essere un gene o una qualsiasi porzione di DNA, anche con funzione non nota.



4. PROGETTO GENOMA e MALATTIE GENETICHE

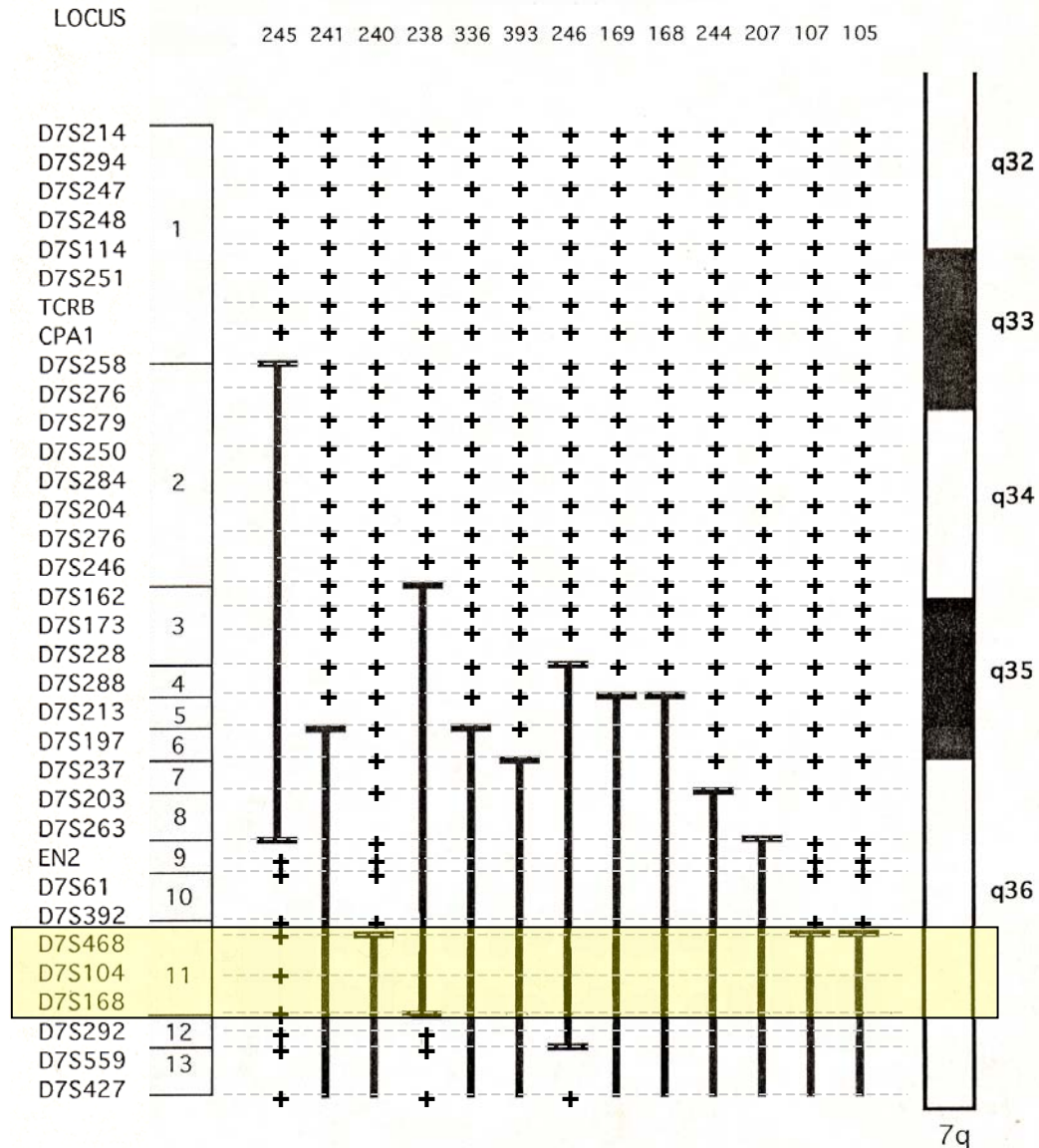
Chromosome 7 Workshop

Figure 2. Somatic hybrid cell lines for regional localization of markers on human chromosome 7.



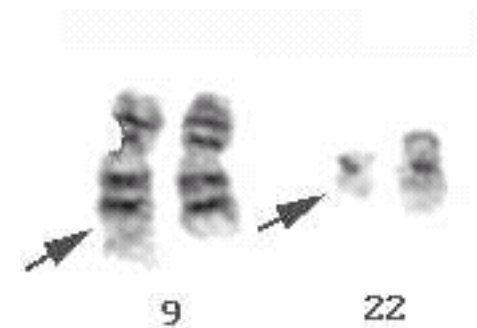
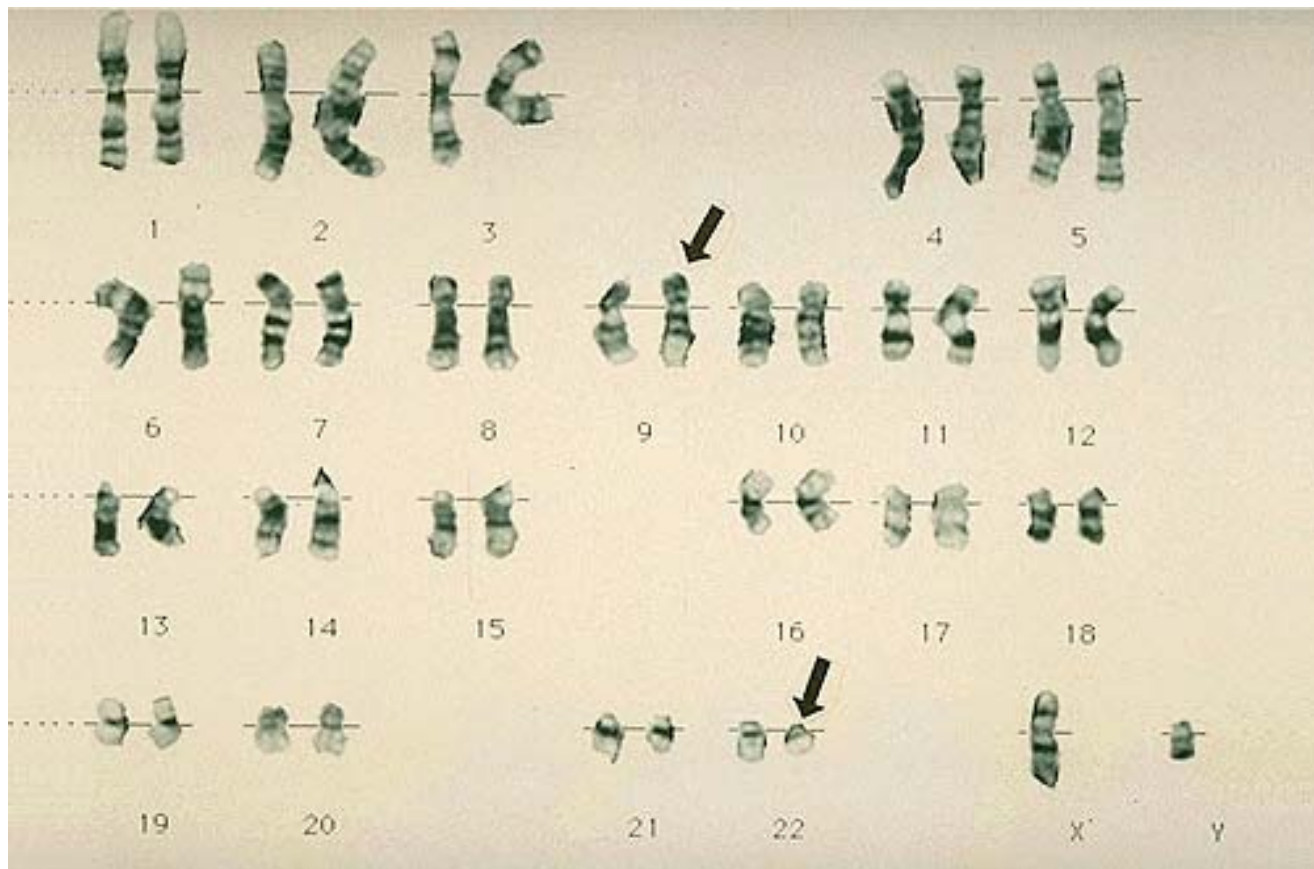
4. PROGETTO GENOMA e MALATTIE GENETICHE

PAZIENTI - OLOPROSENCEFALIA



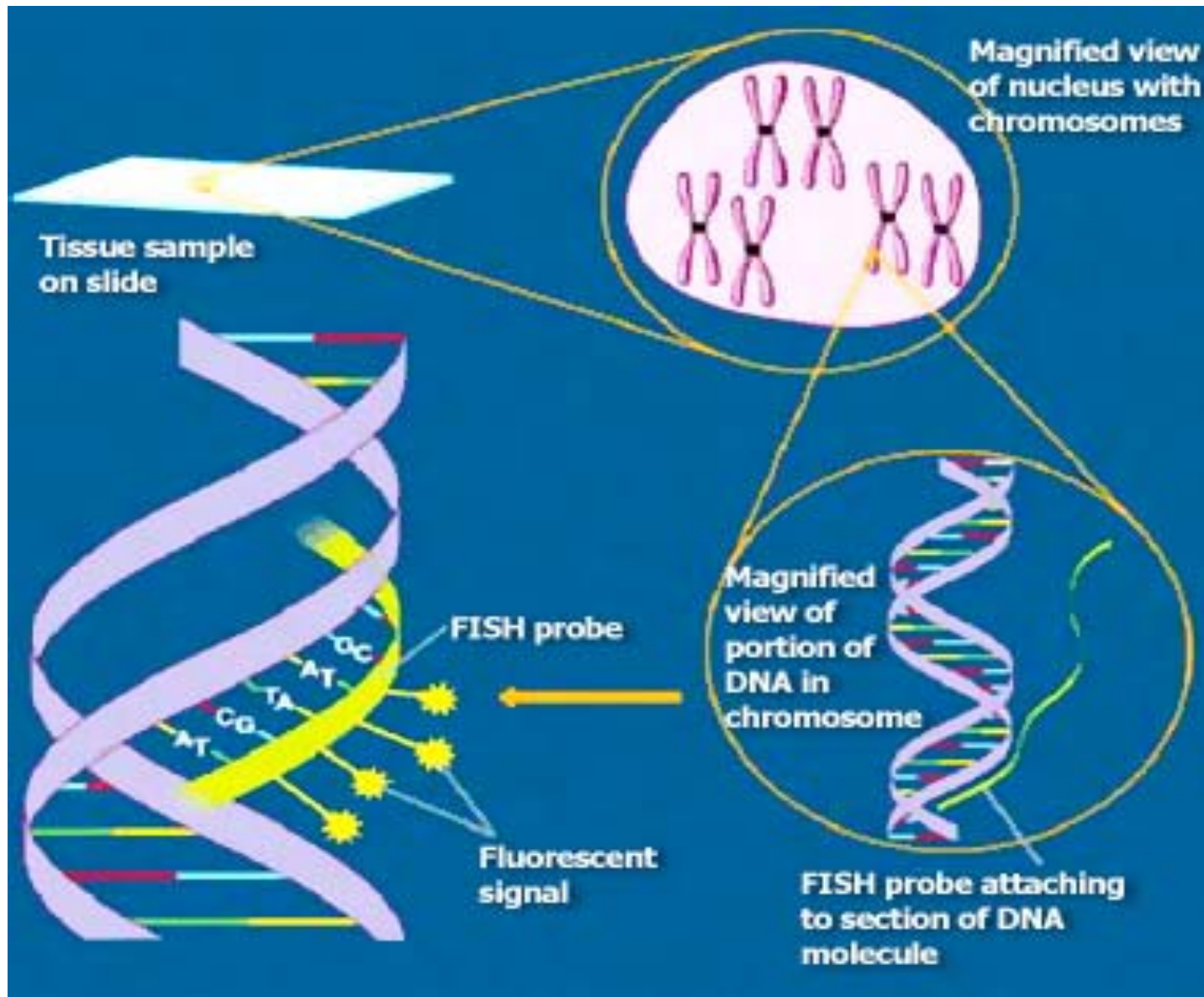
4.PROGETTO GENOMA e MALATTIE GENETICHE

b.Citogenetica classica: Cromosoma Filadelfia - $t(9;22)(q34;q11)$



4. PROGETTO GENOMA e MALATTIE GENETICHE

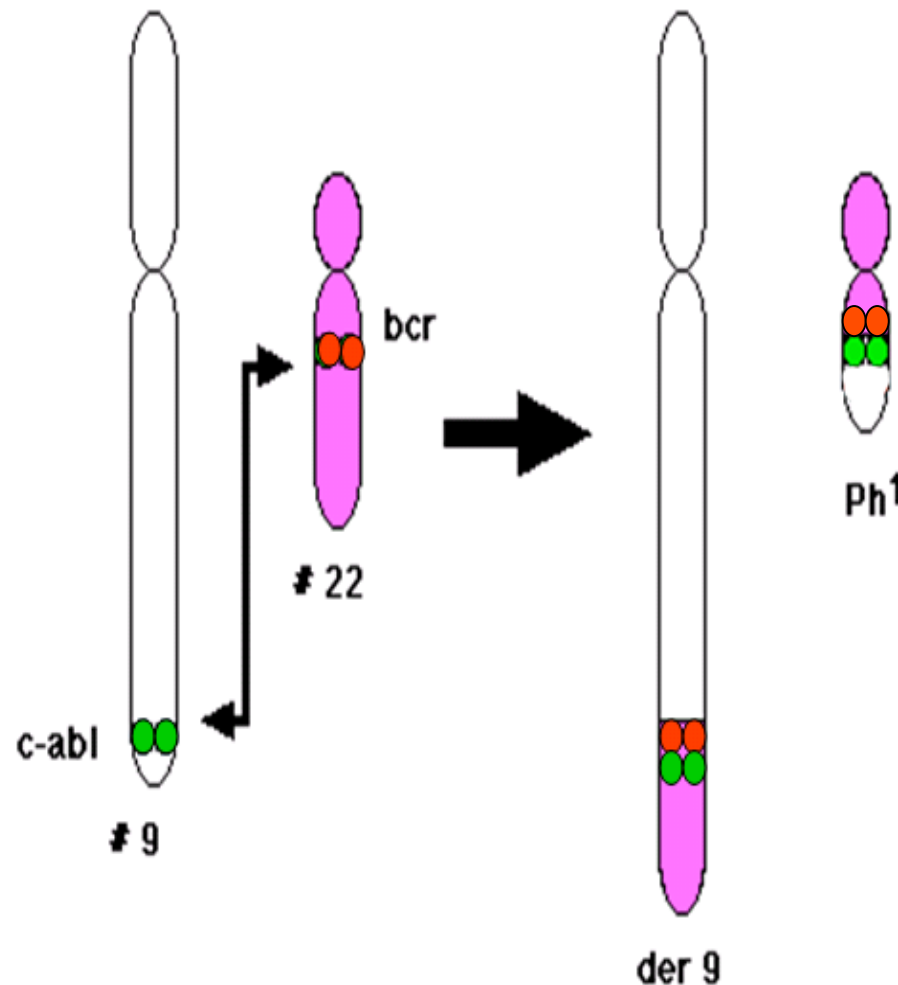
c.FISH: Fluorescence In Situ Hybridization



4. PROGETTO GENOMA e MALATTIE GENETICHE

c.FISH: Fluorescence In Situ Hybridization

Cromosoma Filadelfia - t(9;22)(q34;q11) - fusione BCR/ABL



In rosso: frammento di DNA del cromosoma 22.

In verde: frammento di DNA del cromosoma 9.

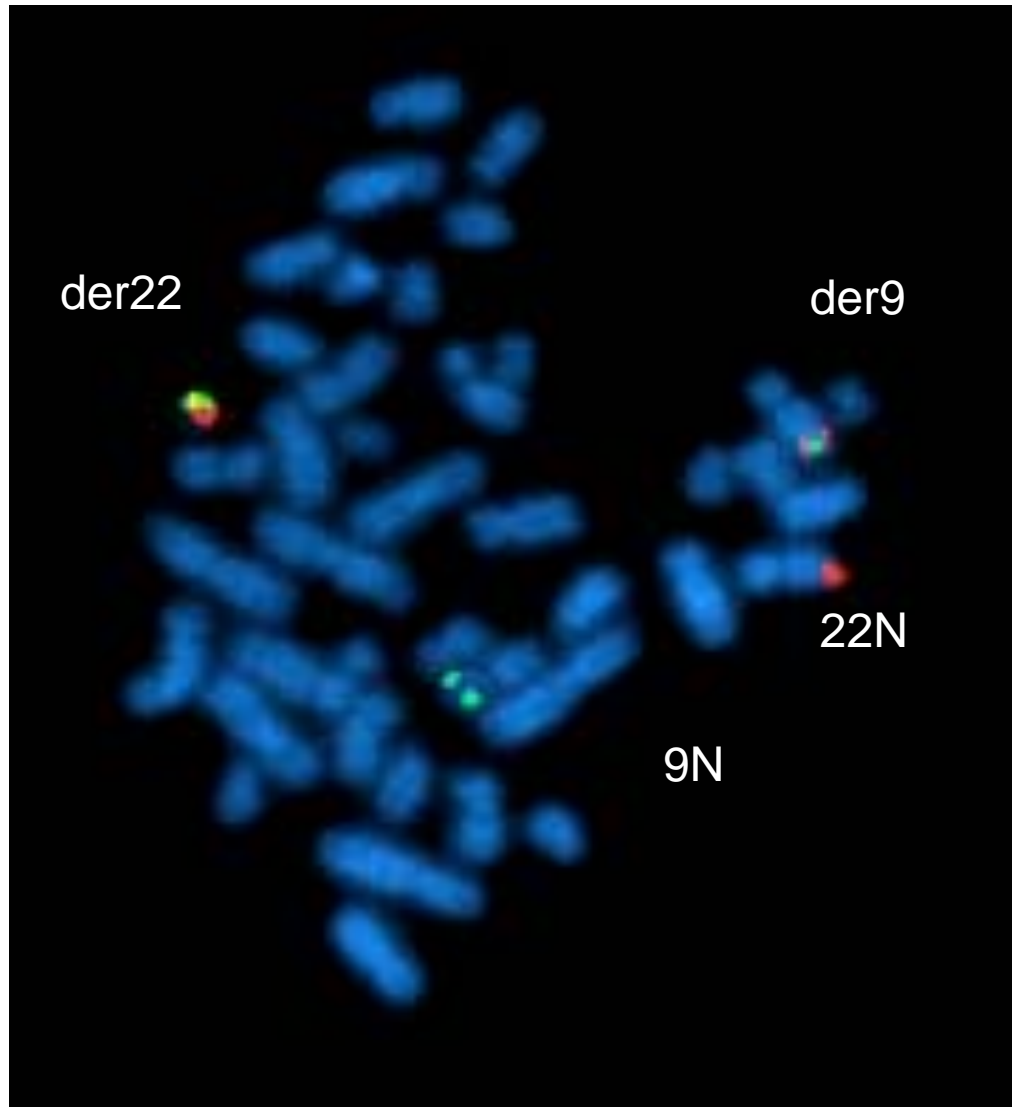
Il frammento rosso riconosce il cromosoma 22 normale + i cromosomi derivati dall'unione del cromosoma 9 con il 22 e del 22 con il 9.

Il frammento verde riconosce il cromosoma 9 normale + i cromosomi derivati dall'unione del cromosoma 9 con il 22 e del 22 con il 9.

4. PROGETTO GENOMA e MALATTIE GENETICHE

c.FISH: Fluorescence In Situ Hybridization

Cromosoma Filadelfia - t(9;22)(q34;q11) - fusione BCR/ABL



In rosso: frammento di DNA del cromosoma 22.

In verde: frammento di DNA del cromosoma 9.

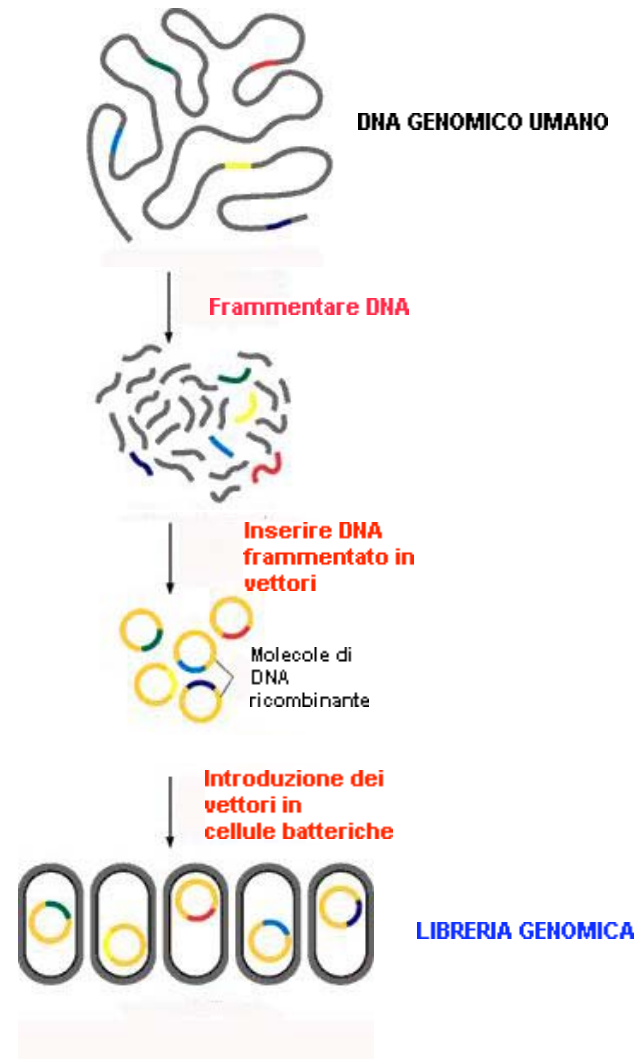
Il frammento rosso riconosce il cromosoma 22 normale + i cromosomi derivati dall'unione del cromosoma 9 con il 22 e del 22 con il 9.

Il frammento verde riconosce il cromosoma 9 normale + i cromosomi derivati dall'unione del cromosoma 9 con il 22 e del 22 con il 9.

4. PROGETTO GENOMA e MALATTIE GENETICHE

Domanda: una volta identificata la regione genomica di interesse, come si trovano le sonde che la rappresentano?

Libreria genomica:
collezione di frammenti
di DNA genomico



4.PROGETTO GENOMA e MALATTIE GENETICHE

Domanda: una volta identificata la regione genomica di interesse, come si trovano le sonde che la rappresentano?

Libreria genomica:
collezione di frammenti
di DNA genomico

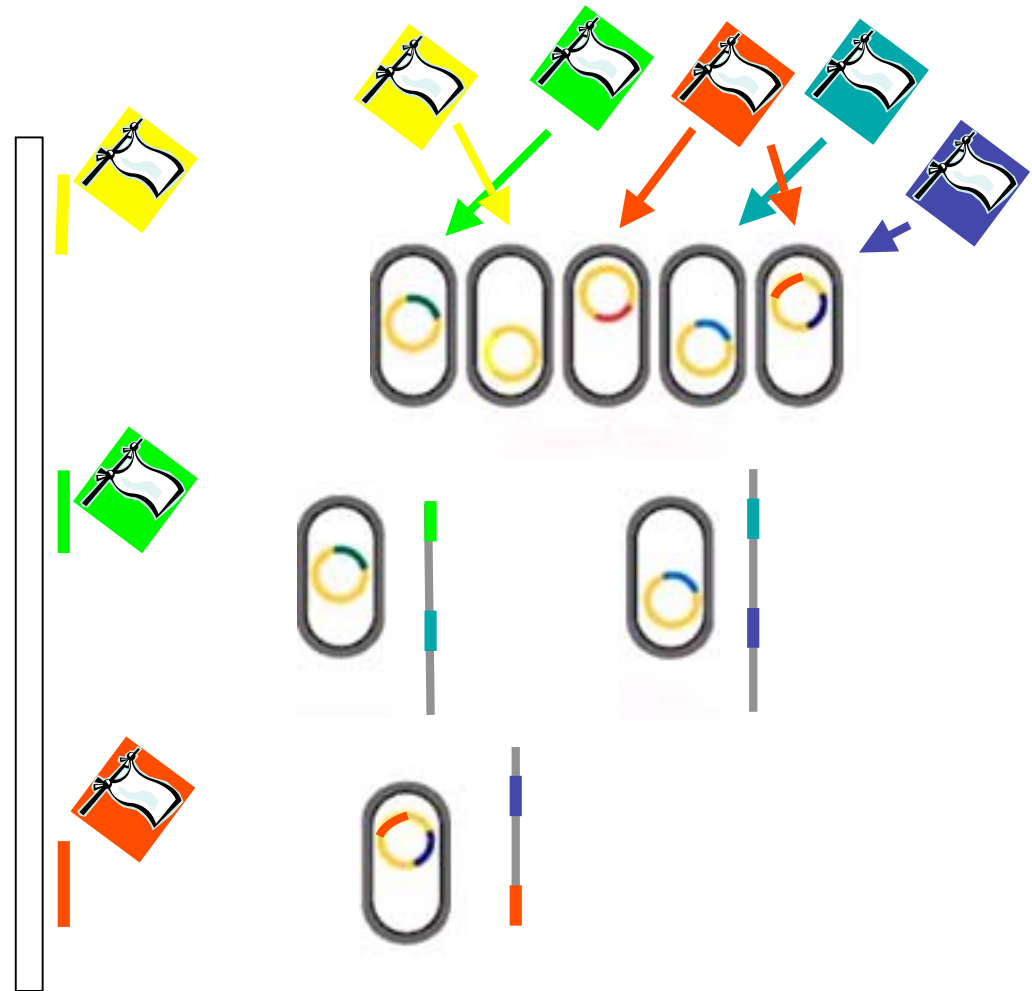
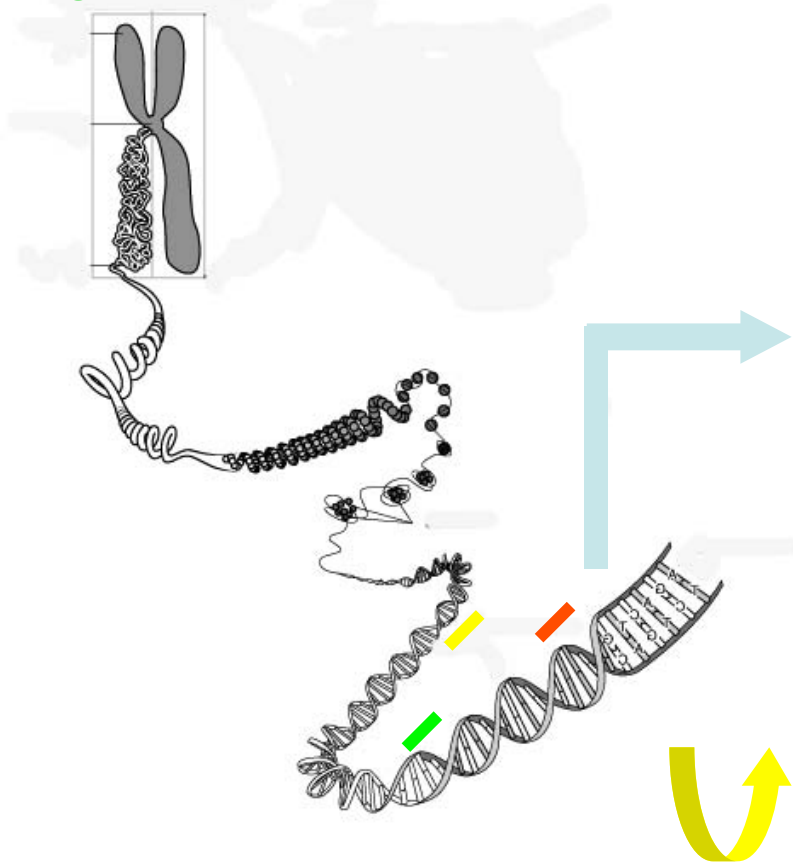
vettore	ospite	dimensioni
YAC	lievito	200-400kb (mega YAC: 800kb-1Mb)
PAC/BAC	batteri	100-250kb
cosmidi/fosmidi	batteri	30-40kb

Librerie genomiche → mappe fisiche → progetto genoma

4. PROGETTO GENOMA e MALATTIE GENETICHE

Domanda: una volta identificata la regione genomica di interesse, come si trovano le sonde che la rappresentano?

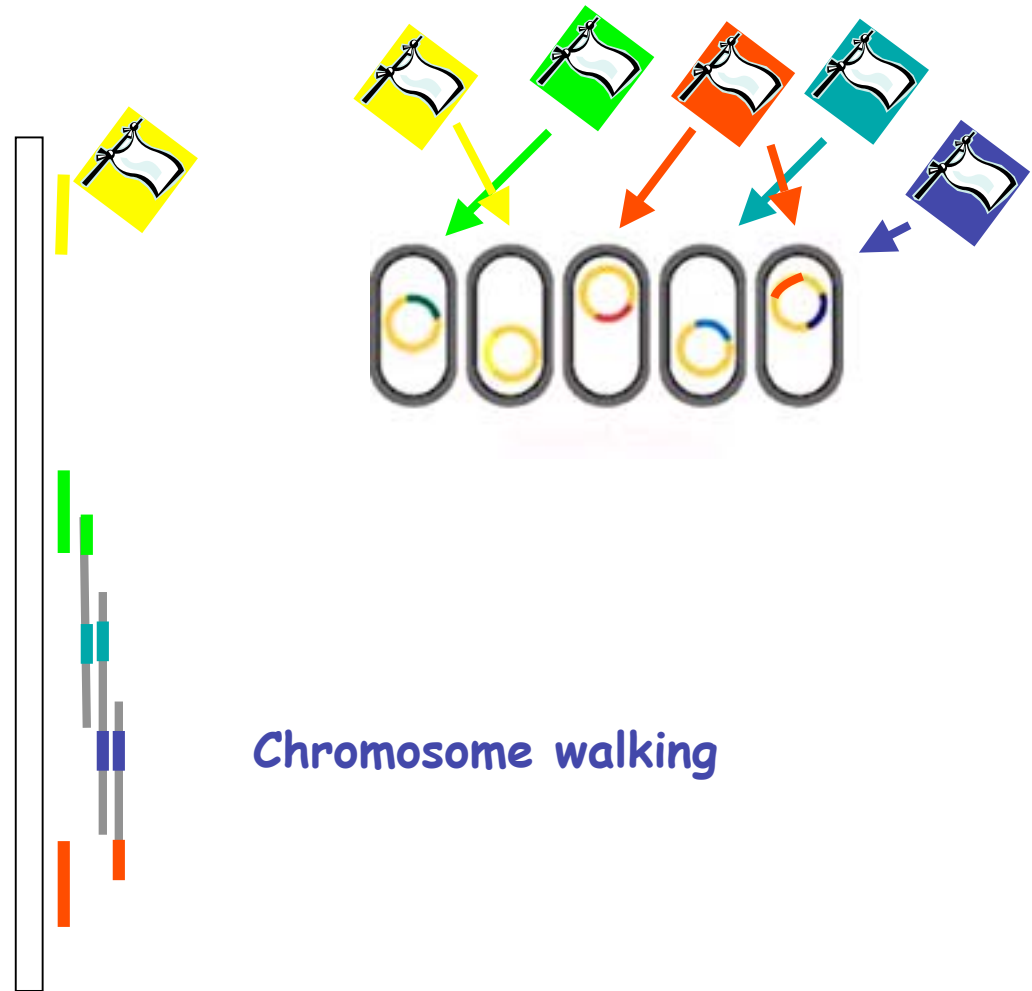
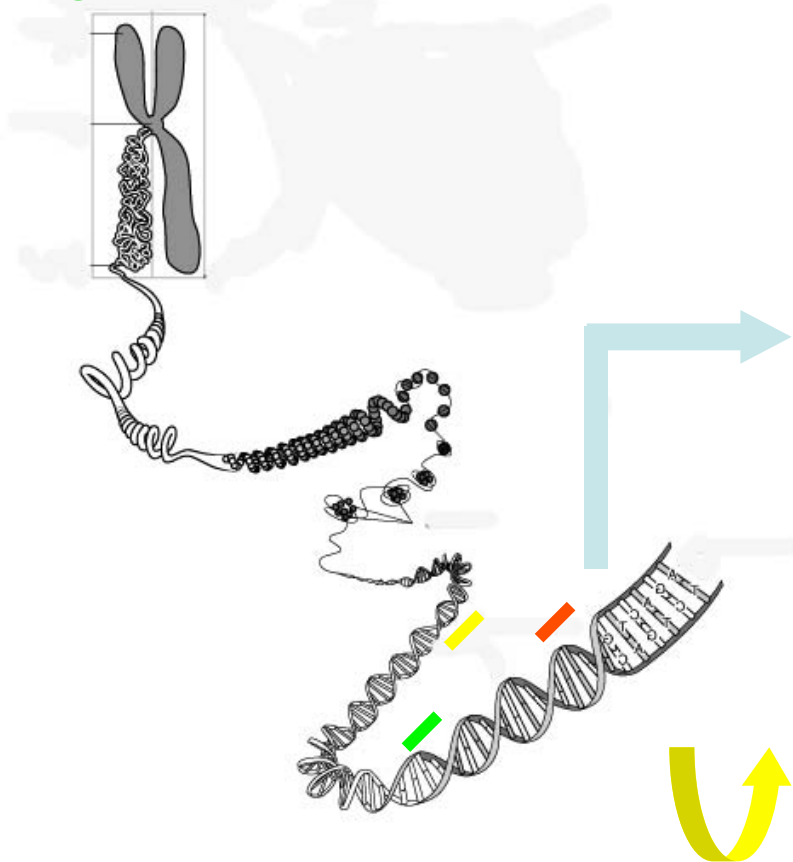
Mappa fisica: essenziale nello studio del genoma, consente la localizzazione precisa di ciascun gene (o marcatore) lungo la molecola di DNA



4. PROGETTO GENOMA e MALATTIE GENETICHE

Domanda: una volta identificata la regione genomica di interesse, come si trovano le sonde che la rappresentano?

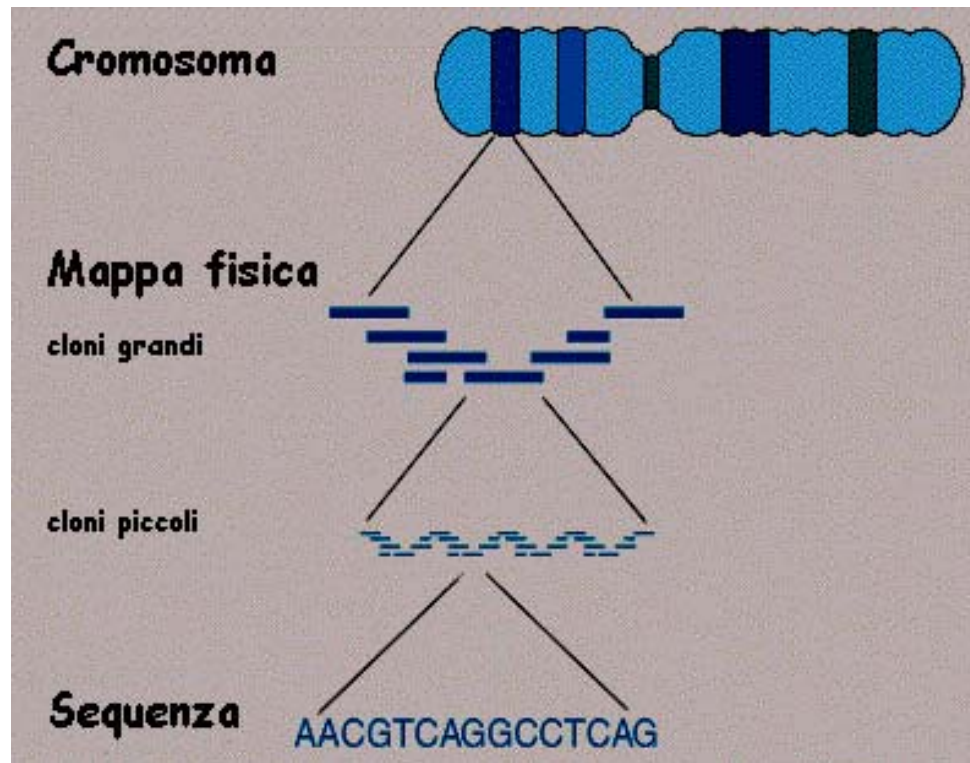
Mappa fisica: essenziale nello studio del genoma, consente la localizzazione precisa di ciascun gene (o marcatore) lungo la molecola di DNA



Chromosome walking

4.PROGETTO GENOMA e MALATTIE GENETICHE

Domanda: una volta identificata la regione genomica di interesse, come si trovano le sonde che la rappresentano?



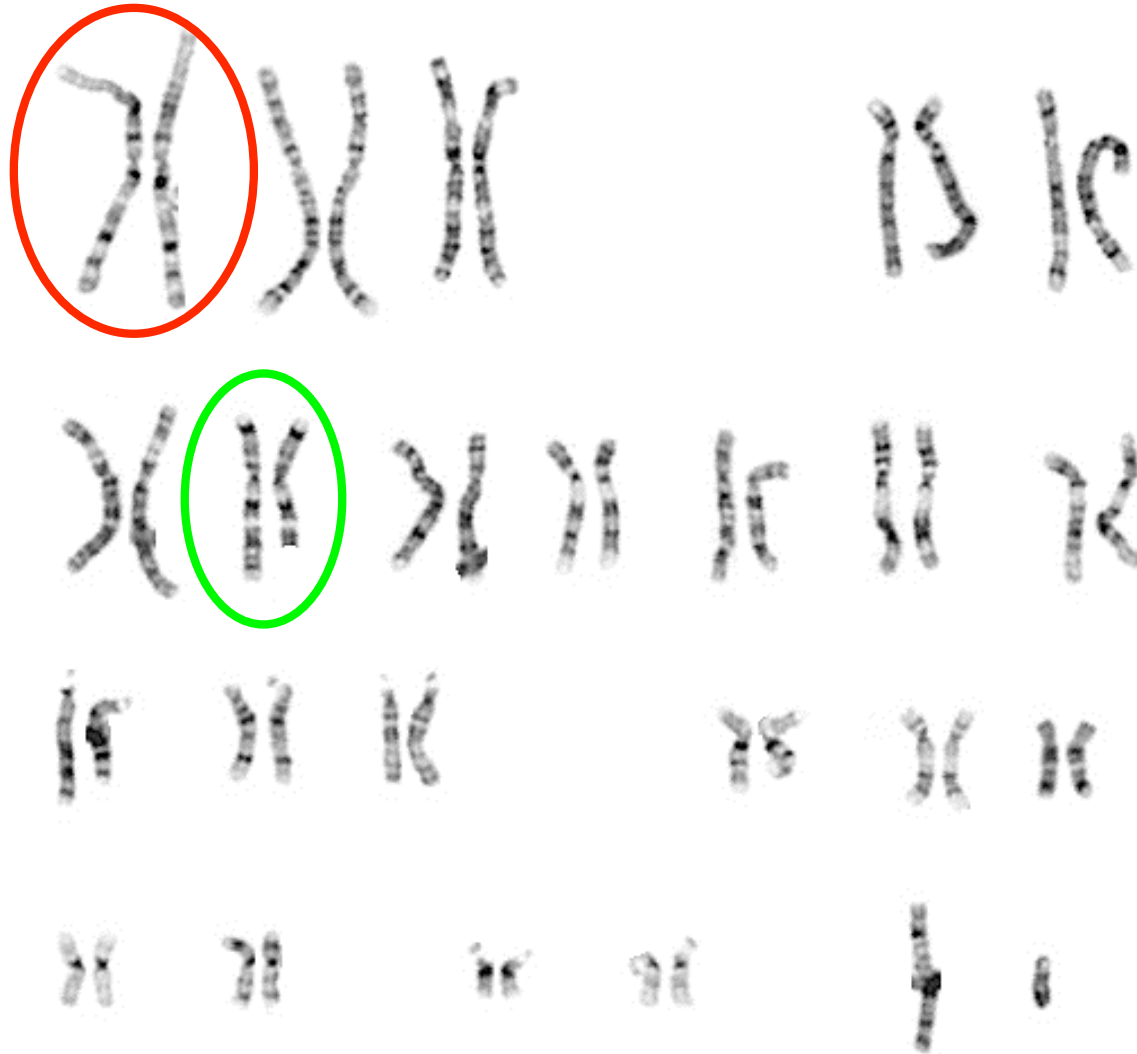
Creazione di database dedicati:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://genome.ucsc.edu/>

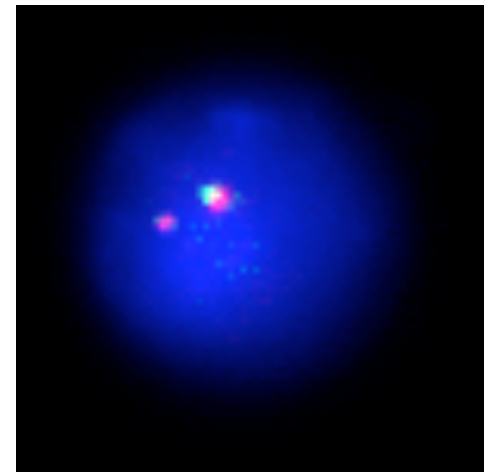
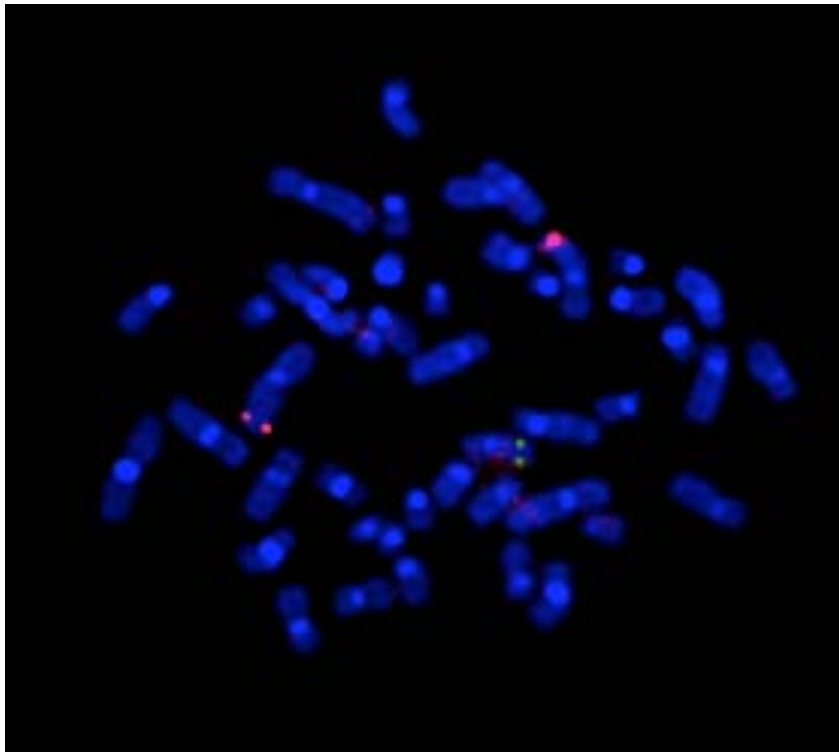
4.PROGETTO GENOMA e MALATTIE GENETICHE

a. Identificazione della regione genomica coinvolta (regione minima di delezione): PCR - FISH



4.PROGETTO GENOMA e MALATTIE GENETICHE

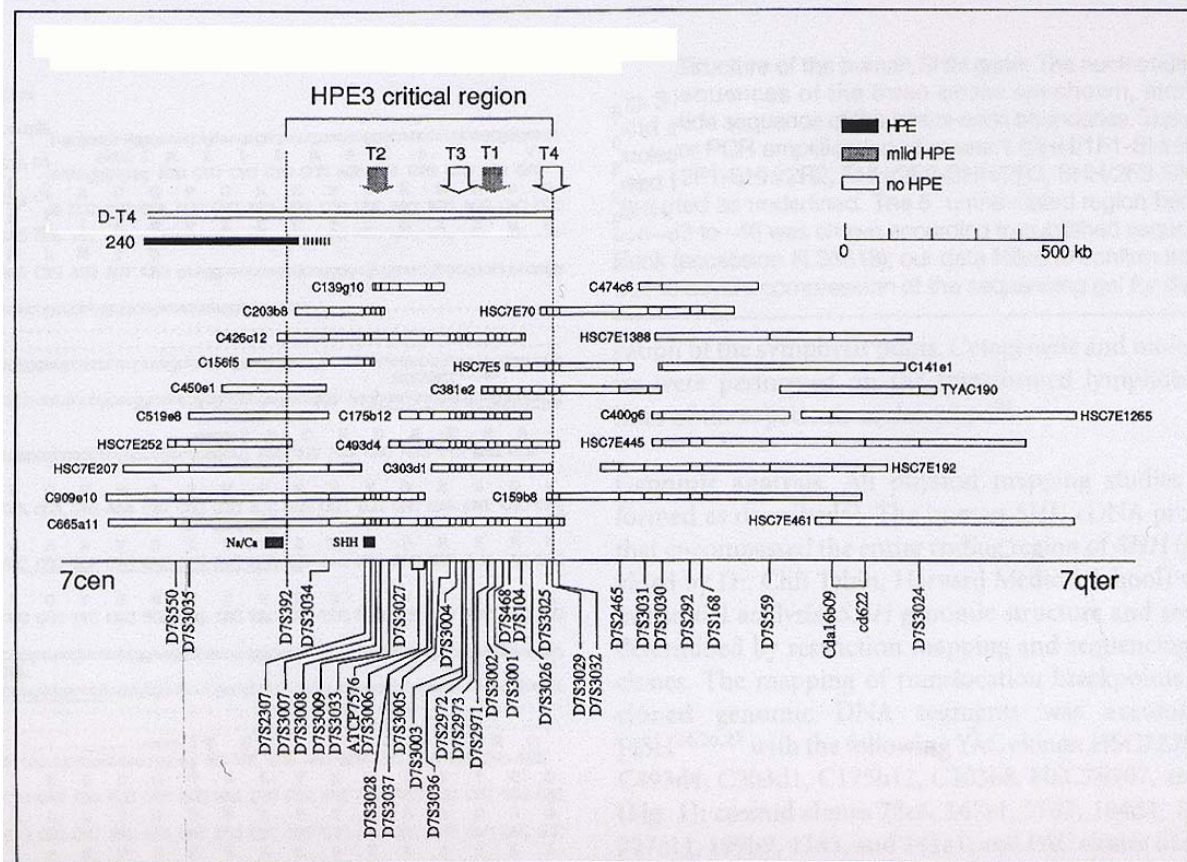
a. Identificazione della regione genomica coinvolta (regione minima di delezione): PCR - FISH



4. PROGETTO GENOMA e MALATTIE GENETICHE

b. Mappa fisica della regione identificata (ieri)

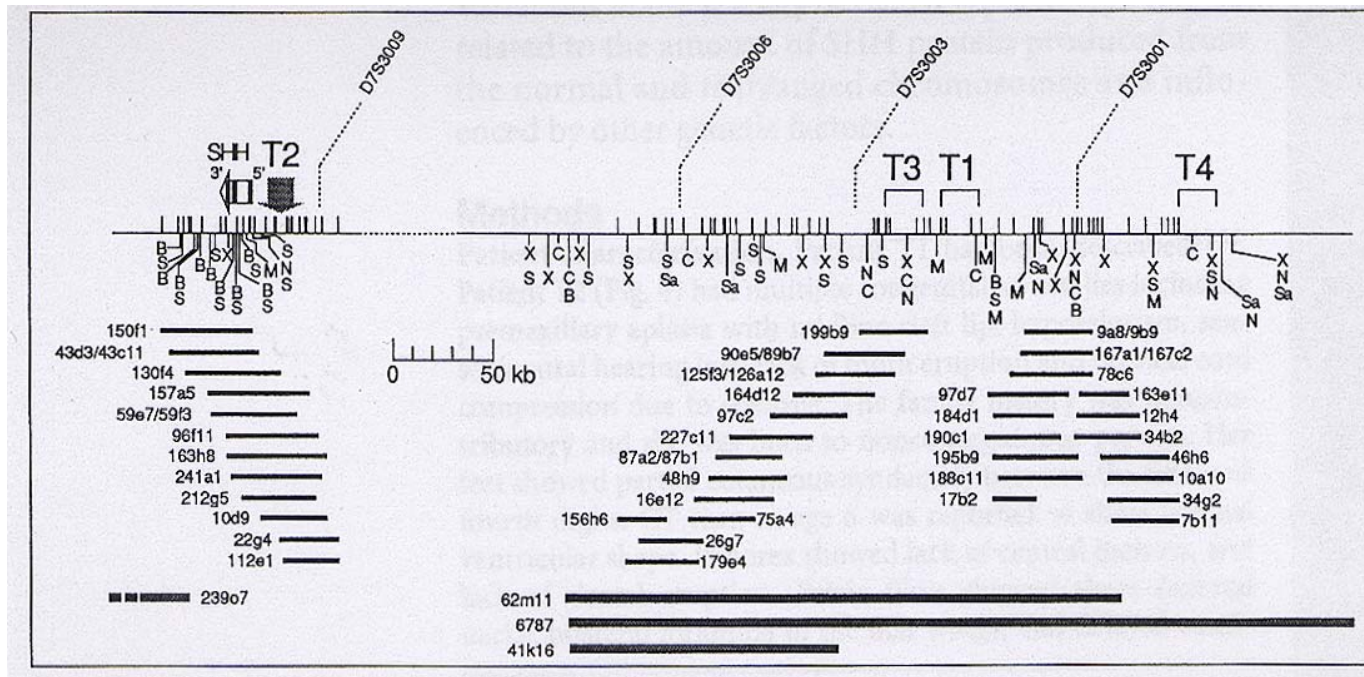
Mappa fisica della regione HPE, 7q36 coinvolta nell'Oloprosencefalia



4. PROGETTO GENOMA e MALATTIE GENETICHE

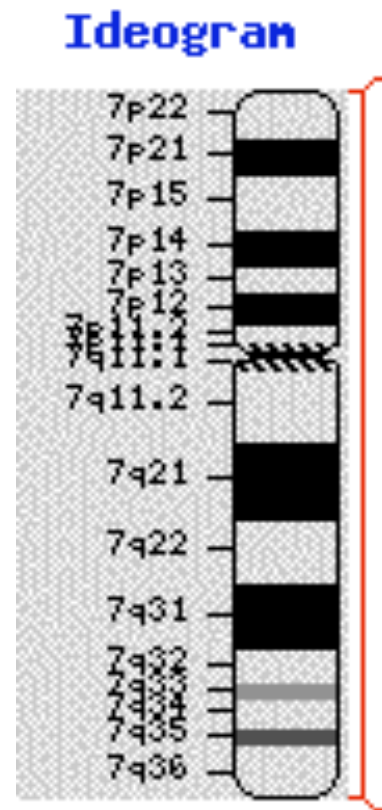
b. Mappa fisica della regione identificata (ieri)

Mappa fisica della regione HPE, 7q36 coinvolta nell'Oloprosencefalia



4.PROGETTO GENOMA e MALATTIE GENETICHE

b. Mappa fisica della regione identificata (oggi)



4. PROGETTO GENOMA e MALATTIE GENETICHE

c. Identificazione del gene coinvolto

i) Mappa fisica



ii) Identificazione di geni candidati

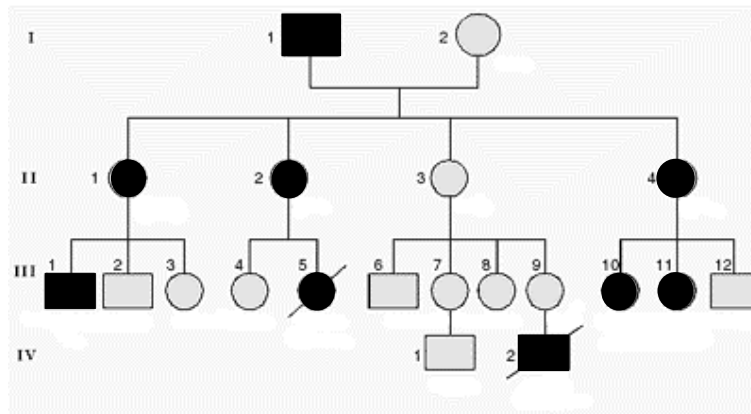
LOC727871

PRR8

RBM33

SHH

iii) Ricerca di mutazioni



Metodi indiretti (ieri)



4. PROGETTO GENOMA e MALATTIE GENETICHE

c. Identificazione del gene coinvolto

i) Mappa fisica



ii) Identificazione di geni candidati

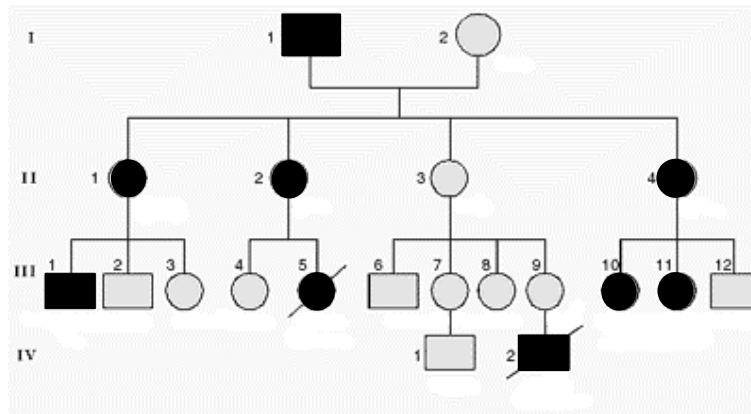
LOC727871

PRR8

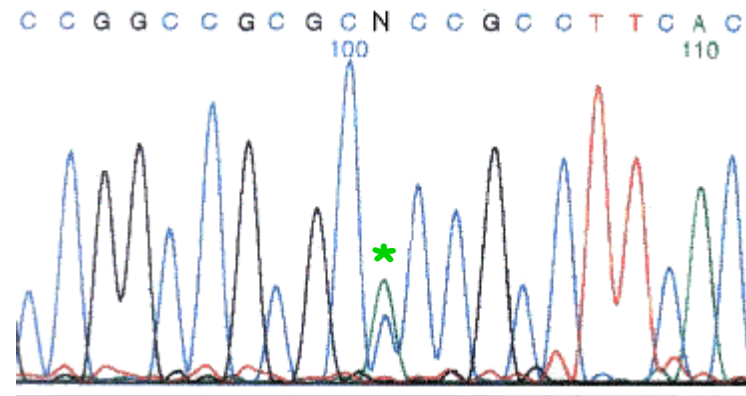
RBM33

SHH

iii) Ricerca di mutazioni



Metodi indiretti (ieri)



4. PROGETTO GENOMA e MALATTIE GENETICHE

c. Identificazione del gene coinvolto

i) Mappa fisica



ii) Identificazione di geni candidati

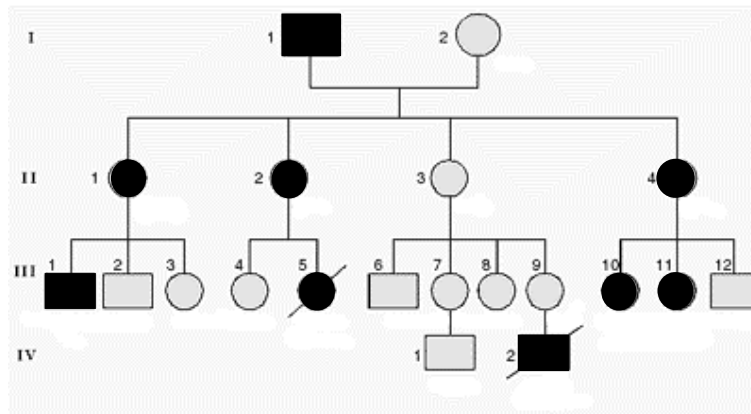
LOC727871

PRR8

RBM33

SHH

iii) Ricerca di mutazioni



Metodi diretti (oggi)

Sequenziamento diretto
del gene candidato



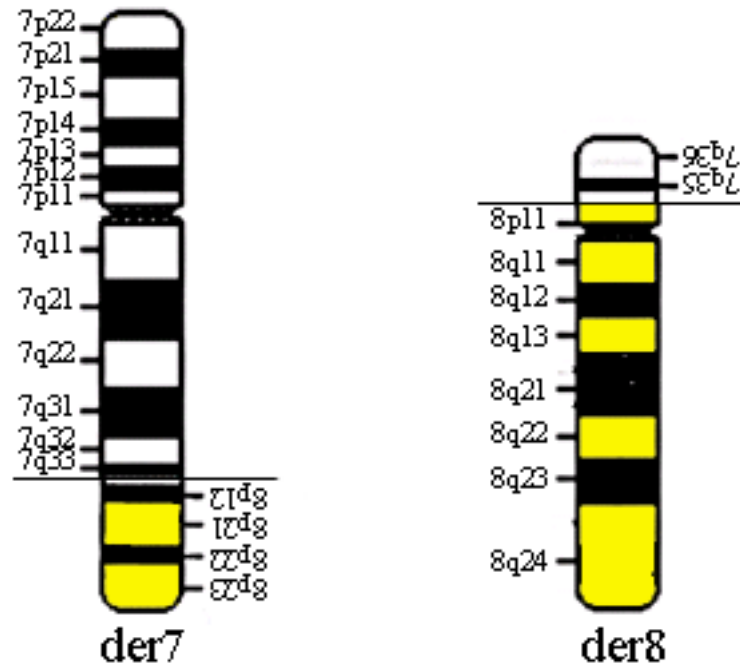
4. PROGETTO GENOMA e MALATTIE GENETICHE

a+b. Identificazione e mappa fisica della regione genomica coinvolta

Dalla citogenetica al gene:

clonaggio di una traslocazione in LAM (leucemia acuta mieloide)

i) Citogenetica: cariotipo → traslocazione



4.PROGETTO GENOMA e MALATTIE GENETICHE

a+b. Identificazione e mappa fisica della regione genomica coinvolta

Dalla citogenetica al gene:

clonaggio di una traslocazione in LAM (leucemia acuta mieloide)

ii) Mappa fisica



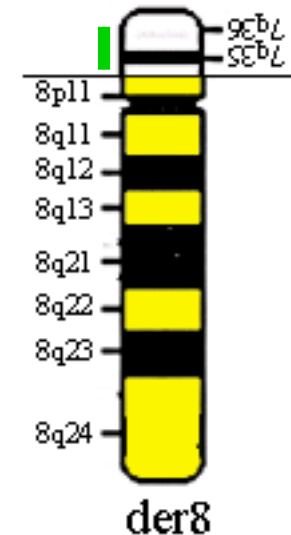
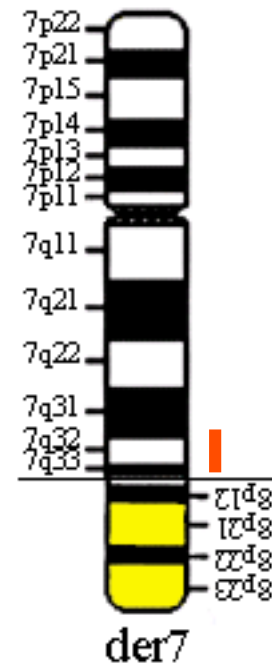
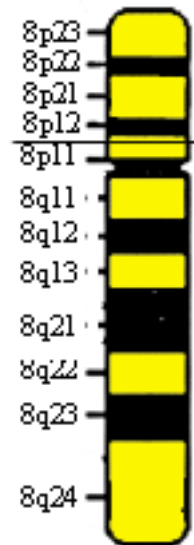
4. PROGETTO GENOMA e MALATTIE GENETICHE

a+b. Identificazione e mappa fisica della regione genomica coinvolta

Dalla citogenetica al gene:

clonaggio di una traslocazione in LAM (leucemia acuta mieloide)

iii) FISH



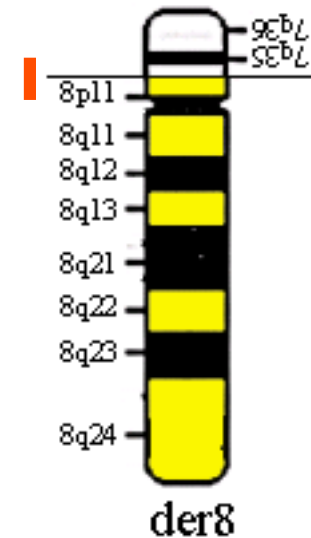
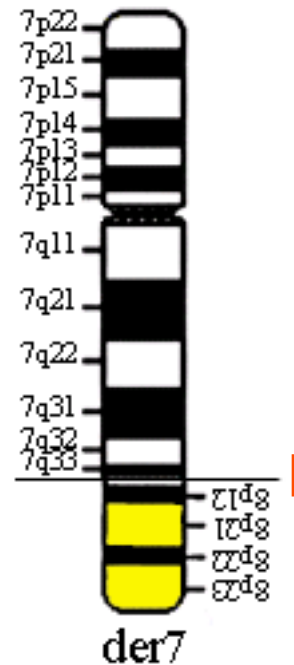
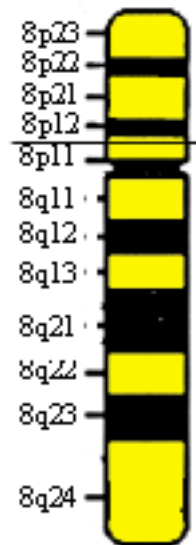
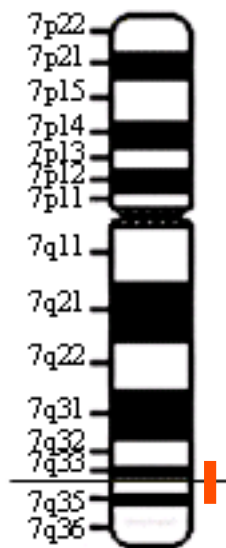
4. PROGETTO GENOMA e MALATTIE GENETICHE

a+b. Identificazione e mappa fisica della regione genomica coinvolta

Dalla citogenetica al gene:

clonaggio di una traslocazione in LAM (leucemia acuta mieloide)

iii) FISH

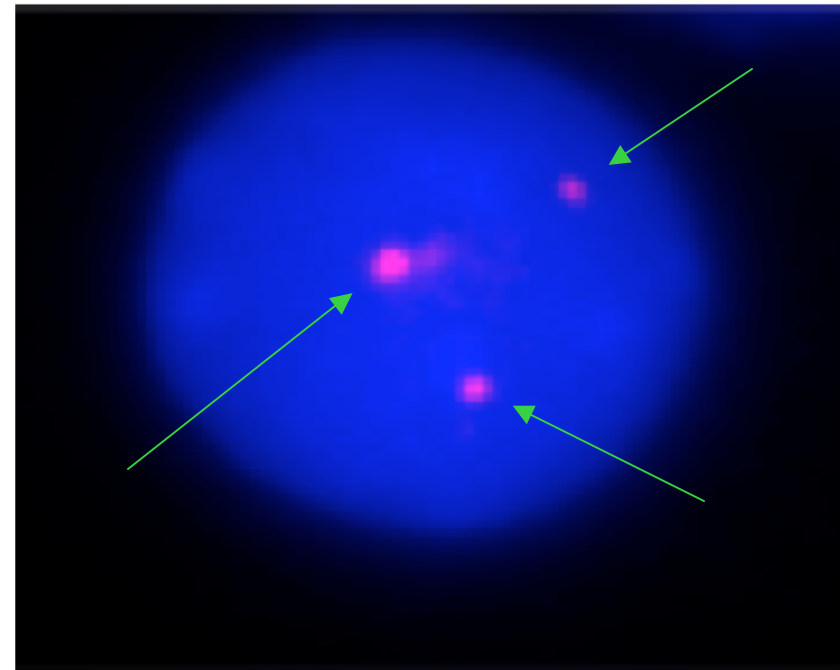
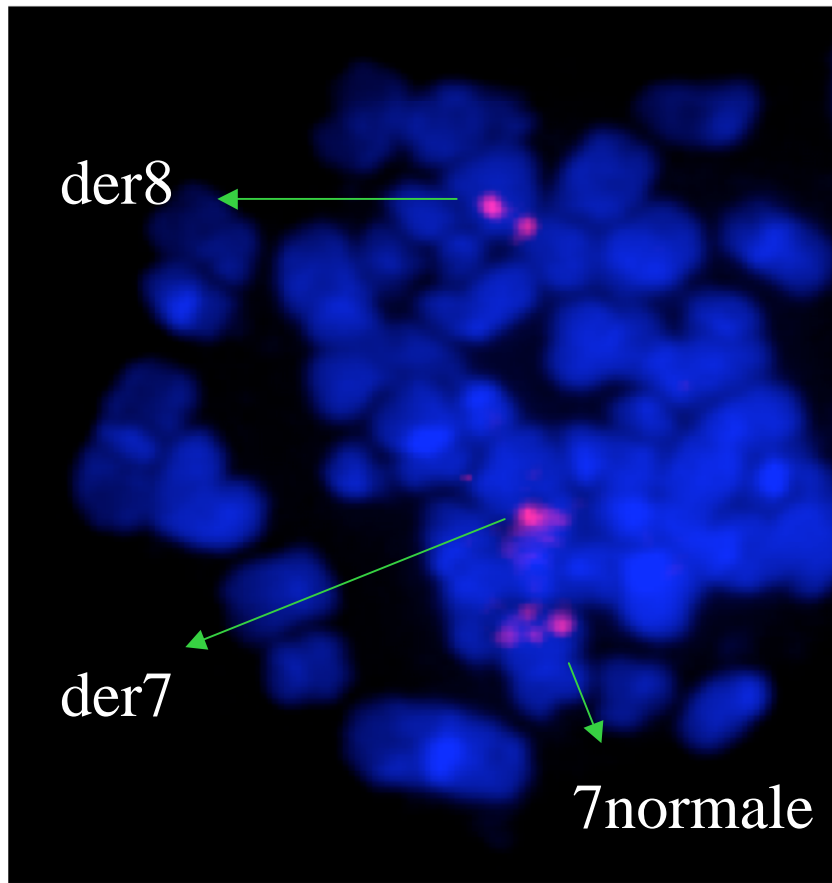


4.PROGETTO GENOMA e MALATTIE GENETICHE

a+b. Identificazione e mappa fisica della regione genomica coinvolta

Dalla citogenetica al gene:

clonaggio di una traslocazione in LAM (leucemia acuta mieloide)

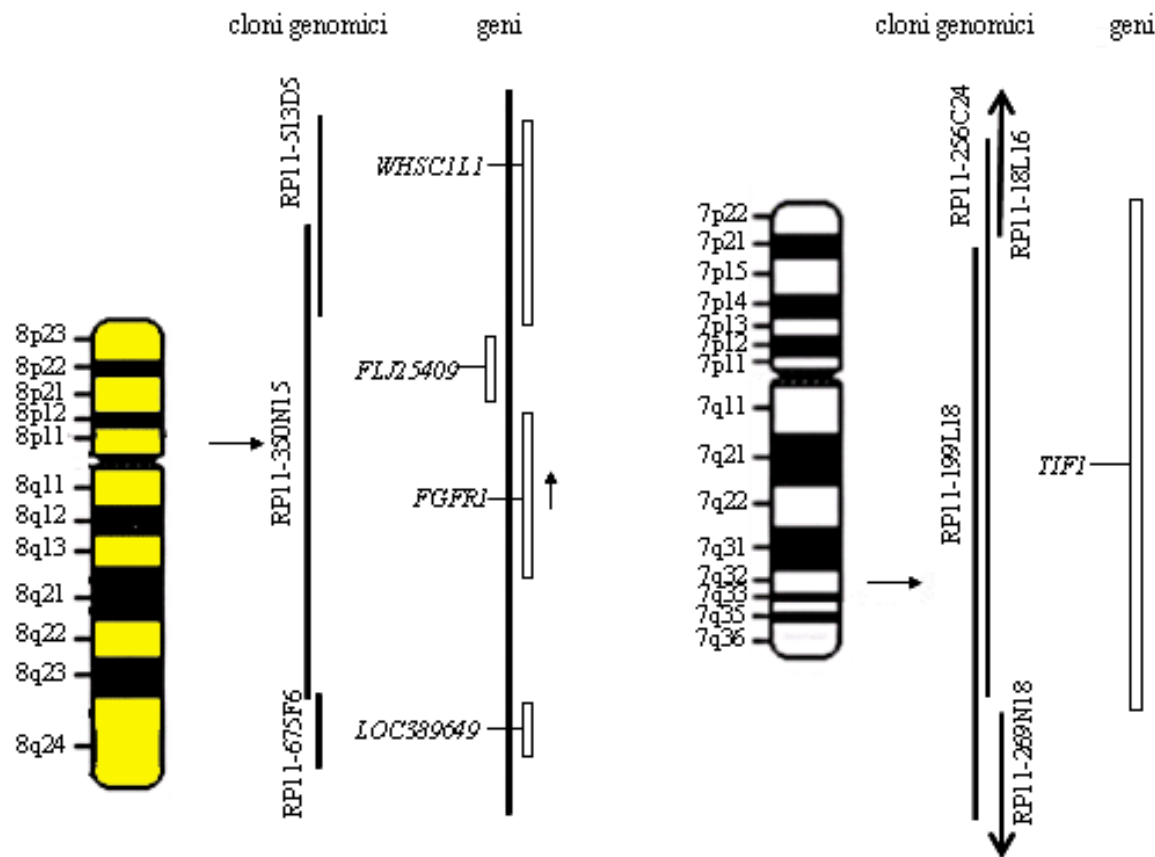


4. PROGETTO GENOMA e MALATTIE GENETICHE

c. Identificazione del gene coinvolto --> funzione

Dalla citogenetica al gene:

clonaggio di una traslocazione in LAM (leucemia acuta mieloide)

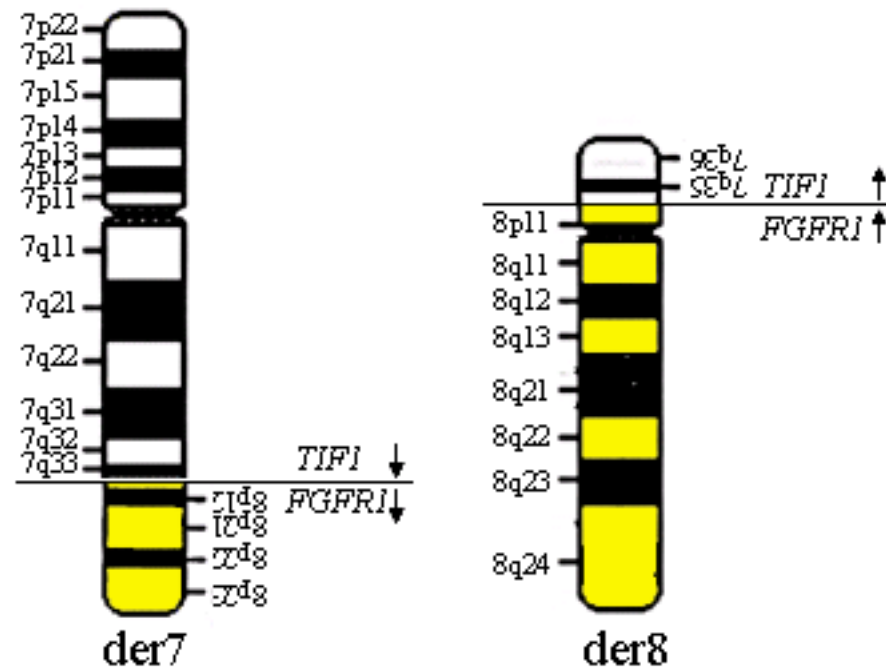


4. PROGETTO GENOMA e MALATTIE GENETICHE

c. Identificazione del gene coinvolto --> funzione

Dalla citogenetica al gene:

clonaggio di una traslocazione in LAM (leucemia acuta mieloide)

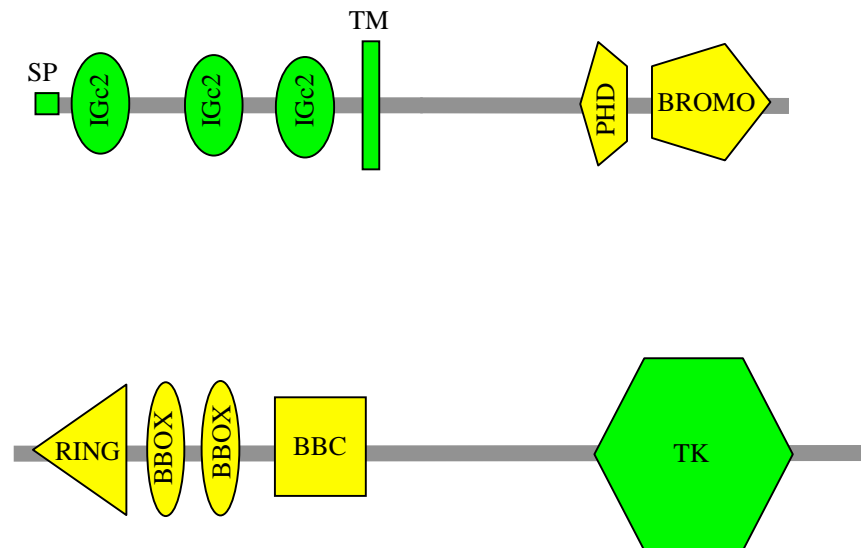


4. PROGETTO GENOMA e MALATTIE GENETICHE

c. Identificazione del gene coinvolto --> funzione

Dalla citogenetica al gene:

clonaggio di una traslocazione in LAM (leucemia acuta mieloide)



E adesso?

