

## Tecniche di laboratorio per lo studio di modelli cellulari e molecolari

Roberto Bresciani

*Dipartimento di Medicina Molecolare e Traslazionale  
Università degli Studi di Brescia*



Biologia cellulare  
Biologia dei tumori

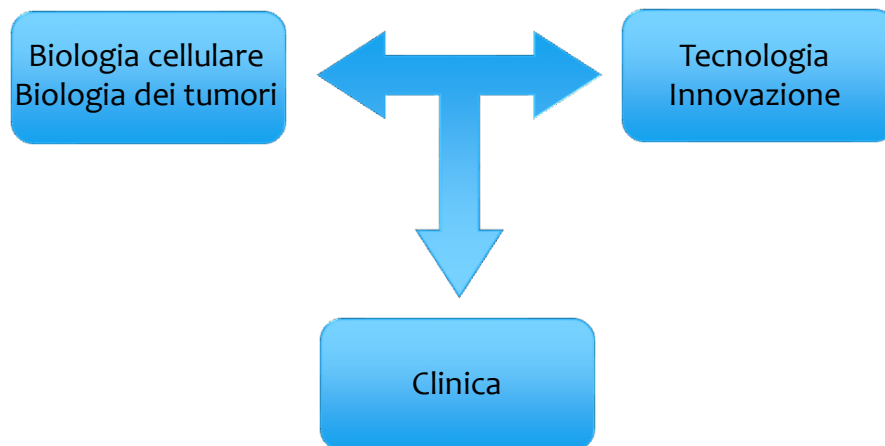
Nuove conoscenze della  
biologia dei tumori, anche a  
livello molecolare



Tecnologia  
Innovazione

Sviluppo di nuovi sistemi  
ad elevato contenuto  
tecnologico

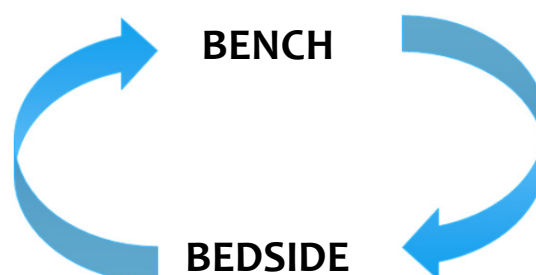
## Metodi e sistemi per lo studio della biologia dei tumori per un approccio traslazionale



Trasferire i risultati e le informazioni provenienti dal laboratorio verso l'attività clinica e viceversa

Sistema di integrazione delle informazioni e dei saperi

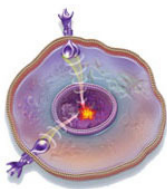
Nuovo approccio di **medicina traslazionale** rappresenta il futuro della ricerca e una sfida alla quale difficilmente ci si può sottrarre (from bench to bedside and backwards)



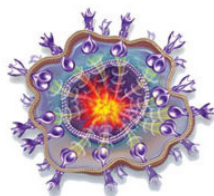
Sviluppo di **sistemi innovativi** che sfruttano metodologie basate sulle più recenti acquisizioni in campo della biologia dei tumori e che garantiscano **accuratezza**, **precisione** ed elevata **sensibilità** nell'identificazione e nella determinazione di **marcatori biologici** importanti per una diagnosi accurata e precoce ma anche delle caratteristiche molecolari del tumore (variabilità genetica) e della risposta al trattamento farmacologico e/o radioterapico

**Sistemi cellulari normali**  
**Sistemi cellulari tumorali**

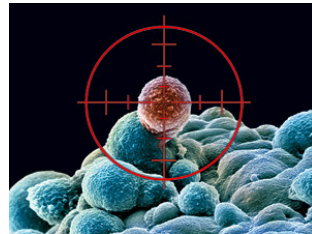
Normal cell



Example of one type of abnormal or cancerous cell



**Cellule staminali tumorali**



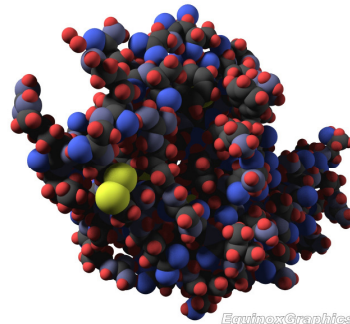
**Sistemi/organismi animali modello**



## Marcatori

### Proteine:

enzimi, antigeni tumore-specifici,  
marcatori di proliferazione, etc.



### DNA/RNA:

genoma, trascrittoma, epigenetica,  
non coding DNA, miRNA, etc.



## Proteine come markers:

variazioni nell'espressione tissutale (IHC)

variazioni nei livelli di espressione (IHC, ELISA, WB)

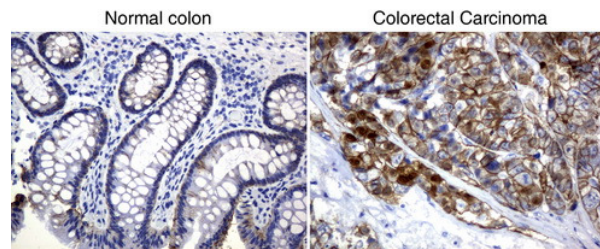
variazioni e modificazioni post-traduzionali (WB)

Lo sviluppo di **tecniche immunobiologiche** ha dato un enorme impulso alle conoscenze nell'ambito della biologia dei tumori. La disponibilità di **anticorpi specifici come reagenti biologici** ha infatti consentito lo sviluppo di metodi come l'immunoistochimica (IHC), l'ELISA o il Western-blot.

Le tecnologie che si basano su **anticorpi primari specifici** e anticorpi secondari specie-specifici **coniugati**.

Grazie all'industria biotecnologica gli anticorpi possono essere coniugati con enzimi che trasformano un substrato in prodotto colorato e quindi visibile che può essere insolubile e quindi precipita come nel caso di IHC.

Di solito non basta un singolo marcatore quindi si usa un pannello di marcatori.

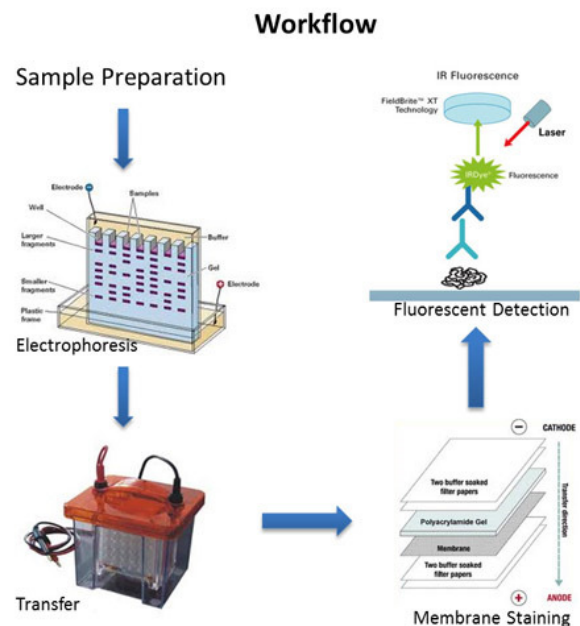


In IHC ci si basa sull'attribuzione di score di positività che però sono per lo più arbitrari e comunque semiquantitativi.

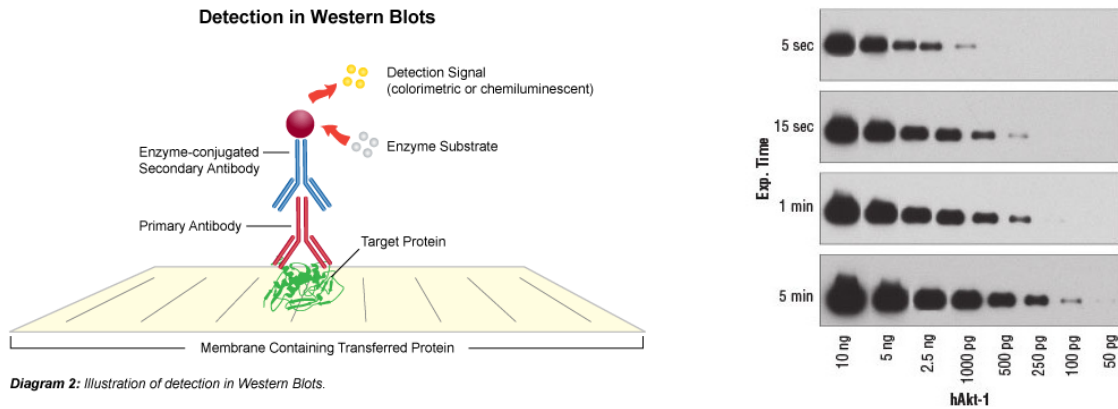
Un metodo di analisi delle proteine è il **Western blot** che permette l'identificazione di una proteina all'interno di una miscelanea di molecole

Si basa sulla

- separazione delle proteine in base al peso molecolare (SDS-PAGE)
- trasferimento delle proteine su supporto idoneo e maneggevole come una membrana di nitrocellulosa o PVDF
- riconoscimento molecolare immunospecifico di una sola proteina mediante anticorpi specifici

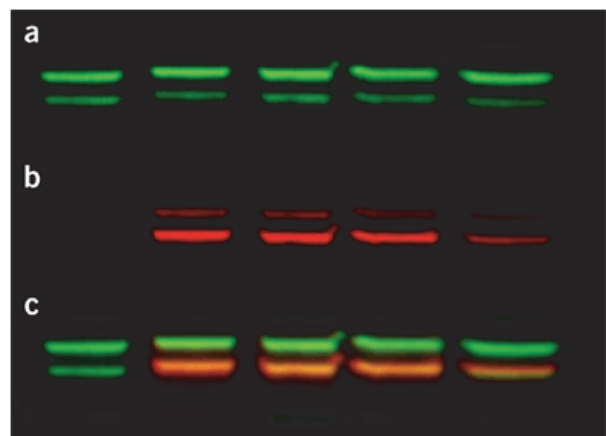


Anche in questo caso gli anticorpi possono sviluppare una **reazione cromatica** con deposizione del prodotto di reazione o alternativamente gli anticorpi possono essere coniugati a enzimi che trasformano un substrato il cui prodotto è **luminescente** e quindi emette energia tale da impressionare una lastra fotografica



L'acquisizione del segnale luminoso può avvalersi sia di lastre sia mediante telecamera ad alta sensibilità in camera oscura.  
Alternativamente gli anticorpi secondari possono essere coniugati con diversi **fluorofori** che emettono luce in seguito all'eccitazione con luce a diverse lunghezze d'onda.

Questo approccio aumenta in maniera considerevole la **sensibilità** del sistema quindi bastano pochi nanogrammi di proteina per poter essere evidenziata.



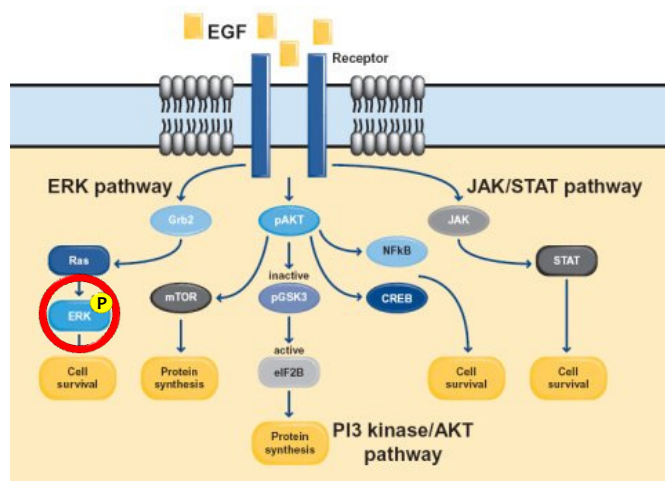
I risultati possono essere acquisiti e salvati in formato digitale dai quali è possibile fare una **determinazione semiquantitativa relativa** dell'intensità dei segnali.

La quantizzazione non può essere assoluta dal momento che non è una misura diretta della proteina/antigene.

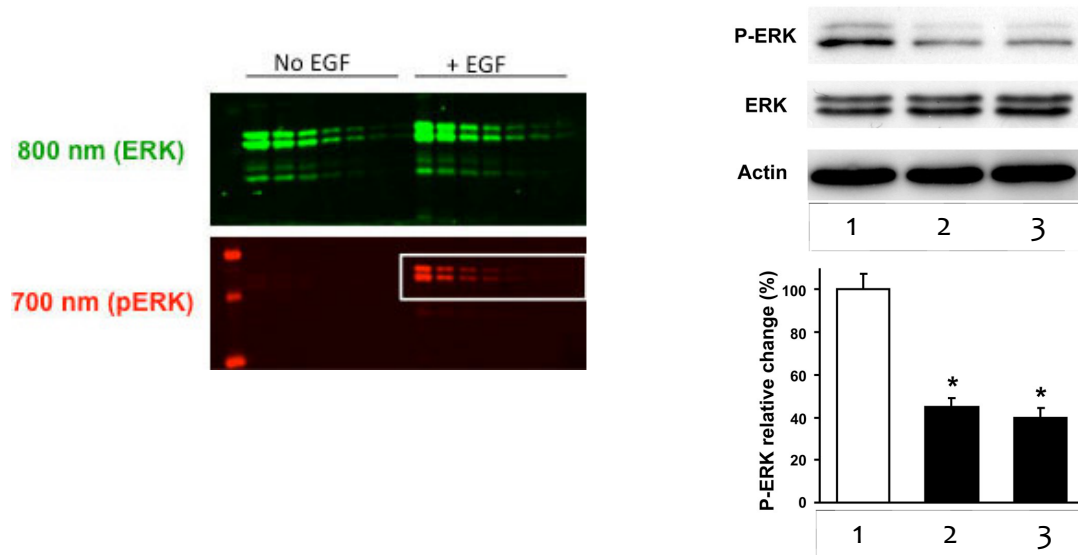
L'applicazione della metodologia è di particolare utilità per esempio quando si vogliono osservare **modificazioni specifiche post-traduzionali** delle proteine come la fosforilazione in specifici residui aminoacidici di molecole effettrici di fattori di crescita.

Esempio di ERK come molecola a valle della trasduzione del segnale di EGF.

Il rapporto di **p-ERK/total-ERK** è per esempio determinante per l'attivazione di meccanismi cellulari a cascata che portano per esempio all'aumento della proliferazione cellulare, all'attivazione di meccanismi di resistenza all'apoptosi, alla trascrizione di geni che favoriscono la sopravvivenza cellulare.



## Analisi del rapporto pERK/tERK



The Power of Biology  
Brescia, 8<sup>th</sup> - 9<sup>th</sup> October 2015

NATURE METHODS | VOL.11 NO.7 | JULY 2014 |

## Single-cell western blotting

Alex J Hughes<sup>1,2,6,7</sup>, Dawn P Spelke<sup>1-3,7</sup>, Zhuchen Xu<sup>1,2</sup>, Chi-Chih Kang<sup>1,2</sup>, David V Schaffer<sup>1-5</sup> & Amy E Herr<sup>1-3</sup>



Gli sviluppi più recenti riguardano l'analisi molecolare del **DNA** e dell'**RNA**

Modificazioni genetiche possono avere **valore predittivo** o permettere di identificare pazienti che hanno una maggiore **predisposizione** al tumore.

Inoltre possono determinare una maggior **sensibilità al trattamento farmacologico**

## Modificazioni genetiche

1. Variazioni di singolo nucleotide (Single nucleotide variation, SNV)  
“missense” (non-sinonime), “silent” (sinonime) or “non-sense”

2. Inserzioni e delezioni (indels)  
nuovo “frame” o “in frame”

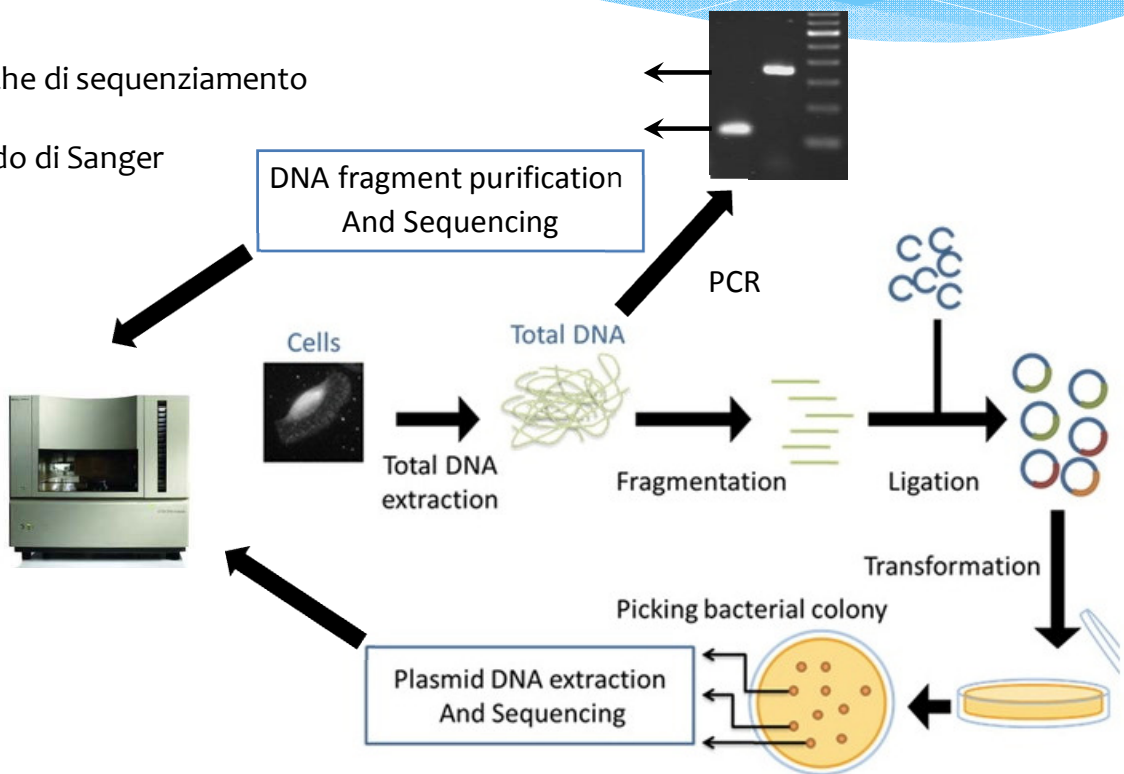
3. Variazioni strutturali e del numero di copie (copy number variations, CNV)  
Riarrangiamento strutturali come inversioni e traslocazioni, duplicazioni e variazione nel numero di copie di un gene (CNV)

### 4. Polimorfismo

Polimorfismo è la variazione della sequenza di un tratto di DNA rispetto alla sequenza comunemente presente nella popolazione. Una variazione genetica o un polimorfismo devono essere rappresentati con una frequenza > 1% nella popolazione.

Tecniche di sequenziamento

Metodo di Sanger

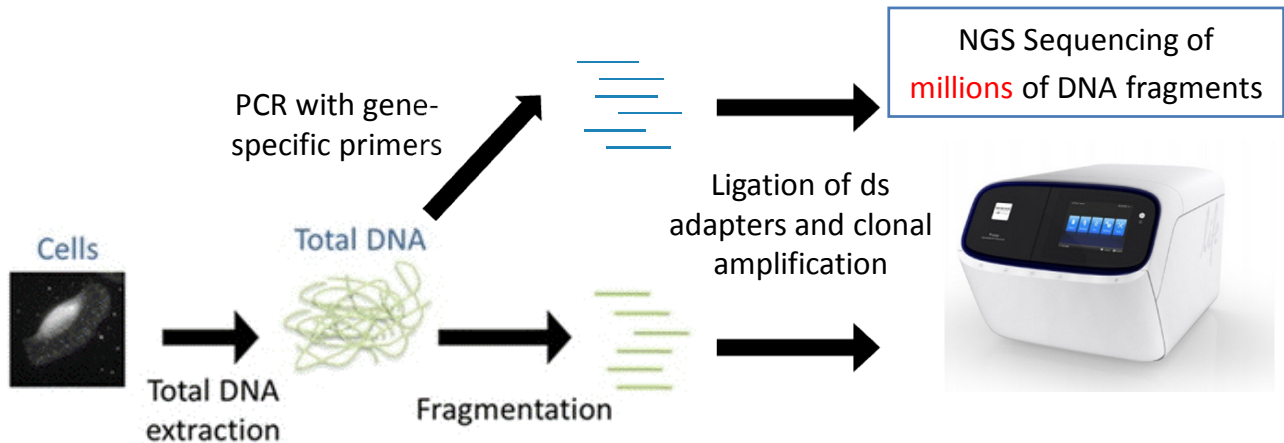


Tecniche di sequenziamento

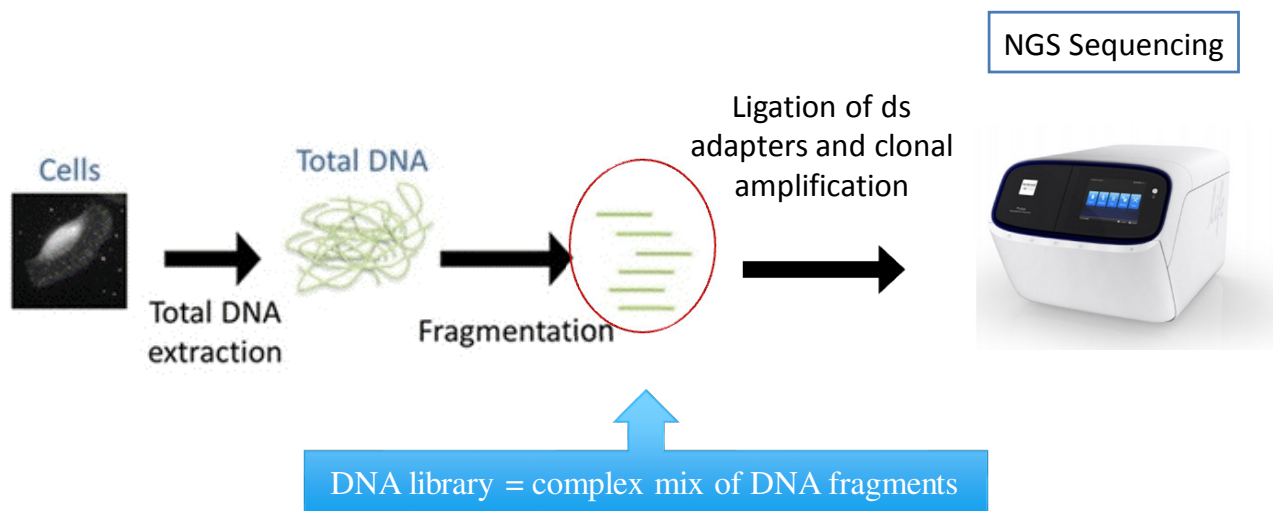
### Next generation sequencing (NGS)

I sistemi NGS sono sistemi/piattaforme tecnologiche in grado di **sequenziare milioni di piccolo tratti di DNA** o frammenti di DNA nello stesso momento (**metodo in parallelo**) aumentando in maniera drastica la mole di dati e informazioni (**high throughput**).

L'approccio NGS denominato "Amplicon-based sequencing" richiede una PCR con primer che si appaiano alle regioni di DNA di interesse per generare una libreria di DNA. L'approccio "Amplicon-based sequencing" è veloce ma restituisce informazioni limitate alla regione di DNA di interesse.



L'approccio NGS denominato "Hybridization-capture" consente l'analisi di sequenza di tratti di DNA molto più lunghi senza il limite di dover conoscere a priori la regione di interesse.



Siamo già pronti ad accogliere la “**terza generazione**” di NGS che presenta piattaforme che possono esimersi dall’amplificazione mediante PCR dei frammenti di DNA e necessitano di un minor quantitativo di materiale biologico.

### Interpretazione dei dati

La tecnologia NGS genera un’enorme mole di dati: i file generati dalla sequenza dell’esoma di un individuo sono di circa **8 Gb** mentre la sequenza dell’intero genoma è pari a **150 Gb**.

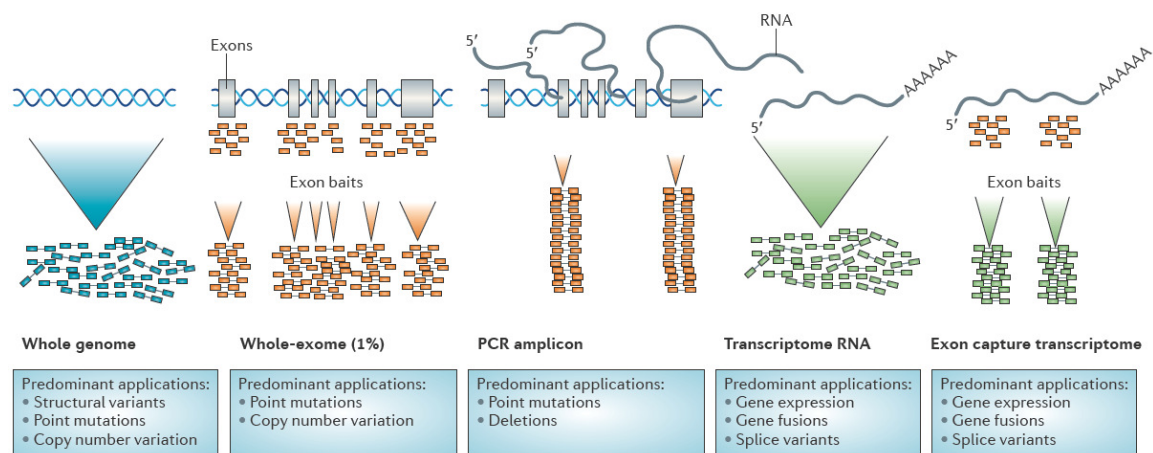
E’ quindi prioritaria la disponibilità di **strumenti informatici** adatti, di **software** disponibili e di **esperti bioinformatici** in grado di gestire e elaborare una tale mole di dati.

### Applicazioni di NGS

Whole genome sequencing (**WGS**) riguarda il sequenziamento **dell’intero genoma**. Il peso della presenza di mutazioni in regioni introniche dei geni è spesso di difficile interpretazione dal punto di vista clinico. Inoltre, nonostante possa sembrare il miglior approccio, spesso alcune varianti possono non essere evidenziate a causa dell’enorme regione del genoma che si sequenzia (la totalità).

Whole exome sequencing (**WES**) riguarda l’analisi **esclusiva dell’esoma** (regioni codificanti del genoma). Mutazioni negli esoni possono determinare anomalie strutturali, e quindi funzionali, delle proteine più facilmente interpretabili rispetto a mutazioni introniche.

Importante la **validazione** dei dati dal punto di vista biologico.



## The Power of Biology Brescia, 8<sup>th</sup> - 9<sup>th</sup> October 2015

La tecnologia NGS sta avendo largo uso anche nella determinazione delle varianti genetiche dei tumori al fine di realizzare il miglior trattamento farmacologico possibile in relazione al setting genetico dei pazienti (**farmacogenomica**).

Due enti importanti come **The Cancer Genome Atlas (TCGA)** e l'**International Cancer Genome Consortium (ICGC)** hanno realizzato un progetto internazionale su base collaborativa per il sequenziamento WGS e WES di coorti di pazienti affetti da diverse forme di tumori (leukemia, glioblastoma).

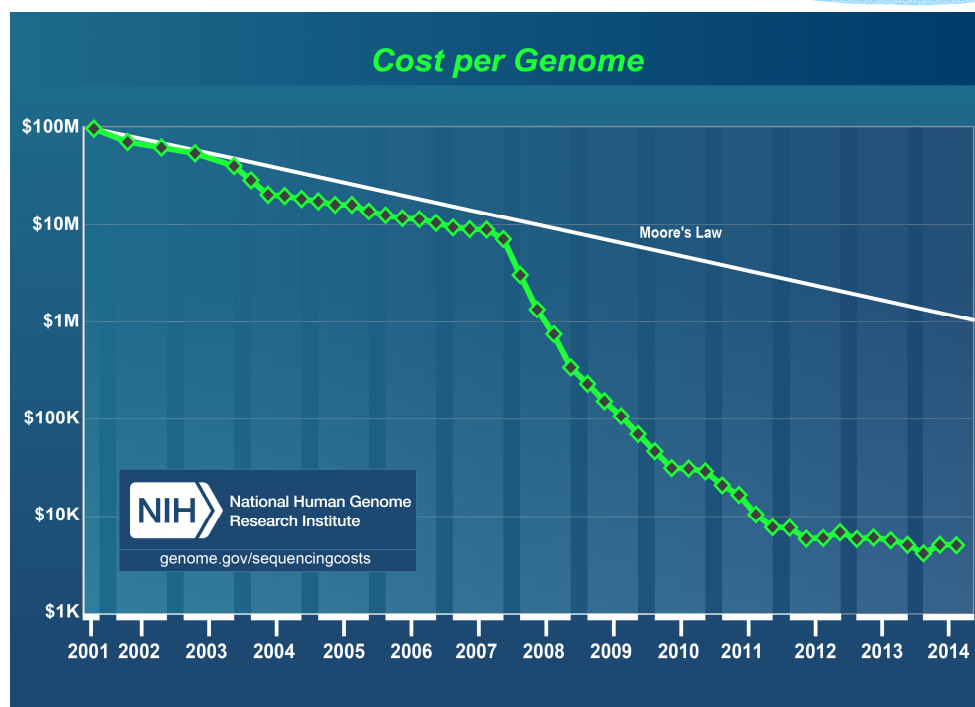
La tecnologia NGS può essere utilizzata per sequenziare anche **RNA** (RNA-Seq). Inoltre può essere utilizzata per studiare **fenomeni epigenetici** che coinvolgono modificazioni delle basi che costituiscono il DNA, in particolare nelle regioni promotore della trascrizione di geni specifici.

Le **sfide** a cui NGS è chianti:

**Abbattimento dei costi** delle strumentazioni e dei reattivi  
**Figure professionali altamente specializzate**

Ci sono volute più di 10 anni di lavoro e circa US \$3 billion per avere il primo sequenziamento del genoma umano mediante sequenziamento di Sanger.

Oggi è possibile sequenziare l'intero genoma umano in meno di 24 ore ad un costo di circa US \$1,000





Contents lists available at ScienceDirect

## Critical Reviews in Oncology/Hematology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/critrevonc](http://www.elsevier.com/locate/critrevonc)



Review

### Understanding next generation sequencing in oncology: A guide for oncologists

Sing Yu Moorcraft, David Gonzalez, Brian A. Walker\*

The Royal Marsden NHS Foundation Trust, Surrey, United Kingdom

## Esosomi

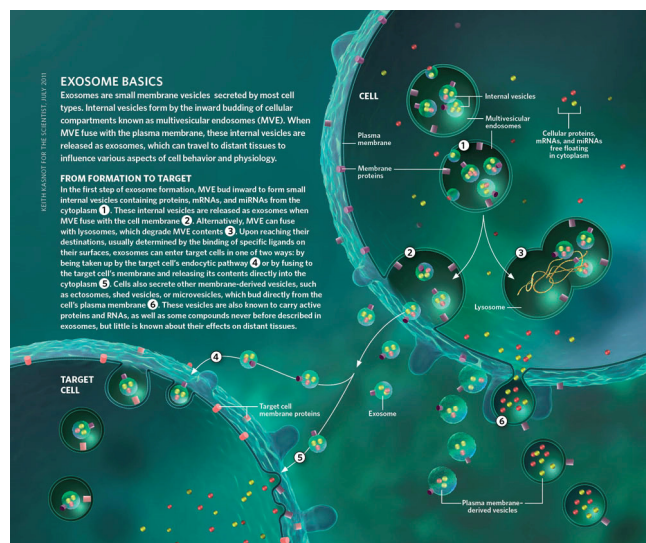
Vescicole secrete contenenti

Proteine

Lipidi

RNA

Meccanismo di comunicazione cellulare



Seminars in Cell & Developmental Biology 40 (2015) 17–26



Contents lists available at ScienceDirect

Seminars in Cell & Developmental Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/semcdb](http://www.elsevier.com/locate/semcdb)



Review

Extracellular vesicles in the biology of brain tumour stem cells –  
Implications for inter-cellular communication, therapy and biomarker  
development



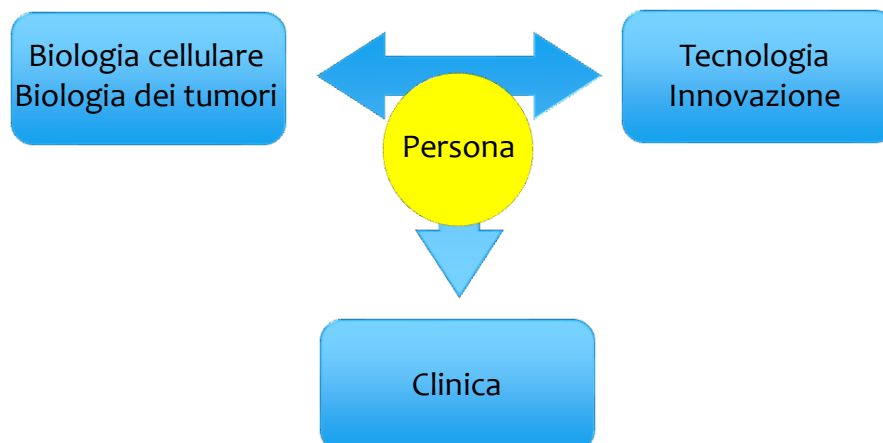
Intercellular transfer of the oncogenic receptor  
EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells

Khalid Al-Nedawi<sup>1</sup>, Brian Meehan<sup>1</sup>, Johann Micallef<sup>2</sup>, Vladimir Lhotak<sup>2</sup>, Linda May<sup>2</sup>, Abhijit Guha<sup>3</sup> and Janusz Rak<sup>1,4</sup>

nature  
cell biology

NATURE CELL BIOLOGY VOLUME 10 | NUMBER 5 | MAY 2008

Metodi e sistemi per lo studio della biologia dei tumori per un  
approccio traslazionale





**The Power of Biology**  
**Brescia, 8<sup>th</sup> - 9<sup>th</sup> October 2015**