

# Identificazione di geni attivamente trascritti in organismi di riferimento dell'ambiente lagunare

Paola Venier, Alberto Pallavicini, Cristiano De Pittà, Gerolamo Lanfranchi

Responsabili 3.6, 2.1.4

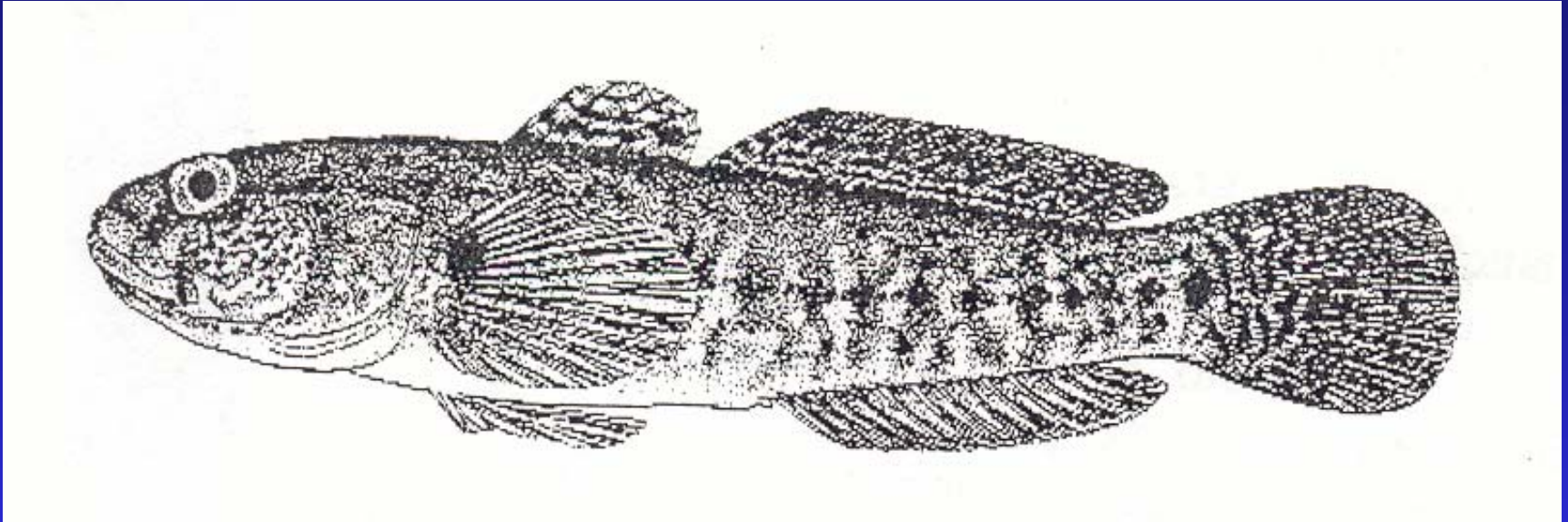
Danilo Mainardi, Paolo M. Bisol



UNIVERSITA' DI PADOVA  
Dipartimento di Biologia  
Centro Ricerche  
Interdipartimentale  
Biotechnologie innovative



*Zosterisessor ophiocephalus* (Pallas, 1811)



*Mytilus galloprovincialis*

(Lamarck, 1819)



<http://www.fauna.is/Pages/archves/inverteb/kraeklingur.jpg>

# Z. ophiocephalus

---

organismo bioindicatore...

- Livingstone et al., 1995
- Venier et al., 1996 e 1999
- Corsi et al., 2003
- Tallandini et al...
- ...



verso Pt.o Lido



verso Marghera



(nucleasi P1)

(butanolo)

**Addotti al DNA**  
**in *Z. ophiocephalus***  
**(UniPD/MAV/CVN, 1998/1999)**



UNIVERSITA' DI PADOVA  
Dipartimento di Biologia  
Centro Ricerche  
Interdipartimentale  
Biotecnologie innovative



# Z. ophiocephalus

---

...ma anche modello di studio

- Pastres et al., 2002
- Pilastro et al., 2002
- Bisol et al...



Le risposte biologiche individuali  
dipendono dall'espressione  
regolata di geni...

...ma di quali informazioni  
disponiamo per le specie  
lagunari?



# National Center for Biotechnology Information (Marzo 2002 – Marzo 2003)

Nucleotide	Protein
5600687-6589772	179571-171206 <a href="#">Homo sapiens</a>
337972-372849	39281-59612 <i>Drosophila melanogaster</i>
264871-519155	83979-113898 <i>Arabidopsis thaliana</i>
217099-221207	62105-65654 <i>Caenorhabditis elegans</i>
19340-21561	32283-32433 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
2253-2369	447-481 <i>Mus musculus domesticus</i>
1743-74715	1101-1293 <i>Oncorhynchus mykiss</i>
407-465	8577-9483 <i>Escherichia coli K12</i>
342-559	293-508 <i>Mytilus edulis</i>
170-364	129-157 <a href="#">Mytilus galloprovincialis</a>
3-3	2-2 <a href="#">Zosterisessor ophiocephalus</a>



# Zosterisessor ophiocephalus

~ 2 pg DNA (2C) in 2x23 cromosomi

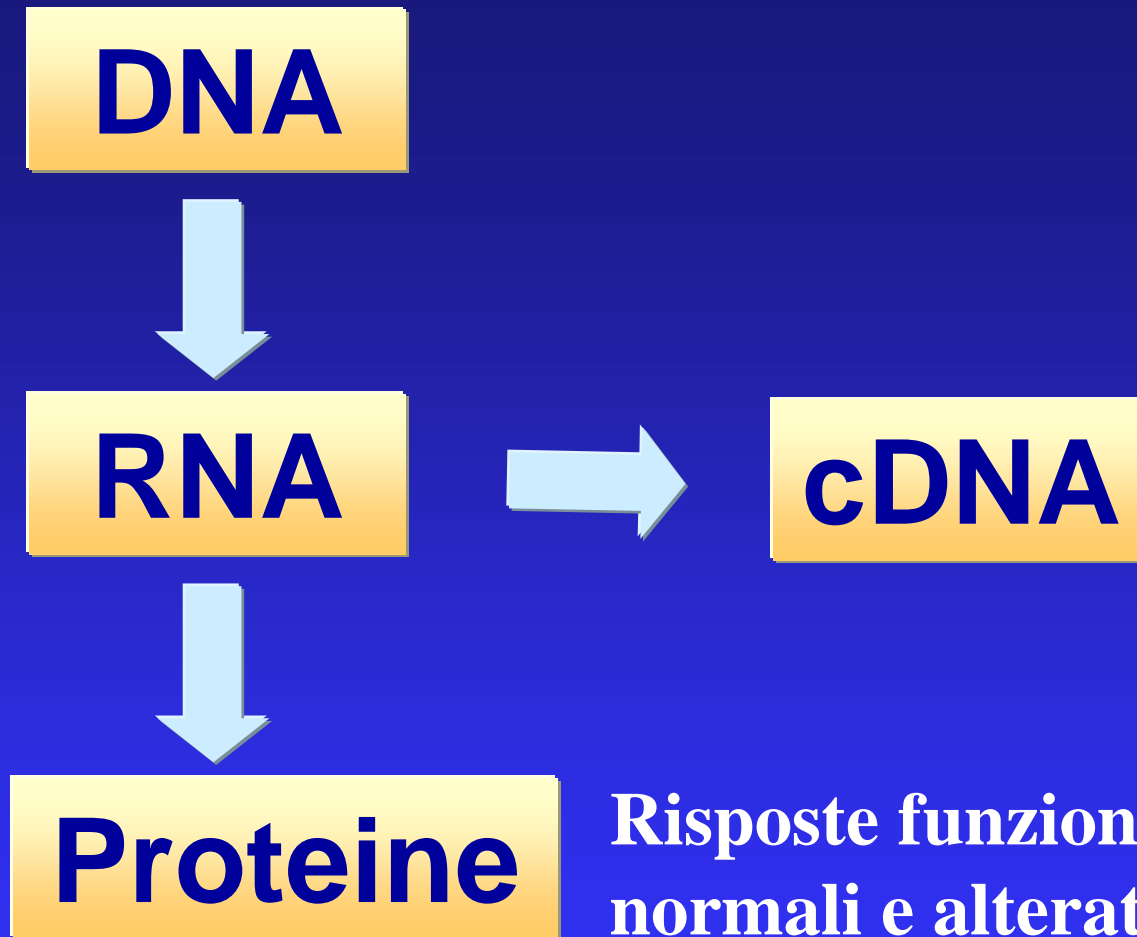
... geni?

A. Libertini, comunicazione personale nell'ambito del progetto  
Co.Ri.La. (2003)



UNIVERSITA' DI PADOVA  
Dipartimento di Biologia  
Centro Ricerche  
Interdipartimentale  
Biotecnologie innovative





**Risposte funzionali in condizioni normali e alterate**



## Costruzione di una collezione di geni attivamente trascritti in RNA



(ESTs, etichette di singoli trascritti genici)

1. **Produzione di librerie 3'-terminali di cDNA**
2. **Sequenziamento sistematico di ESTs di 400-600 pb**
3. **Costruzione di un archivio fisico di cloni batterici contenenti il cDNA d'interesse (attualmente 768 per Z. o.)**
4. **Arricchimento continuo dell'archivio e sua utilizzazione**



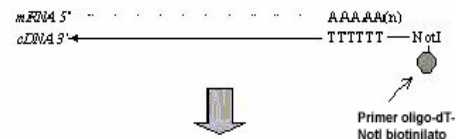
# 1. Costruzione di librerie di cDNA 3' terminali disegnate specificatamente per il sequenziamento sistematico

mRNA

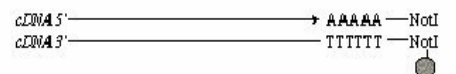


condizione, specie, tessuto

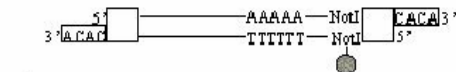
Sintesi della 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> elica di cDNA con un primer oligo-dT-NotI biotinitato



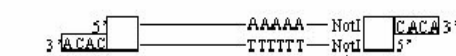
Ligazione di adattatori non palindromici BstXI al cDNA



Selezione in gel d'agarosio del cDNA (0.3-0.6 Kb) e legame dei frammenti 3' terminali alle microsfere magnetiche

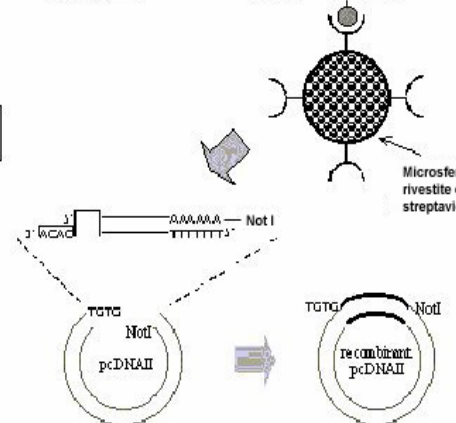


Digestione con NotI e rilascio dei frammenti di cDNA



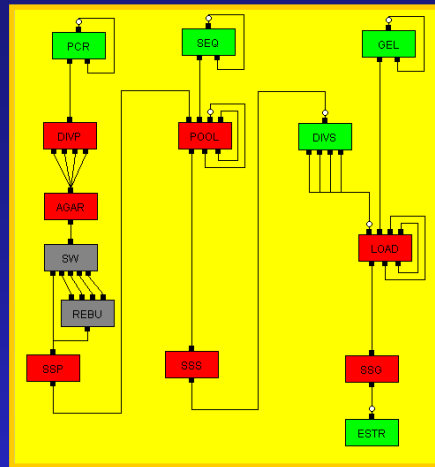
Microsfere rivestite di streptavidina

Clonaggio direzionale in pcDNAII digerito con BstXI e NotI

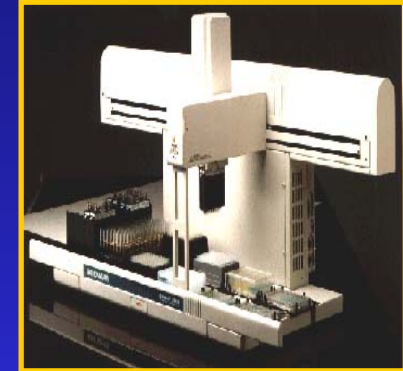


## 2. Sequenziamento sistematico di EST

ABI 3700 sequencer

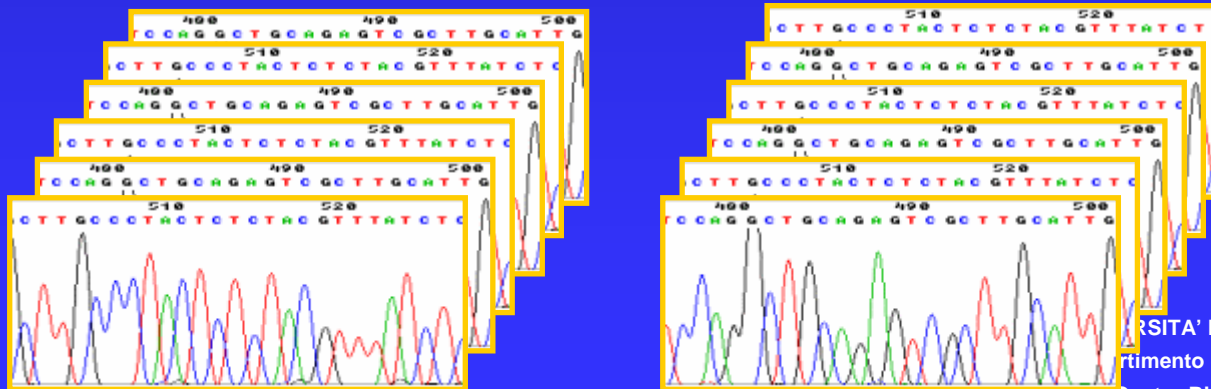


robotic stations



BIOLIM program N.E.W.

Produzione in  
larga scala di EST



UNIVERSITA' DI PADOVA  
Dipartimento di Biologia  
Centro Ricerche  
Interdipartimentale  
Biotecnologie innovative



## Apparecchiature per gestire alti numeri di campioni e reazioni



### 3. Costruzione dell'archivio fisico

mRNA



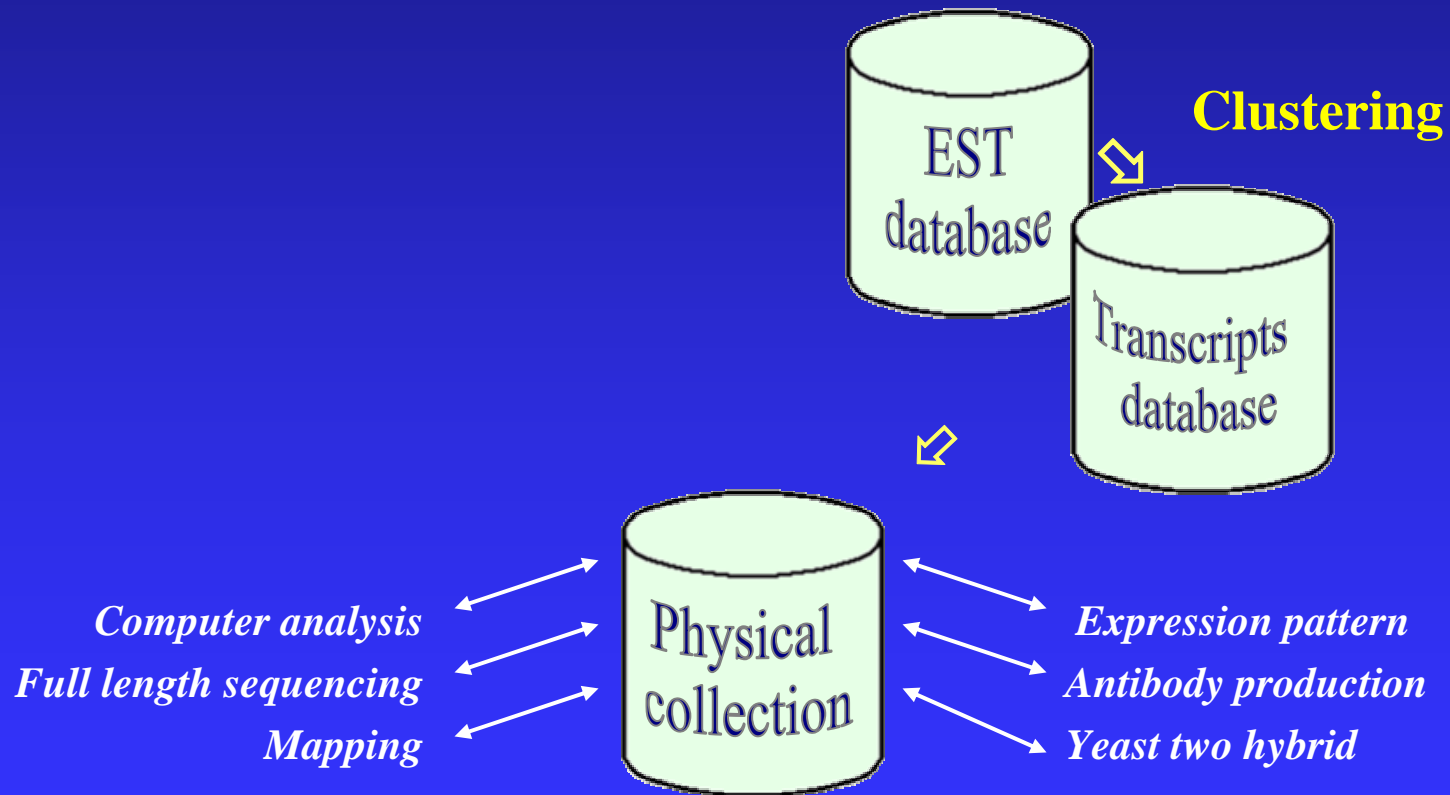
Librerie di cDNA



PCR campioni



Sequenziamento di EST



Archivio cloni



# Analisi bioinformatica

**CLUSTER**

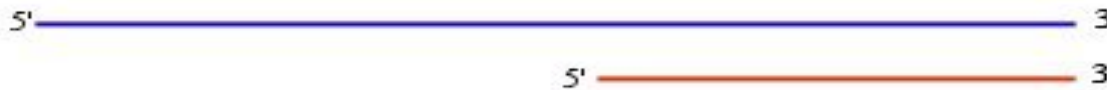


EST CMPD00001  
EST CMPD00005  
EST CMPD00013  
EST CMPD00056  
EST CMPD00087  
consenso del cluster



Sequenze dai  
database pubblici  
(EST, cDNA, geni)

**STRAIT**



consenso del cluster

# Esempio di database

STRAIT strait-596		
TRANSCRIPT INFORMATION		
Description	Homo sapiens mRNA for ZASP protein, Telethon(Italy#41)HSPD01333_FL503v2, transcript variant 2	
Comments	FL503v2; functional study (Michela Salamon - Camilla Bean); muscle(macroarray)	
Status	C	
ESTs occurrence	0.0138%	
Associated Strait Splice variants	<a href="#">597</a> <a href="#">598</a>	
Strait nucleotide sequence	sequence derived from ESTs of Human skeletal muscle project and reference sequence <a href="#">AJ133768</a> <input type="button" value="show experimental nucleotide sequence"/>	
GENE INFORMATION		
Associated Gene <a href="#">11155</a>	Gene confirmed	yes
	Gene type	gene with protein product, function known or inferred
	Gene symbol	<a href="#">ZASP</a>
	Gene name	Z-band alternatively spliced PDZ-motif
Chromosomal localization	Chromosome: <a href="#">10</a> Cytogenetic map: <a href="#">10q22.3-q23.2</a>	
PROTEIN INFORMATION		
Protein domains	<a href="#">PDZ (PDZ domain (Also known as DHR or GLGF))</a> <a href="#">LIM (LIM domain containing proteins)</a>	
Strait protein sequence	protein derived from ESTs of Human skeletal muscle project and reference sequence <a href="#">CAB46729</a> <input type="button" value="show experimental protein sequence"/>	
Protein domains and alignments details	<input type="button" value="Protein links"/>	
HOMOLOGY INFORMATION Vs. MODEL ORGANISMS		
C. elegans	Exp. value: e-55 <a href="#">see alignment</a> <input type="button" value="CE23977"/>	
D. melanogaster	Exp. value: e-57 <a href="#">see alignment</a> <input type="button" value="AE003809.1 AAF58107.1"/>	
S. cerevisiae	No similarities found	
<input type="button" value="Query"/> <input type="button" value="Home"/>		

## GENE - Query Result

Matches: 1.

### GENE # 4625

- LOCUS ..... 4625
- LOCUTYPE ... gene with protein product, function known or inferred
- CONFIRMED ... yes
- GENESYMBOL ... [MYH7](#)
- GENE NAME ... myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta
- SYNOPSIS ... Summary: MYH7 encodes the cardiac muscle beta (or slow) isoform of myosin. Changes in the relative abundance of MYH7 and MYH6 (the alpha, or fast, isoform of cardiac myosin heavy chain) correlate with the contractile velocity of cardiac muscle. Mutations in MYH7 are associated with familial hypertrophic cardiomyopathy.
- ORIGIN ..... [180760](#)
- FORMED ..... [1301139](#), [1301151](#), [1446073](#), [1691980](#), [2045411](#), [2249479](#), [2249844](#), [2362820](#), [2522082](#), [2726733](#), [2969919](#), [3032769](#), [3037493](#), [7909486](#), [8483912](#)
- VERSIONS ..... [Hs592](#)
- MAP POSITION:

14 14q12

ONTOLOGY:

category	description	type
cellular component	muscle myosin	GO
molecular function	structural protein of muscle	GO
molecular function	structural protein of muscle	EX

SEQUENCES:

Genomic sequences from Genbank:

Refseq sequences derived from manual annotation:

Nucl. Acc.	Prot. Acc.	Product	Trans. Var.
<a href="#">NM_000257</a>	<a href="#">NP_000248</a>	myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta	-

Refseq sequences derived from automatic annotation:

[XM\\_033374](#) [XP\\_033374](#)

Sequences from Genbank, EMBL, DDBJ:

Nucl. Acc.	Prot. Acc.	Origin
<a href="#">M17712</a>	<a href="#">AAA36343</a>	mRNA
<a href="#">M21665</a>	<a href="#">AAA36345</a>	mRNA
<a href="#">M25135</a>	<a href="#">AAA60384</a>	Genomic or gene
<a href="#">M25139</a>	<a href="#">AAA60383</a>	Genomic or gene
<a href="#">M27636</a>	<a href="#">AAA79019</a>	Genomic or gene
<a href="#">M57965</a>	<a href="#">AAA51837</a>	Genomic or gene
<a href="#">M58018</a>	<a href="#">AAA62830</a>	mRNA
<a href="#">XD5631</a>	<a href="#">CAA29112</a>	mRNA



## RISULTATI (*Z. ophiocephalus*, giovanile)

*branchie*

*fegato*

*intestino*

*cervello*

*muscolo*

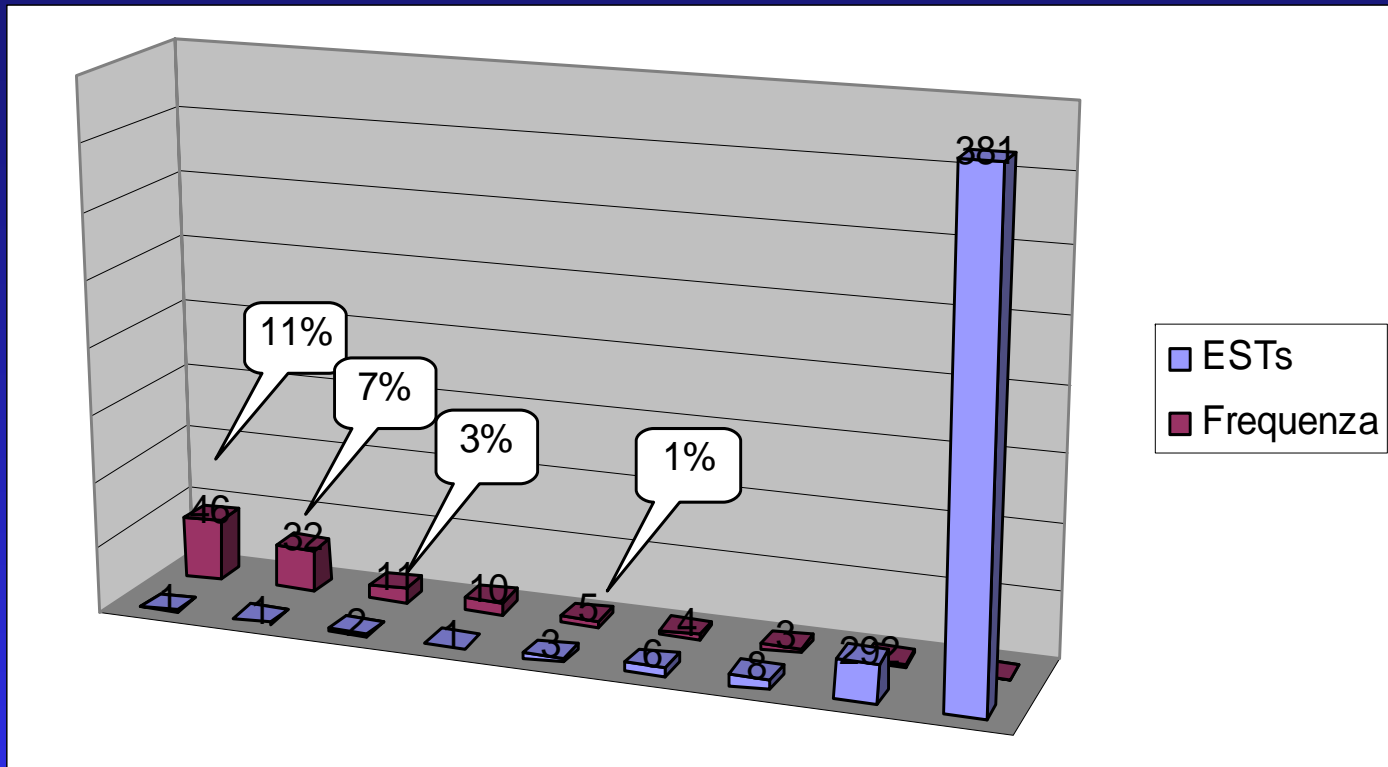
*milza*

*occhio*



EST sequenziate	768
<i>clusters</i> di EST	432
lunghezza consenso	65-1090
media:	438
mediana:	463





## Profilo di espressione

O42175 - Apolipoprotein A-I precursor (Apo-AI ) *S. aurata* (170, 2e-050)

AF266178 - apolipoprotein A-1 mRNA *Gillichthys seta* (127, 4e-026)

### Apo-lipoproteina A-1

L'espressione genica è tessuto-specifica nell'orata  
(elevata nel fegato, meno a livello intestinale) ed è  
modulata dal calo di [O<sub>2</sub>] in certi gobidi tolleranti all'ipossia



NP\_002395 - microfibrillar-assoc. protein 4 Homo sapiens (214, 1e-54)

## Proteina 4

**glicoproteina della matrice extracellulare  
coinvolta nell'adesione e interazioni intercellulari**

AAA49200 - antifreeze protein Clupea harengus (Atlantic herring) (97, 2e-019)

BAA95671 - C-type lectin Cyprinus carpio (96, 4e-019)

## Proteine antifreddo (famiglia delle Lectine tipo C)

**glicoproteine ematiche, con motivi aminoacidici ripetuti,  
consentono ai pesci di affrontare temperature molto basse**



# Apo-lipoproteina A-1

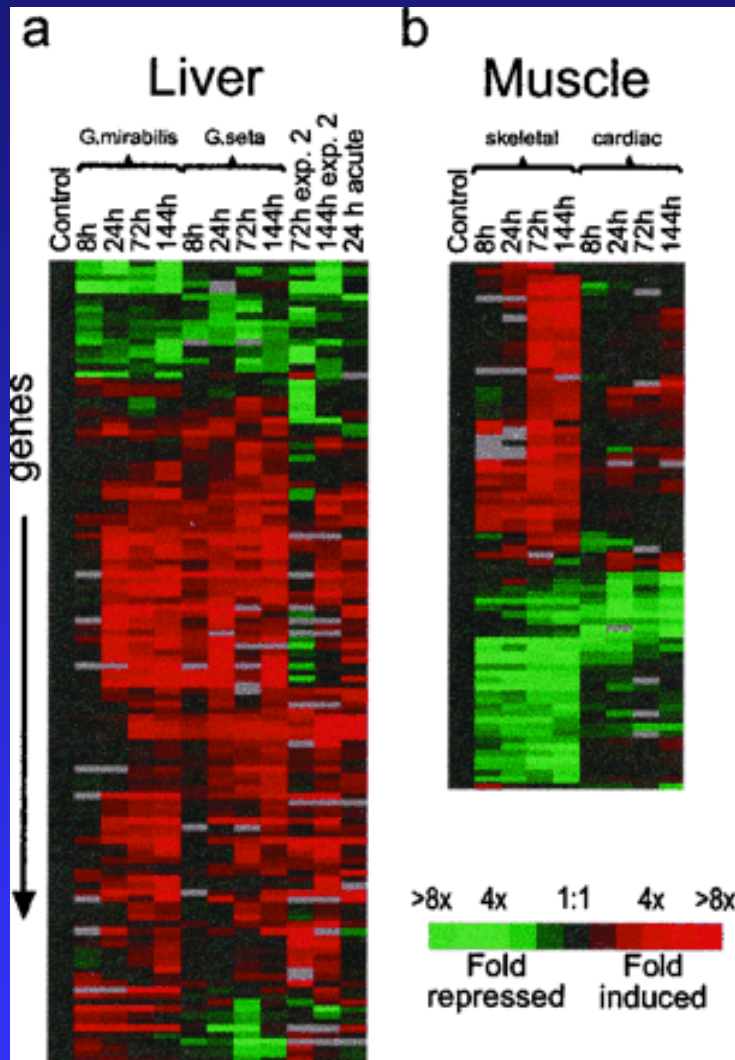
espressione genica tessuto-specifica  
modulata da ipossia



UNIVERSITA' DI PADOVA  
Dipartimento di Biologia  
Centro Ricerche  
Interdipartimentale  
Biotecnologie innovative



# Profili di espressione genica (cDNA microarray) in gobidi tolleranti all'ipossia:



*Gillichthys mirabilis* e *Gillichthys seta*  
Clustering dei profili di espressione  
indotti da ipossia (5-10 %  $pO_2$ )

**IN ROSSO:** geni indotti

**IN VERDE:** geni repressi

Categorie di geni per ruolo biologico:

- Metabolismo ATP
- Locomozione e contrazione
- Sintesi proteica
- Metabolismo del ferro
- Anti-crescita/proliferazione
- Metabolismo degli aminoacidi
- Ruolo criptico

Gracey et al., 2001 (PNAS), Hopkins Marine Station, Stanford University, CA



UNIVERSITA' DI PADOVA  
Dipartimento di Biologia  
Centro Ricerche  
Interdipartimentale  
Biotecnologie innovative



I profili di espressione genica in gobidi esposti a stress ipossico  
potrebbero rivelare nuovi meccanismi di tolleranza e  
fornire elementi  
per affrontare patologie correlate all'ipossia/ischemia  
nei mammiferi



# Sviluppo di un microarray di cDNA

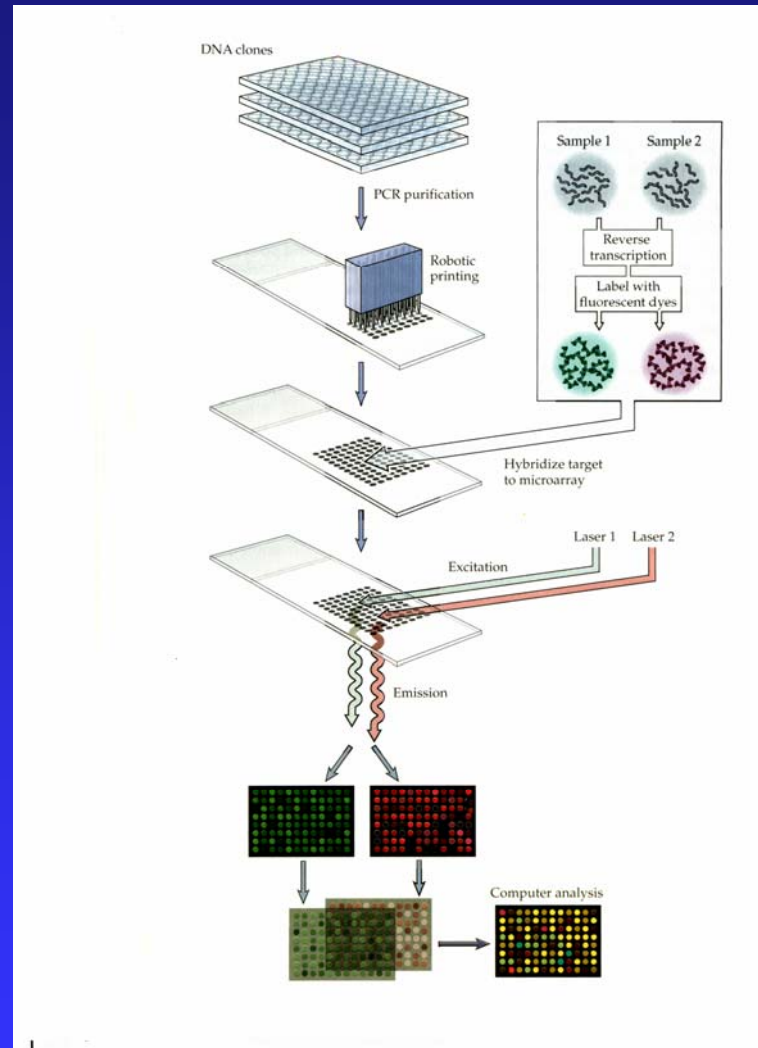
- I frammenti di cDNA (EST) ordinati in piastre da 96 o 384 pozzetti

- Spottaggio (deposizione *probes*)

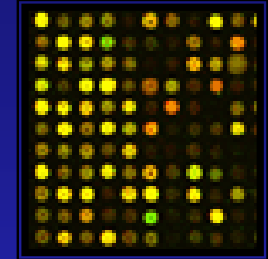
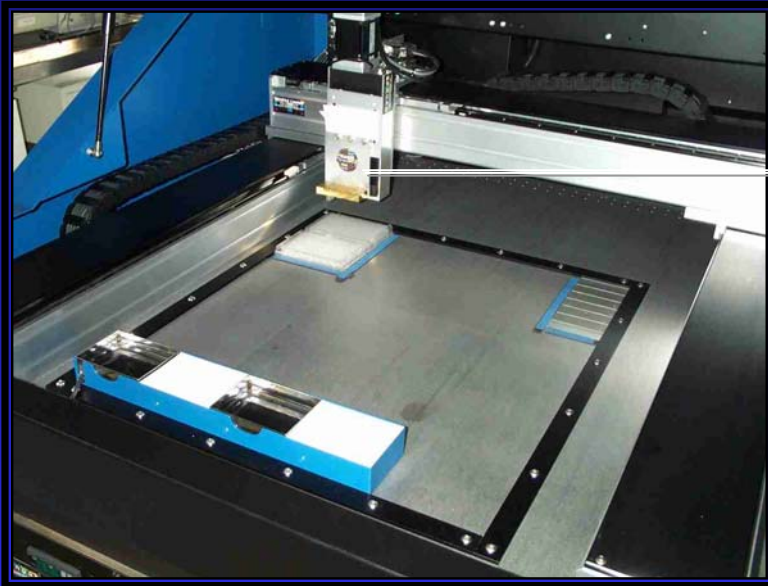
Marcatura con 2 fluorofori distinti di due popolazioni diverse di cDNA provenienti da due campioni indipendenti di RNA

- Ibridazione dei *target* sull'array.

- Rilevazione della fluorescenza mediante l'ausilio di uno scanner dotato di laser confocali. L'intensità di fluorescenza di ogni spot è proporzionale all'abbondanza del trascritto.



## Apparecchiatura per l'allestimento del DNA microarray



- Aghi in titanio: depositano 2 nl
- 120 spot senza ricaricarsi
- 48 aghi
- 4 h per *spottare* 4.800 amplificati in doppio su 25 vetrini

# Hanno finora contribuito al lavoro sul go' e sul mitilo:

---

## Sviluppo progettuale:

- Gerolamo Lanfranchi
- Paola Venier
- Alberto Pallavicini

## Produzione librerie di cDNA:

- Alberto Pallavicini
- Paola Venier
- Cristiano De Pittà
- Barbara De Nardi

## Servizio sequenziamento:

<http://bmr.cribi.unipd.it/>

## Sviluppo dell'archivio di geni, in silico e fisico:

- Cristiano De Pittà
- Alberto Pallavicini
- Francesco Marsano
- Nicola Vitulo
- Simeone Dal Monego
- Elena Moro
- Nicola Toniolo

## Prossimamente con noi:

- Aldo Viarengo
- Beniamina Pacchioni
- Chiara Romualdi
- ...

