

# Come i geni regolano le cellule

CON LA GENOMICA FUNZIONALE, TIZIANA BONALDI CERCA I PATTERN MOLECOLARI DI REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA IN CELLULE NORMALI E TUMORALI

Tiziana Bonaldi Ph.D. | Awarded 2007

A Giovanni Armenise-Harvard Foundation Laboratory

FIRC Institute of Molecular Oncology, European Institute of Oncology (IFOM-IEO), Milan

tiziana.bonaldi@ifom-ieo-campus.it

\ di Carol Cruzan Morton

\ Autore Scientifico, Harvard Medical School

In anni recenti, la semplice logica di come i geni producano le proteine è diventata sempre più complicata. Secondo la premessa di base, detta anche dogma centrale, i geni sono trascritti nell' RNA messaggero (mRNA) (trascrizione) e il mRNA è a sua volta tradotto in proteine (traduzione o sintesi proteica). Questo è ancora un modo valido di considerare il processo primario; tuttavia i biologi hanno scoperto diversi livelli di regolazione di questo flusso d'informazione e, cosa altrettanto importante, sono ora in possesso dei mezzi per studiarli.

Tiziana Bonaldi, una giovane ricercatrice all'Istituto Oncologico Europeo di Milano dal dicembre 2007, sta osservando sistematicamente due dei meccanismi che regolano il processo che collega un gene con la proteina da esso codificata. Sta esplorando questi nuovi aspetti regolativi durante il differenziamento di cellule che si sviluppano normalmente e in quelle tumorali.

In una delle sue linee di ricerca, Bonaldi esamina le modifiche post-traduzionali presenti sulle principali proteine che legano il DNA, chiamate istoni. Dentro al nucleo di ogni cellula eucariotica, la cromatina rappresenta la forma in cui gli acidi nucleici sono organizzati e "impacchettati." L'unità base della cromatina è il nucleosoma, formato da DNA, avvolto intorno a complessi ottamerici di istoni (proteine basiche); la cromatina è poi ripiegata in vario modo, con vari livelli di condensazione.

La modalità in cui il DNA è "impacchettato" nella cromatina influenza l'espressione dei geni. Inoltre, le estremità delle proteine istoniche, che protrudono dal nucleosoma, possono essere "decorate" con vari tipi di modificazioni covalenti, le quali possono favorire o ostacolare la trascrizione dei geni basilari. In particolare, specifiche "combinazioni" di queste modifiche possono generare un codice (chiamato codice istonico) che la cellula utilizza per caratterizzare lo stato funzionale dei geni sottostanti. Bonaldi vuole decodificare questo "linguaggio cifrato" che si basa sulla varia combinazione di queste modifiche.

Bonaldi si concentra su una modificazione covalente molto piccola, un gruppo metilico. La metilazione sulle estremità degli istoni può inibire l'espressione di determinati geni durante lo sviluppo e il differenziamento. Questo è uno dei processi che contribuiscono a far sì che cellule geneticamente identiche si differenzino diventando cellule di diversi tessuti: pelle, fegato, cuore, nervi e ossa. Se nel corso della vita, alcune di queste cellule subiscono alterazioni dei pattern di metilazione e possono essere spinte a diventare cellule cancerogene, una trasformazione nella quale perdono il loro programma di espressione genica originale, in altre parole la loro "identità."

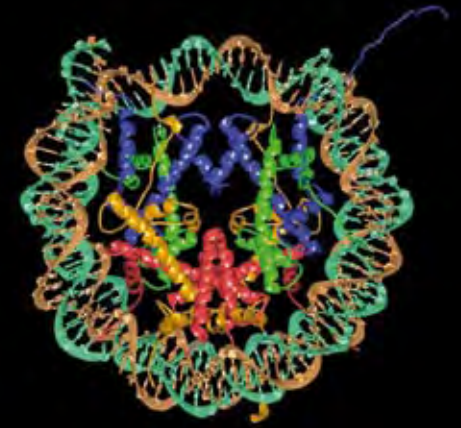
"Una modificazione può influenzarne un'altra con la sua presenza e può codificare per stati funzionali differenti," dice Bonaldi. "Sostanzialmente, vogliamo esaminare il codice delle modificazioni post traduzionali degli istoni in relazione allo stato funzionale della cromatina per stabilire se i geni sono accesi o spenti, monitorando le dinamiche di queste modificazioni ex novo."



In un altro progetto, Bonaldi esamina i passaggi che interferiscono con il processo chiamato "traduzione," che consiste nella sintesi delle proteine usando come template l'RNA messaggero. Un gene è trascritto nel messaggero RNA, il messaggero viene poi "tradotto" in una sequenza aminoacidica, la proteina. È stato recentemente scoperto che piccolissimi pezzi di RNA non codificanti proteine, detti micro RNA, possono interagire con il messaggero e addirittura tagliarlo a pezzetti e bloccare così il meccanismo che produce le proteine. In questo modo, i micro RNA possono effettivamente ridurre, inibire la produzione delle proteine, che rappresentano il punto finale dell'espressione dei geni.

Bonaldi cerca di descrivere il meccanismo di azione dei micro RNA confrontando i livelli degli RNA messaggeri in relazione ai livelli delle proteine correlate. Già altri scienziati hanno sviluppato approcci di larga scala per analizzare il "trascrittoma" (l'insieme di tutti i messaggeri prodotti da una cellula in una determinata condizione). Più di recente, sono emerse tecnologie analoghe per la misura dei livelli delle proteine in cellula. Bonaldi intende ora applicare queste tecnologie nello studio dei microRNA per l'acquisizione del "proteoma" (l'insieme di tutte le proteine sintetizzate da una cellula in una determinata condizione). Bonaldi si è impadronita di questa nuova tecnologia, la proteomica quantitativa, durante il suo studio di post-dottorato all'Istituto Max Planck di Biochimica di Monaco di Baviera.

In entrambi i progetti, Bonaldi si avvale della tecnica SILAC per "scattare delle istantanee" delle proteine e delle loro modificazioni nella cellula. L'approccio SILAC (acronimo di *stable isotope labelling by amino acid in cell culture* (marcatura in colture cellulari con aminoacidi contenenti isotopi stabili) non solo identifica migliaia di proteine diverse in un ciclo di analisi, ma fornisce anche una misura delle loro quantità relative. In questo modo, Bonaldi è in grado di rivelare nel dettaglio le differenze fra due gruppi di cellule in stati funzionali diversi. I dati ottenuti dalla misura dei livelli di migliaia di proteine sono paragonabili – in termini di quantità di informazione – a quelli forniti dall'analisi di altrettanti RNA messaggeri (dati forniti dall'analisi per microarray); questo offre la possibilità di un'indagine sistematica dei meccanismi che regolano a vari livelli l'intero processo della espressione genica: dalla regolazione della trascrizione dei geni in RNA messaggero (mRNA) a breve e lungo termine (memoria cellulare), alla regolazione della stabilità dei messaggeri e della loro "traduzione" in proteine, gli effettori finali delle funzioni cellulari.



b)

## How genes control cells

TIZIANA BONALDI SEARCHES THE MOLECULAR MECHANISMS REGULATING GENE EXPRESSION IN NORMAL AND CANCEROUS CELLS WITH FUNCTIONAL GENOMICS TOOLS

Tiziana Bonaldi Ph.D. | Awarded 2007

A Giovanni Armenise-Harvard Foundation Laboratory

FIRC Institute of Molecular Oncology,

European Institute of Oncology

(IFOM-IEO), Milan

tiziana.bonaldi@ifom-ieo-campus.it

\ by Carol Cruzan Morton

\ Science Writer,

Harvard Medical School

In recent years, the simple logic of how genes make proteins has become much more complicated. Under the basic premise, also called the central dogma, genes are transcribed into messenger RNA, and the RNA is translated into proteins. This is still a convenient way to think about the fundamental process, but biologists have discovered more levels of genetic information and control – and, equally important, now have the tools to study them.

Tiziana Bonaldi, a junior principal investigator at the European Institute of Oncology in Milan since December 2007, is taking a systematic look at two of the dynamic steps that come between a gene and the protein it encodes. She is exploring these new-found aspects of gene regulation to discover telling patterns in normal developing cells and in tumor cells.

In one project, Bonaldi is scanning for patterns in molecular markers of gene activity on the major proteins that normally bundle DNA, called histones. Inside the nucleus of each cell, long threads of DNA coil around spools of histone proteins, stringing the spools together like a string of beads. The combined protein-DNA packaging is called chromatin. The histone spools, known as nucleosomes, can grant or block access to the underlying genes. Protruding histone tails carry tiny molecules that may encourage or discourage transcription of the underlying genes. Bonaldi wants to decipher the coded messages carried by different combinations of the molecular tags.

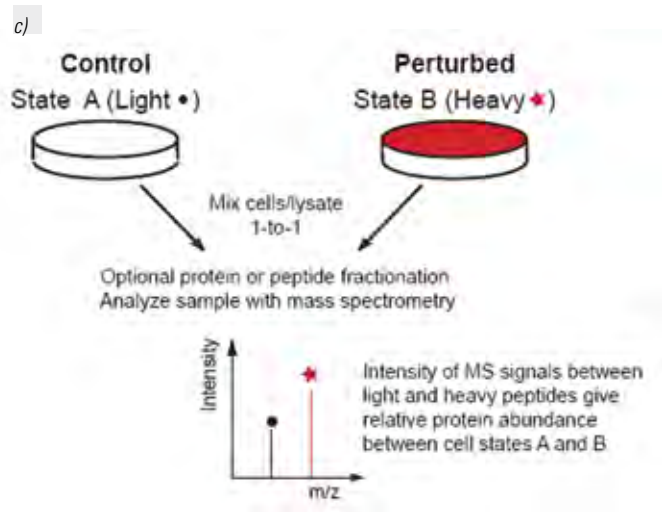
Bonaldi focuses on a tiny molecule called a methyl group, which works in solo, pair, or triplet form. Methylation along the histone tails can lock down genes that stay off in subsequent generations of cells. This may help genetically identical cells in an individual hold on to their specialty functions as they differentiate and grow into skin, liver, heart, nerve, and bone. Later in life, some mistakes in methylation patterns may help nudge normal cells into cancer cells, a transformation in which they lose their original identities. Bonaldi is seeking meaning in the larger patterns of methylation at multiple locations and how the patterns change over time in normal cells and under different conditions.

"One modification can influence the presence of another and can signal different messages," she says. "We basically want to observe the dynamics de novo, just letting the cell do what it has to do in normal conditions. The idea is that the modifications code for the functional state of chromatin and whether genes are on or off, how they are expressed, modulated, and replicated."

In another project, Bonaldi is examining events tripping up the step from messenger RNA to protein. Even if a gene is transcribed into messenger RNA, tiny pieces of non-coding RNA, known as micro RNA, can glom on to the transcript and either chop it up or block the protein-making machinery. Either way, micro RNAs can effectively limit the end stage of gene expression: protein. >

> Bonaldi will look for evidence of micro RNA activity by comparing RNA transcripts with the subsequent mix and quantity of different proteins in a cell. Other scientists have been working out the kinks in large-scale screening of RNA transcripts. More recently, comparable technologies for measuring proteins in a cell have emerged. Bonaldi prepared herself to use these new tools by taking on a second postdoctoral fellowship in Germany.

For both of her projects, Bonaldi is using a technique for taking a global snapshot of proteins and their modifications in a cell. SILAC (short for stable isotope labeling by amino acids in cell culture) not only identifies thousands of different proteins in one sorting, but estimates their relative quantities. The method can reveal detailed differences between two groups of cells. Data from thousands of proteins can be compared with data from thousands of RNA transcripts in a systematic investigation into the dynamics influencing the crucial last step in gene activity.



c) **Schematic representation** of the SILAC approach employed to perform quantitative proteomics analysis.