

**LP12. Expresia genica. Metode de evaluare a gradului de activare genica.**

# Controlul expresiei genice

## - principii generale -

- proteine comune **TUTUROR CELULELOR**. *Ex: proteinele structurale cromozomiale, ARN-polimerazele;*
- proteine abundente **IN CELULE SPECIALIZATE**. *Ex: hemoglobina;*
- o celula umana tipica exprima **30-60%** din genele structurale. Pattern-ul este specific (poate fi depistata originea cel. canceroase);
- nivelurile ARNm nu pot prezice cu exactitate diferentele intre modelele de expresie a proteinei (*reglaj postranscriptional*).

# Controlul expresiei genice

## - nivele de reglaj -

1. *controlul transcriptional - cand si de cate ori o gena este transcrisa;*
2. *controlul procesarii ARN - controlul splicing-ului si procesarii ARN;*
3. *controlul transportului si localizarii ARN - selectarea moleculelor de ARNm care sunt transportate din nucleu in citoplasma, precum si localizarea moleculelor de ARNm in citosol;*

# Controlul expresiei genice

## - nivele de reglaj -

4. *controlul translational - selectarea moleculelor de ARNm din citoplasma care vor fi translatate in proteine la nivelul ribozomilor;*
5. *controlul degradarii ARNm - destabilizarea selectiva a anumitor molecule de ARNm in citoplasma;*
6. *controlul activitatii proteinei - activarea, inactivarea, degradarea sau localizarea specifica a anumitor molecule proteice dupa sinteza.*

# Controlul expresiei genice - nivele de reglaj -

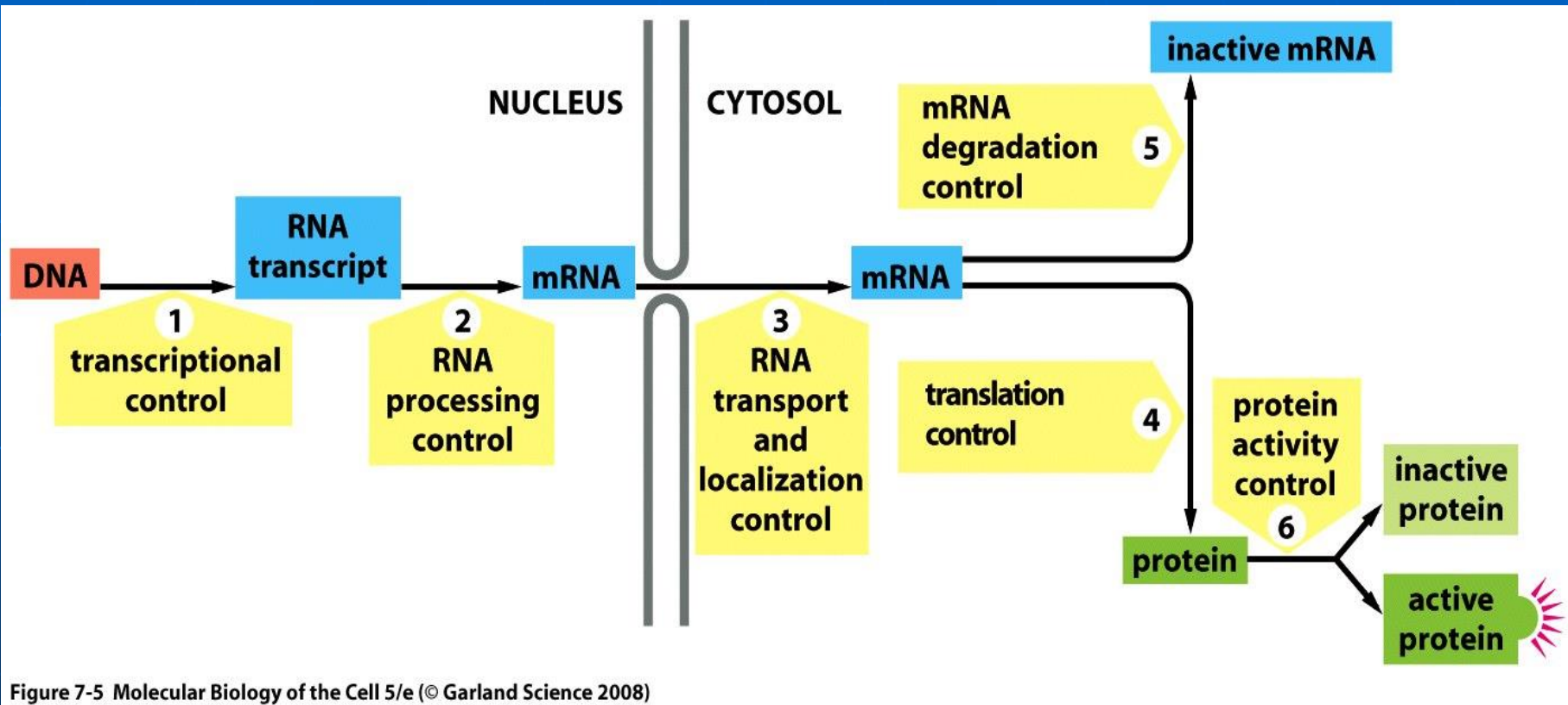


Figure 7-5 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

# Metode de evaluare a gradului de activare genica

- Analiza ARNm prin Northern blot
- Testul de protecție la ribonucleaze (ribonuclease protection assay)
- Hibridizarea tisulară in situ
- Reacția de polimerizare în lanț, în timp real cantitativă (qRT-PCR)
- Tehnicile microarray

# I. Analiza ARNm prin Northern blot

- acidul nucleic țintă este ARNm
- obiectiv - obținerea de informații privind profilurile de expresie (tipul celular, abundența transcriptului) unei anumite gene
- punerea în evidență a unui anumit ARN mesager se bazează pe hibridarea moleculară a ARN cu o sondă complementară monocatenară (ADN c denaturat; oligonucleotide ADN antisens).

# Tehnica

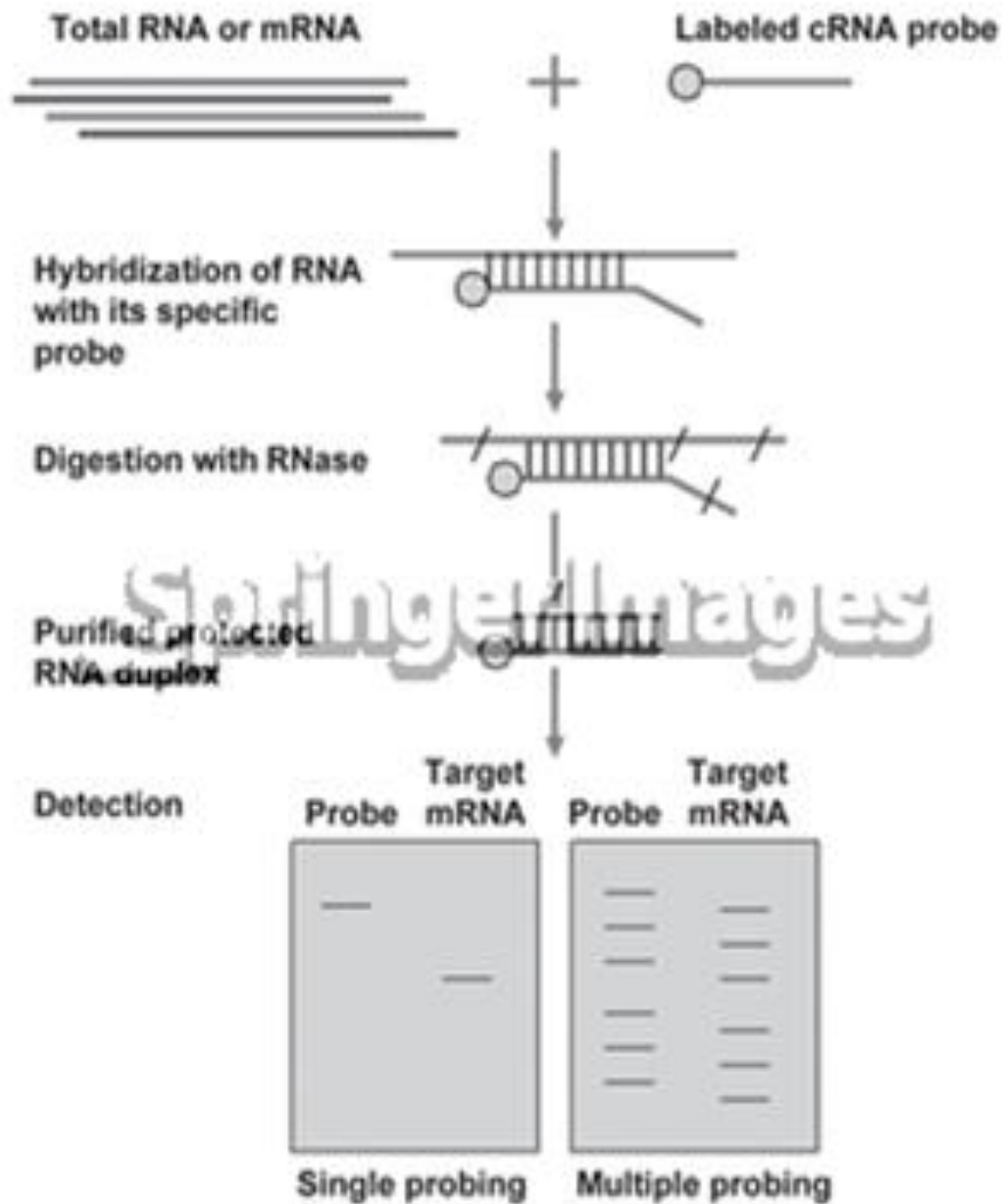
- moleculele de ARNm, de diferite lungimi (în funcție de gena transcrisă), extrase din diferite țesuturi
- separare prin electroforeză în gel de agaroză denaturant
- transfer pe un filtru de nitroceluloză și hibridare cu o sondă de ADN marcată
- pe autoradiogramă se observă una sau mai multe benzi a căror talie, număr și intensitate sunt indicații prețioase





## II. Testul de protectie la ribonucleaze (ribonuclease protection assay)

- permite evaluarea cantitativa a unor produse de transcriptie specifici anumitor gene, identificati cu o sonda de ARN complementara, dintr-un amestec de ARN total.
- tehnica- incubarea unei sonde ARN monocatenare marcate, antisens fata de gena de interes, cu amestecul de ARN total, in conditii ce favorizeaza hibridizarea complementara a genei tinta cu sonda
- tratarea amestecului cu o ribonucleaza care digera toate moleculele monocatenare de ARN, dar nu si pe cele de ARN bicatenar rezultate in urma hibridizarii
- ARN bicatenar este apoi separat prin electroforeza in gel denaturant de poliacrilamida.

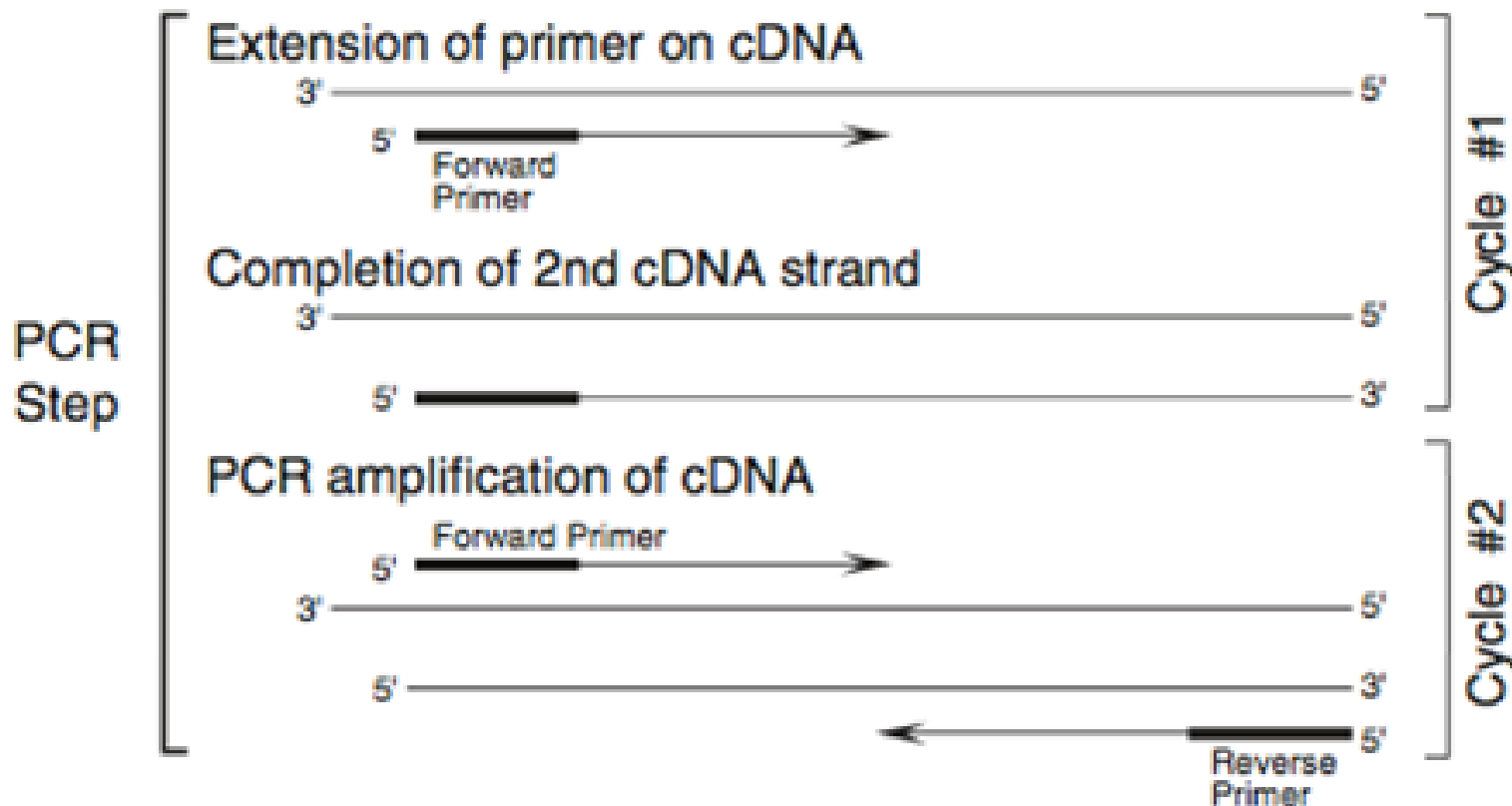
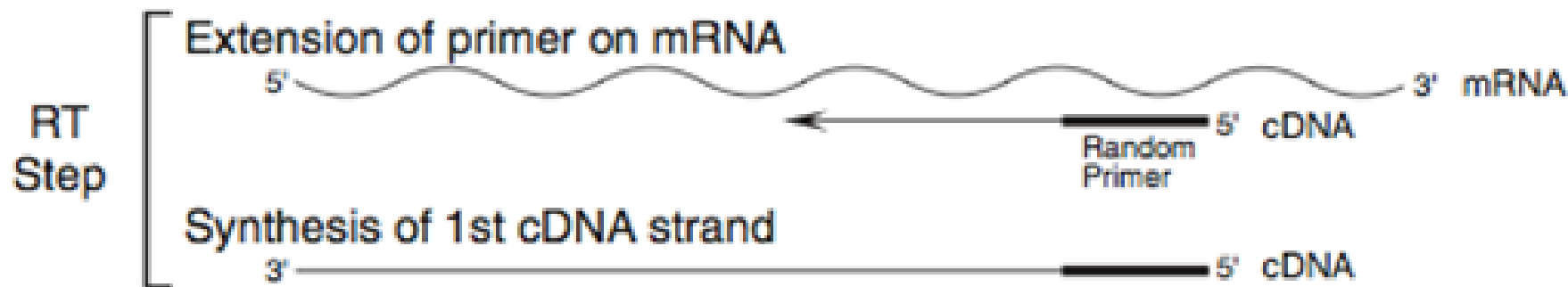


## IV. Reacția de polimerizare în lanț, în timp real cantitativă (qRT-PCR)

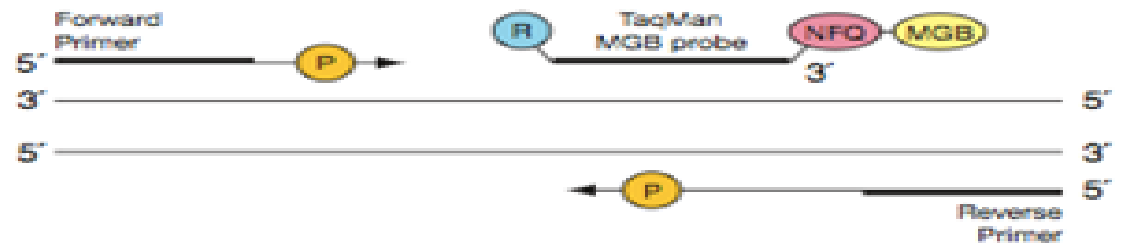
- cea mai avansată tehnologie pentru detecția și cuantificarea ARNm, fiind suficient de sensibilă pentru a evalua cantitativ transcripția prezenți într-o singură celulă.

# Etape

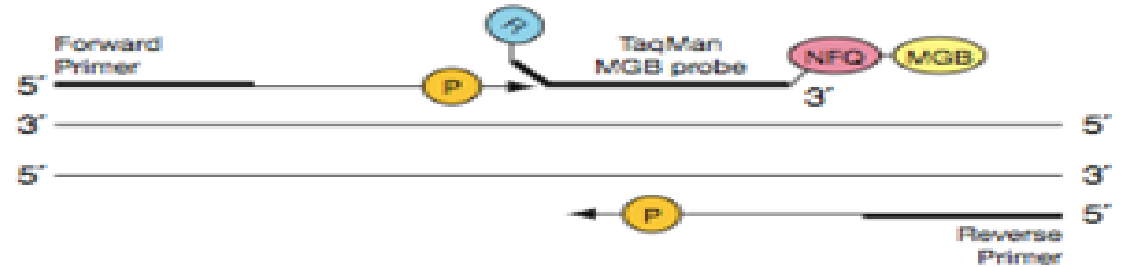
- izolarea si purificarea ARN total (sau ARNm) dintr-un tesut sau cultura de celule.
- revers-transcriptia ARN in ADN complementar monocatenar presupune utilizarea unui amestec de reactie de contine: primeri, revers-transcriptaza, ADN polimeraza, dNTPs si componente tampon.
- reacția de polimerizare în lanț, în timp real (Real-Time PCR)



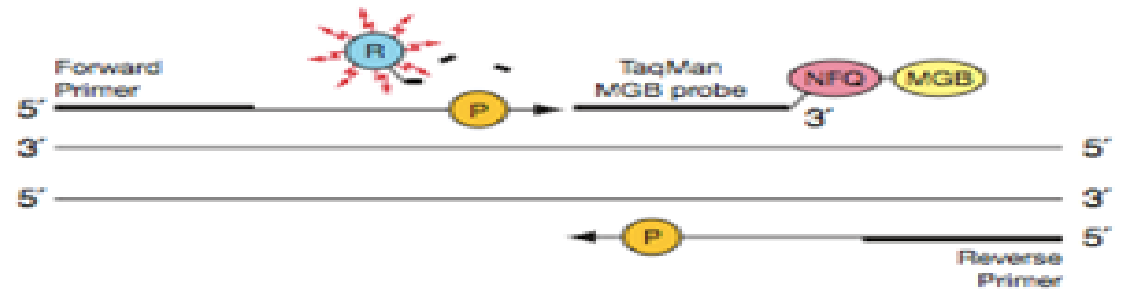
## Polymerization



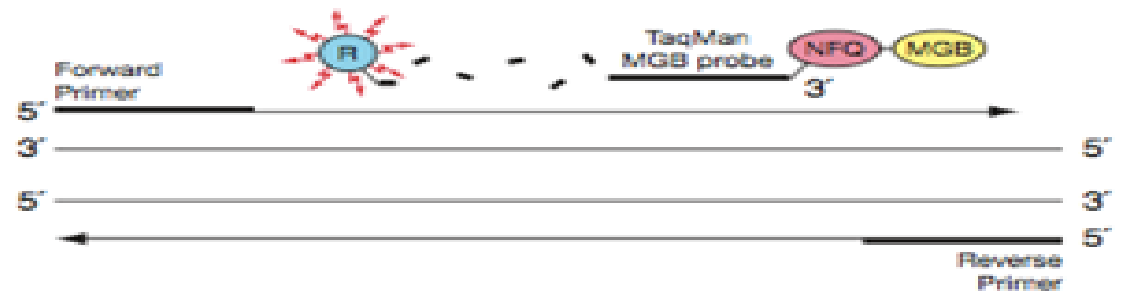
## Strand displacement



## Cleavage



## Completion of polymerization



**NFO** = Nonfluorescent quencher

**MGB** = Minor groove binder

**R** = Reporter

**P** = AmpliTaq Gold DNA Polymerase, UP

# V. Tehnicile microarray

- permit analiza simultană a sute sau mii de gene
- tipul de microarray depinde de materia de pe suport: ADN - ADN-microarray; ARN - ARN-microarray; proteina - proteina-microarray; țesut - țesut-microarray
- tehnica ADN-microarray funcționează prin cercetarea abilității unei molecule de ARNm de a se lega sau de a se hibridiza cu matrița de ADN din care a luat naștere



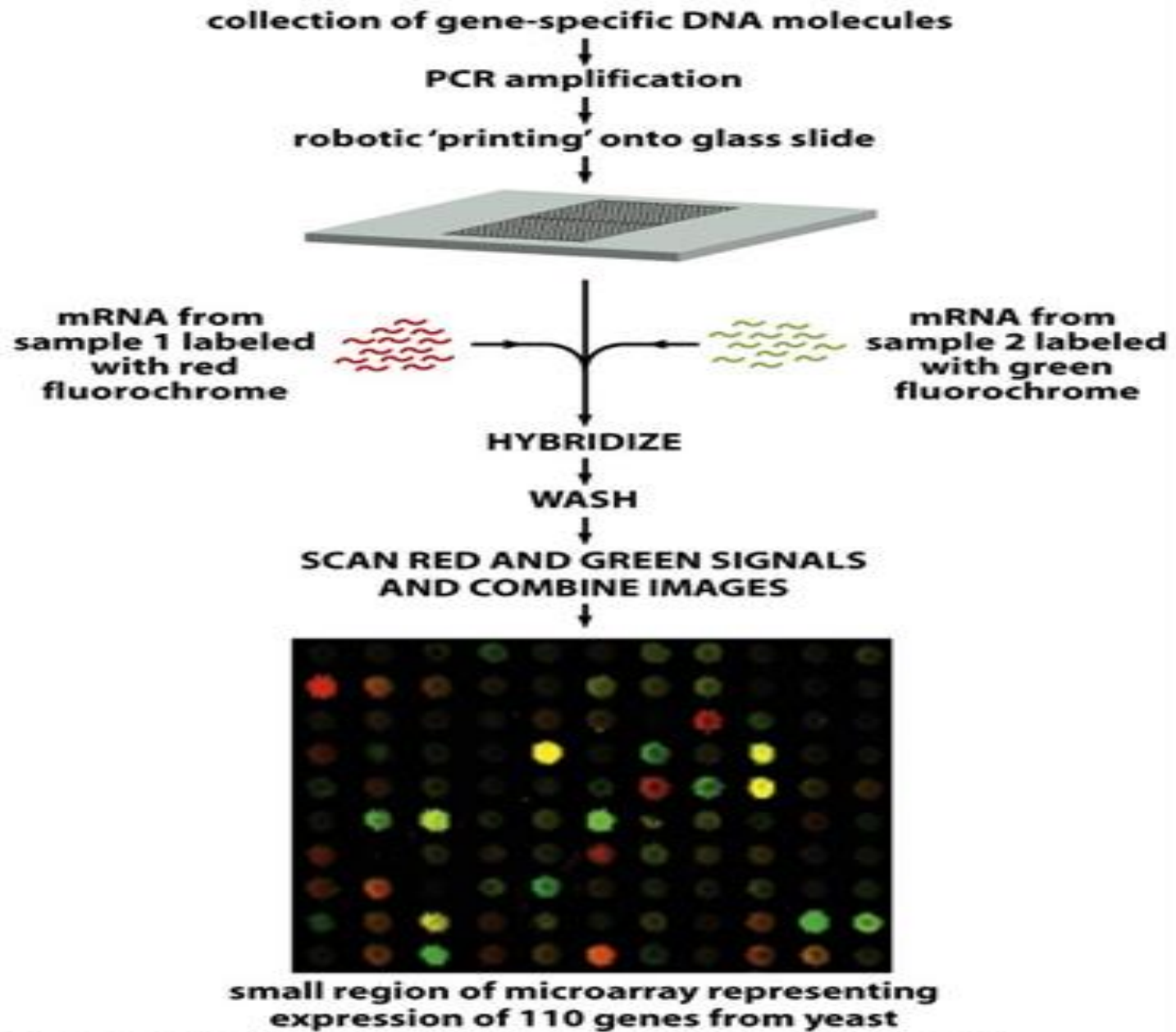


Figure 8-73 Molecular Biology of the Cell 5/e (© Garland Science 2008)

*ADN-microarray* este utilizat pentru a determina:

- nivelurile expresiei genelor într-o probă (profilul expresiei);
- secvența genelor într-o probă, fenomen numit minisequențiere când sunt analizate secvențe scurte de nucleotide
- analiza mutațiilor sau analiza SNP (single nucleotide polymorphism) când se analizează un singur nucleotid.

- Microarray-urile au fost utilizate:
  - la *nivel subcelular* pentru cartografierea genelor care codifică proteinele membranare;
  - la *nivel celular* pentru cartografierea genelor care diferențiază diferitele tipuri de celule ale sistemului imun;
  - la *nivel tisular* pentru identificarea genelor exprimate în diverse țesuturi.
  - studiile farmacologice au utilizat microarray-uri pentru a diferenția mecanismele de acțiune ale agenților terapeutici și ca un corolar pentru a obține noi agenți terapeutici.
  - monitorizarea progresiei replicăției ADN-ului în celulă
  - identificarea agenților microbieni prin hibridizarea ADN-ului din țesuturile infectate la un array ce conține secvențe din ADN-ul genomic al unui număr mare de agenți patogeni.