

Nutrigenomica = considera la relazione fra specifici nutrienti e/o la dieta e l'espressione genica. È un approccio multidisciplinare (Bioinformatica, Genetica, Biologia molecolare, Nutrizione molecolare, Farmacogenetica)

Nutrigenetica = determina come la variabilità genetica influenza la risposta alla dieta.

Nutrigenomica

Espressione genica:

- Trascrizione
 - Traduzione
 - Sintesi proteica
 - Stabilità delle proteine
- > Possono essere condizionate dall'ambiente nutrizionale

I nutrienti apportati con la dieta possono modificare direttamente o indirettamente l'espressione genica.

Applicazione delle tecnologie omiche al fine di studiare come i nutrienti influenzano l'espressione dei geni.

GENOMICA = DNA

TRANSCRITTOMICA = mRNA

PROTEOMICA = proteine

METABOLOMICA = metaboliti

Espressione genica e metabolismo sono influenzati dai fattori ambientali e assunzione alimenti, e a loro volta influenzano fabbisogni nutrienti, genoma e da questi fattori dipende salute e malattia. Influenza della dieta a livello del trascritto.

- Sviluppo di diete o alimenti corrispondenti al genotipo
- Selezione accurata dei nutrienti in base ai geni
- Ruolo della nutrizione nella gestione negli animali da reddito (latte, carne, lana)
- Interazione nutriente-gene
- Comprensione del processo di invecchiamento
- Nutrigenomica e sistema immunitario
- Nutrigenomica e Patologie
- Nutrigenomica e Riproduzione

Es sostanze ossidanti e antiossidanti influiscono sull'espressione genica (a livello proteico attivano, interazione con recettori, fattori trascrizionale, attività enzimatica, fosfatasi)

EPIGENETICA

- Studia i meccanismi che possono influenzare l'espressione di alcuni geni
- Legata alla configurazione del DNA ed al suo assemblamento e non alla sua composizione genica
- Esempio : assemblamento della cromatina, mediazione di alcune basi

INTERAZIONE NUTRIENTE — GENE

GENI -----> NUTRIENTI
NUTRIGENETICA

GENI <----- NUTRIENTI
NUTRIGENOMICA

- La nutrigenetica studia il polimorfismo dei geni associato al metabolismo dei nutrienti
- La nutrigenomica studia l'effetto dei nutrienti sul DNA

EFFETTO DIRETTO O INDIRETTO DEI NUTRIENTI SULL'ESPRESSIONE GENICA

A livello cellulare i nutrienti possono:

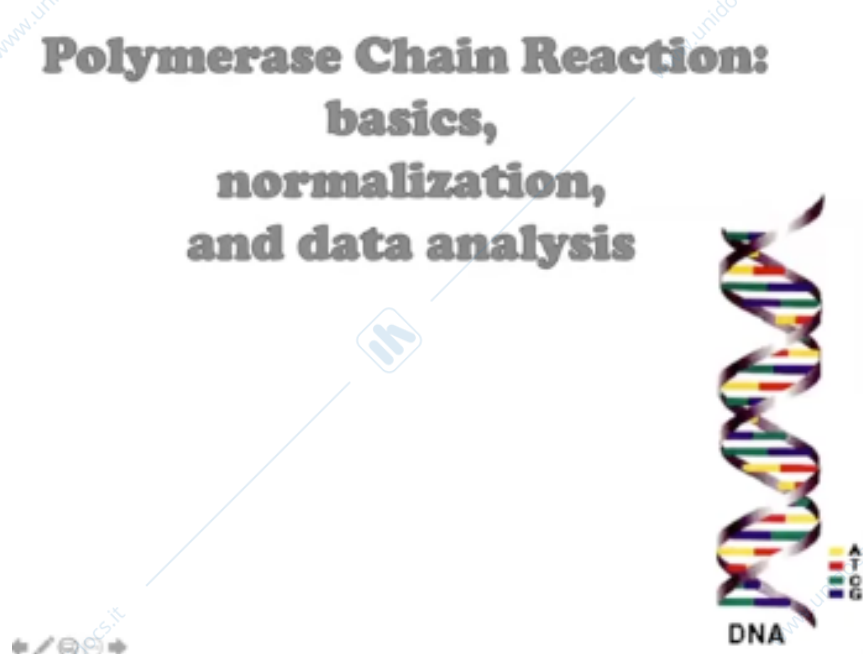
- Agire come legando per recettori di fattori di trascrizione
- Essere metabolizzati da vie metaboliche primarie o secondarie e perciò alterare la concentrazione di substrati e intermedi
- Influenzare positivamente o negativamente le vie di traduzione di segnali cellulari

Nutriente = grassi

Composto = acidi grassi e colesterolo

Fattori trascrizione = PPARs: recettori per fattori di trascrizione legati al metabolismo
Cellulare: SREBPs

Lezione del 29



La Dna polimerasi è un enzima che ripara e replica il DNA e attacca nuovi nucleotidi al finale 3, partendo da un primer.

Primer = un oligonucleotide breve (15-30 paia di basi), che ha una sua specificità di legame perchè è complementare alla catena di DNA o DNA COMPLEMENTARE.

Questi primer devono essere in doppio perchè lavorano sulle due eliche (uno va in un senso e uno nel senso opposto).

Primer devono essere complementari al filamento e attraverso la DNA POLIMERASI vengono aggiunti nuovi nucleotidi e quindi nuovo DNA.

I vari cicli che abbiamo della PCR sono:

- denaturazione = innalzamento intorno ai 98 gradi per 20-30 secondi in cui viene denaturato (aperto) il filamento
- Annealing = abbassamento temperatura a 50-65 gradi per 20-40 secondi che permette l'accoppiamento dei primer
- Amplificazione = innalzamento della temperatura a 72 gradi

Poi si ripete il ciclo n volte in modo di amplificare queste sequenze specifiche che vogliamo andare a produrre.

PCR ci serve per riprodurre e replicare DNA, ma anche per quantificare l'espressione genica ovvero la quantità di mRNA che abbiamo in cellule.

Partendo dall'RNA attraverso la trascrittasi inversa viene prodotto il DNA complementare (complementare del RNA estratto).

Il DNA complementare è decisamente più stabile e facile lavorarci e a partire da questo si fa la PCR.

La cosa importante è che si ha un aumento della produzione di DNA in base ai cicli che si possono produrre (inizialmente crescita lenta poi aumento esponenziale simile a una sigmoide e infine si raggiunge un plateau).

In base ai quantitativi di RNA E DNA COMPLEMENTARE ho sempre curve sigmoidi ma richiedono più cicli per amplificare il prodotto o meno se il quantitativo è elevato.

Dopo una serie di cicli si arriva ad avere quantitativi di prodotto.

Se vado a interrompere a diversi quantitativi ottengo risultati diversi. La curva è sempre la stessa ma a seconda del quantitativo di RNA e DNA COMPLEMENTARE, richiede più cicli per amplificare il prodotto se il quantitativo è poco o meno se il quantitativo è più elevato.

Dobbiamo individuare un punto che ci permetta di confrontare i nostri campioni e questo punto va individuato quando la curva comincia a salire e individuo il valore di cicli presente sull'ascissa (sulle ordinate è presente la concentrazione di substrato), che mi serve per valutare l'espressione del gene.

Parlando di Real time PCR abbiamo due tecniche fondamentali:

- SYBER GREEN = che dipende dal tipo di componente fluorescente utilizzato nella reazione. Non è specifico, semplicemente si lega a qualsiasi catena di DNA. Ogni volta che si interrompe un ciclo vado a leggere all'interno del pozzetto la quantità di luce emessa e posso quantificare il quantitativo di DNA prodotto.

Il problema sorge quando il primer non è perfetto o succedono cose durante la reazione per cui si crea DNA che non rappresenta il mio gene di riferimento. Si può risolvere il problema con le curve di dissociazione che si manifestano a temperatura ben definita, quindi controllo quella del mio gene e valuto se il prodotto è realmente riferito a uno o più prodotti (se la curva ha più picchi e non ha la temperatura di dissociazione del mio prodotto non va per niente bene)

- TAQMAN = viene creata una probe che ha legato due particelle che emettono luce. Il meccanismo prevede che quando le due particelle che hanno un'emittenza di luce e onde diverse sono legate alla probe (creata per appaiarsi al gene di riferimento) si annullano e non emettono luce.

La probe si appaia al suo complementare all'interno del DNA complementare e quando arriva la Polimerasi taglia questo filamento così da liberare le due componenti luminose che potrà essere rilevata dal sistema di fotometria che è all'interno del termociclatore.

Ogni pozzetto viene triplicato per avere una maggior sicurezza del dato analitico.

Ogni campione avrà 3 pozzetti utilizzati per un gene e ogni gene viene sviluppato in 3 pozzetti → 1 gene per 1 campione

Problematiche:

- Metodo utilizzato = tipo di tecnica utilizzata

- Disegno dei primer = molto più critico se usiamo la tecnica del SYBER GREEN. Bisogna avere sequenze genomiche consolidate e disegnare primer che interessino le zone di legame con gli esoni in modo tale da non considerare le parti introniche che vengono eliminate che io nell'mRNA non le trovo.

BLASTING = arriva il primer e faccio un pool su RNA o DNA COMPLEMENTARE perché mi interessa se nei miei campioni il gene viene espresso e faccio la PCR ovvero un gel e identifico una banda che ci dà un primo segnale se quel primer produce qualcosa e se si vedono due bande è da scartare perché identifica più di una sequenza e abbiamo perso di specificità. Poi si prende il prodotto e si sequenzia per valutare in maniera univoca se quel prodotto amplificato è quello cercato, valutando la sequenza di basi di nucleotidi che ci arriva con database utilizzati per crearlo e qui abbiamo la mappa visuale. Una volta che il prodotto è stato sequenziato, incolliamo la sequenza in questi software che cercano di accoppiare quella sequenza con i database che hanno caricati e ci danno un risultato espresso in percentuale (Blast = match fra il primer e il genoma dell'animale scelto) → es. quella sequenza è simile a quel dato gene per il 99% → il primo gene che ci aspettiamo sarà quello per cui abbiamo costituito il primer)

- Quantificazioni = ci sono alcuni metodi.

DELTA TC = metodo basilare che non è il migliore per sensibilità ridotta, che utilizza il numero di cicli; dovrebbe essere corretto per la stessa efficienza di espressione e reazione in base al gene che sto andando a valutare e l'internal control gene. Si fa 2 elevato al delta dei cicli del gene di

nostro interesse - i cicli dell'internal control gene testato sullo stesso campione. Inoltre si fa il delta ct del campione - il delta ct del controllo

STANDARD CURVE= metodo più affidabile. Create in ogni piastra per ogni gene una standard curve—> si fanno diluizioni seriali che si fanno con un pool dei campioni che si sta utilizzando e poi si valuta l'espressione che si ottiene all'interno di questi campioni. Riscontreremo una distanza equa e in base a questo viene fatto il calcolo dell'espressione e quindi vengono calcolati i tesor ovvero i valori di riferimento e in base alla standard curve avremo i valori secondo i quali vengono espressi.

R quadro di 0,99 ottimo risultato. Ogni campione avrà un replicato.

3 pozzetti e 3 valori del replicato tecnico. Poi si fa un analisi qualitativa dei risultati dove si utilizzerà una media e prima si va a valutare se è necessario fare un check delle variazioni all'interno delle triplette per evidenziare eventuali errori andando a vedere il coefficiente di variazione per decidere se è accettabile la variazione all'interno del triplicato—> se superiore al 10% qualcosa andrà tolto.

- Controllo qualità dei dati
- Procedure normalizzazione = errori del gruppo controllo e del gruppo trattato come diverso numero di cellule e alla fine potremmo avere differenza di espressione gene da una parte e dall'altra dovuta a errori interni (contare le cellule e misurare il DNA).

INTERNAL CONTROL GENE = sono geni che devono avere la caratteristica che la loro espressione non deve essere influenzata dal trattamento o dallo stato fisiologico per cui si utilizzano geni che fanno parte del metabolismo basale della cellula che non risentono di queste cose, e questo permette di raggiungere, di normalizzare quel dato che poteva essere diverso. Molto spesso vengono utilizzati gene actina e GAPDH o geni identificati basali. Si prende il target gene e si divide per il risultato ottenuto del gene di riferimento. È necessario nell'analisi inserire questi geni di riferimento nella piastra e questo occupa spazio nella piastra.

È stato proposto un metodo per cui è stato sviluppato un algoritmo che sceglie i migliori internal control gene, che valuta non i più usati ma un pool di geni, individuando i geni più stabili e quelli meno stabili, per quel campione o geni che si stanno analizzando.

All'aumentare il numero degli internal control gene ci dice quale sarà il top del valore cercato. Poi si fa la media geometrica degli internal control gene trovati come i più stabili e si normalizza tutta l'espressione degli altri geni che ci interessano.

- Analisi del dato

N.B.

Curva di dissociazione= c'è una temperatura e si ha una curva per ogni campione e se è giusto devono essere sovrapponibili. Se ci fossero due picchi è errata. Serve per confermare che quel primer lavora bene, ha un'espressione univoca per tutti i campioni (1 solo prodotto che ha questa caratteristica di temperatura dissociazione)