

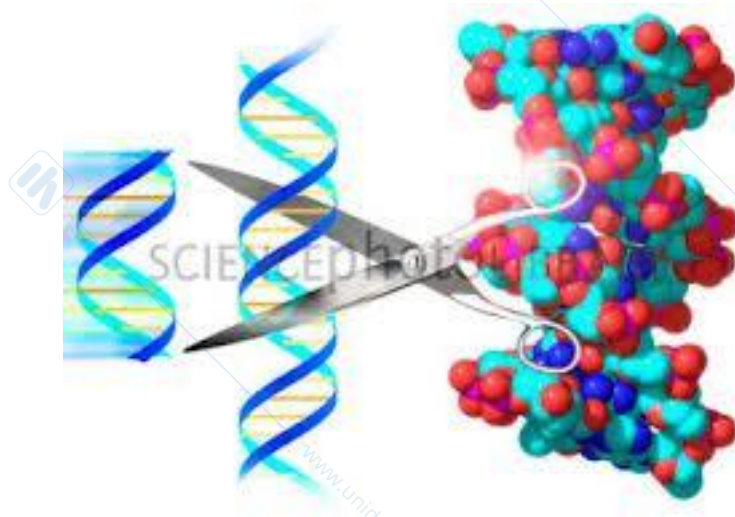
Cos'è il genoma?

- Il genoma è l'intero patrimonio genetico di un organismo vivente in cui sono contenute le istruzioni che regolano lo sviluppo e il funzionamento dell'organismo
- Circa 6 MILIARDI di "lettere" (basi o nucleotidi) organizzati in 23 coppie di cromosomi
- Il genoma è "scritto" sotto forma di DNA, circa 1.5 metri di DNA in ogni nucleo cellulare
- Il DNA è identico per tutte le cellule di un individuo ed è contenuto nel nucleo
- Solo il 3% del genoma è formato da geni (sequenze che codificano per proteine)



Ingegneria genetica:

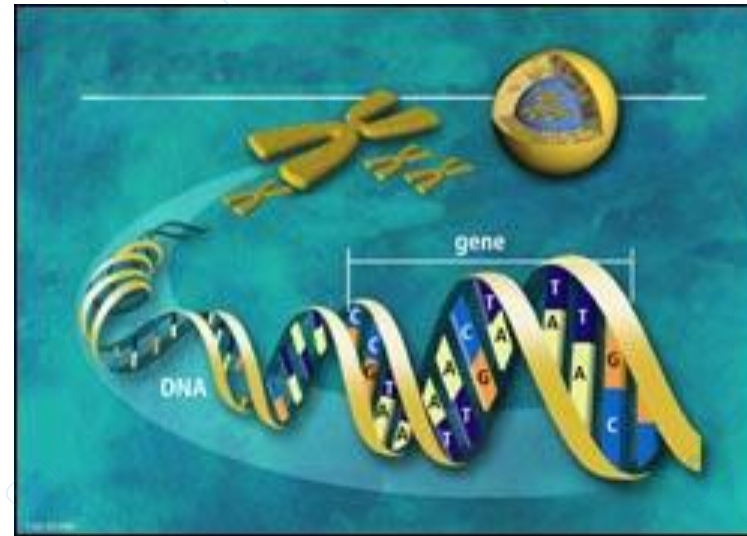
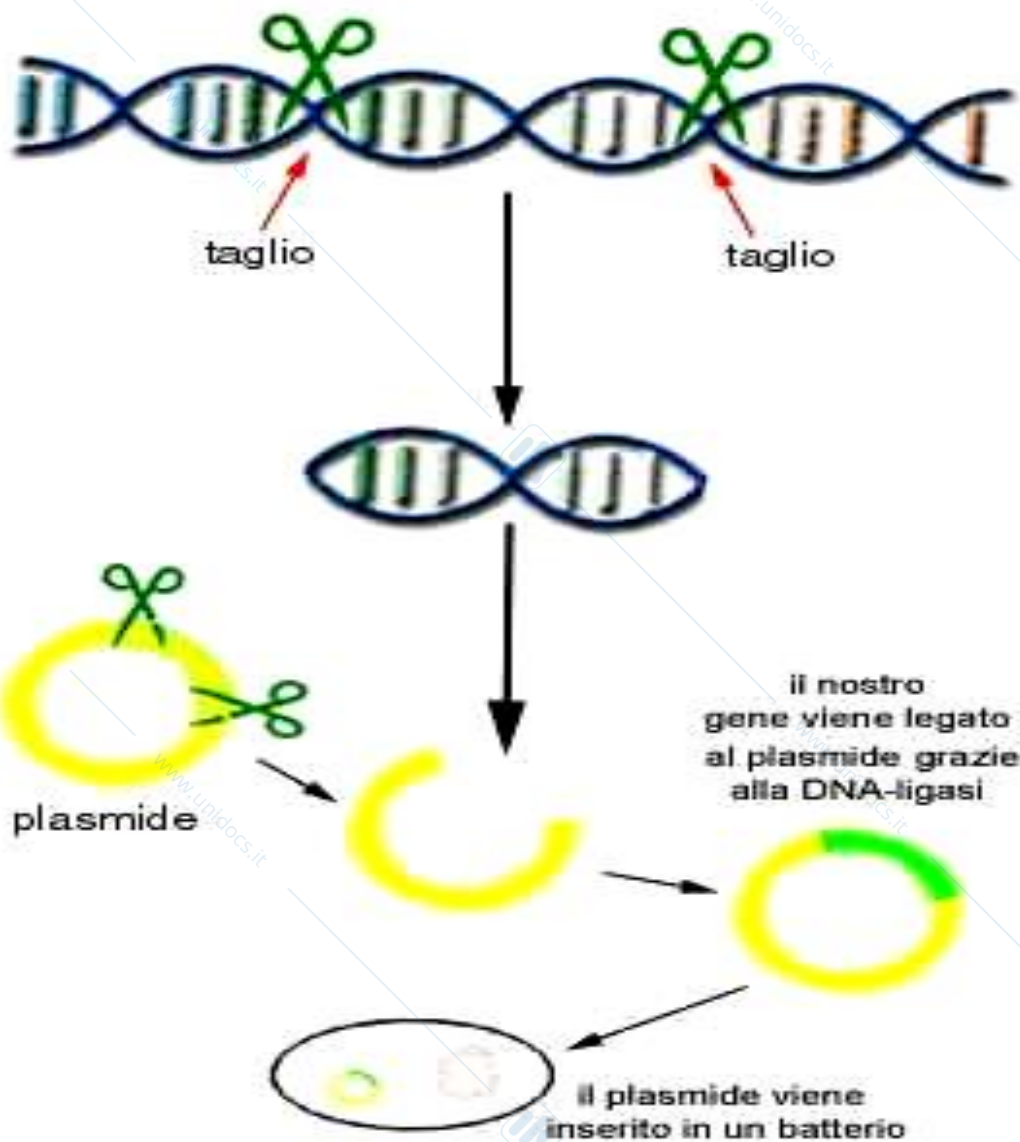
Insieme di tecniche che permettono di isolare geni, clonarli, introdurli in un organismo esologo (differente dall'ospite originale).



ha avuto un rapido sviluppo con l'acquisizione della
tecnologia del
DNA ricombinante e con le nozioni sul
sequenziamento del DNA



DNA ricombinante

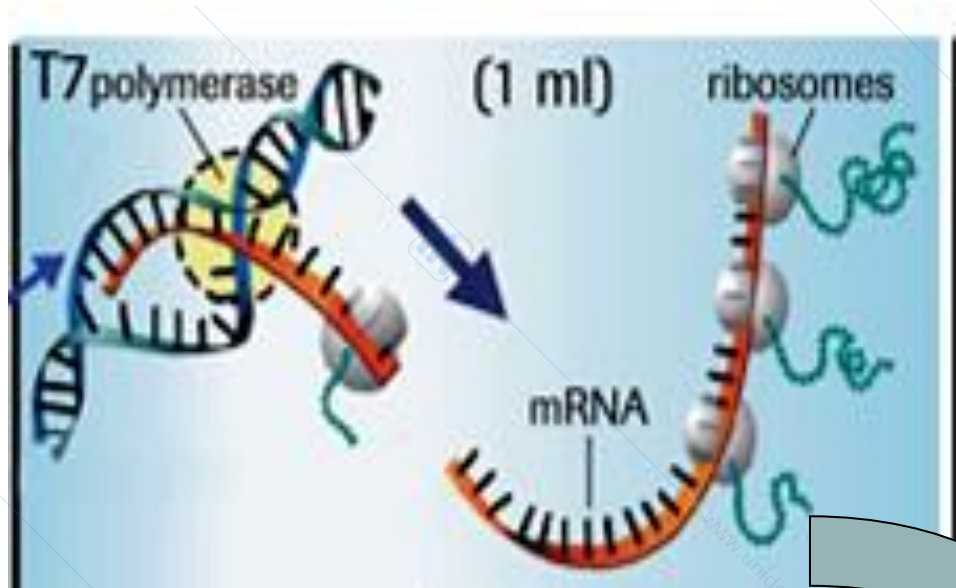
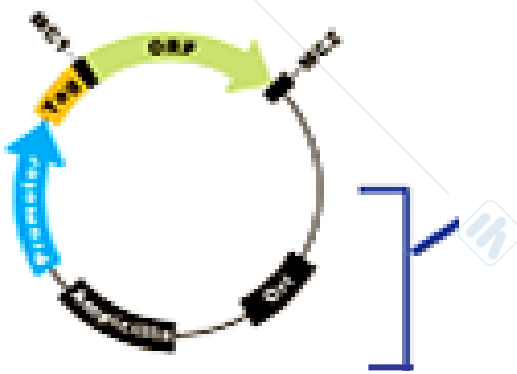


Questa tecnica permette di isolare un gene di interesse e di trasferirlo da un organismo ad un altro (clonaggio del gene)

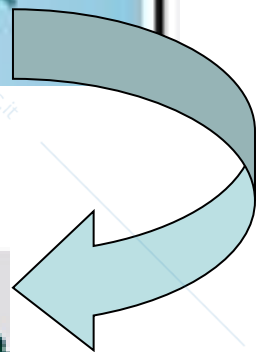
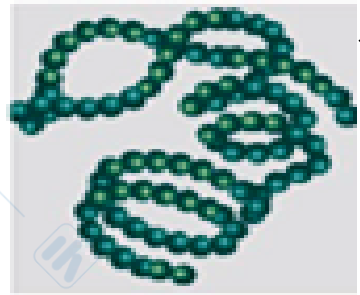
Proteina ricombinante

E' il prodotto della espressione di un gene ricombinante

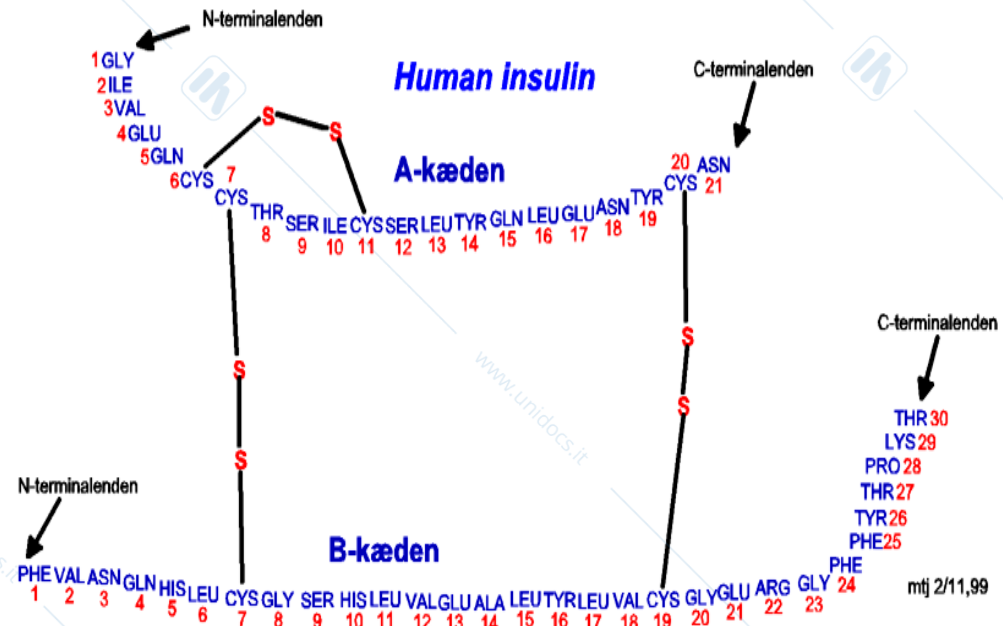
Expression Clone



Proteina ricombinante

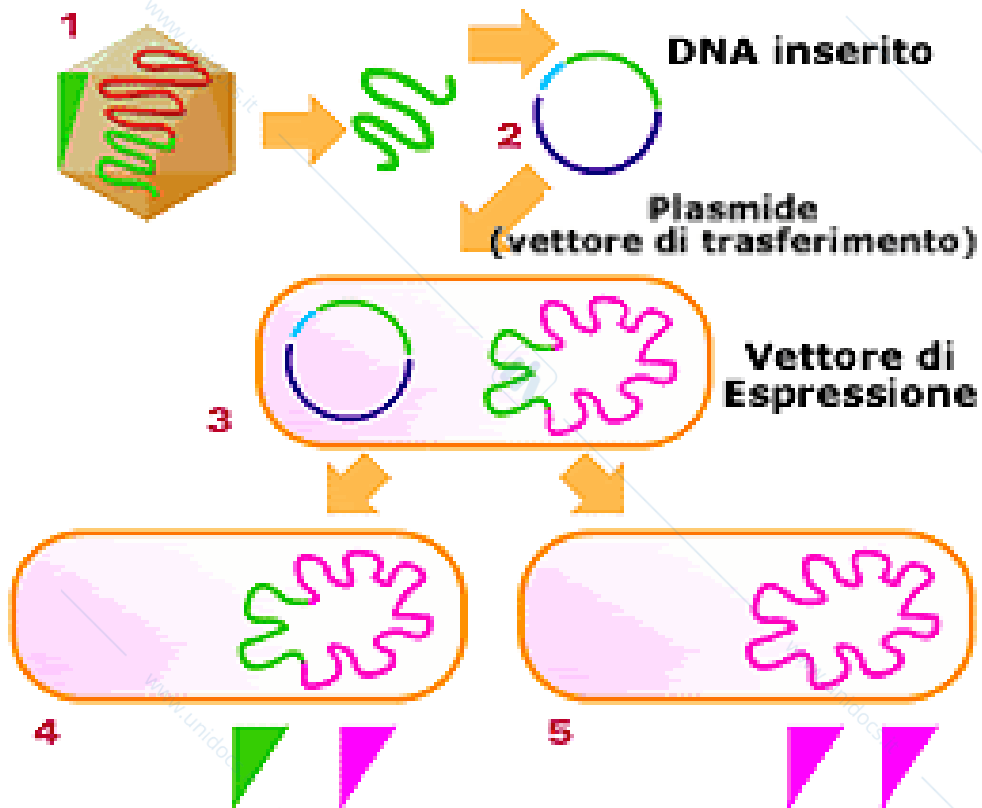


Nel 1982 l'INSULINA umana diviene la prima terapia biotecnologica approvata dalla FDA. (prodotta dalla Genentech and Eli Lilly and Co.)



DNA Ricombinante: definizione

TECNICA DEL DNA RICOMBINANTE



• Produzione di un'unica molecola di DNA attraverso l'unione di due o più frammenti di DNA che normalmente non sono associati insieme.

• Spesso si avvale dell'uso di un **vettore plasmidico** che può essere inserito in una cellula batterica che ha il compito di amplificare il DNA inserito

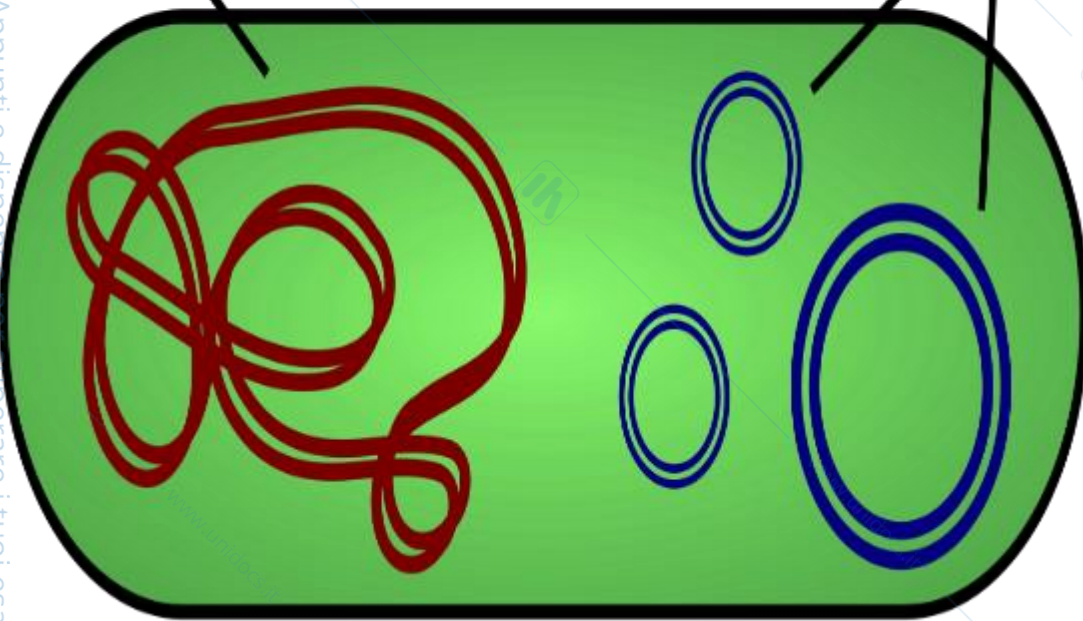
• I frammenti di DNA di solito derivano da diverse fonti biologiche



Vettori plasmidici

DNA batterico

Plasmidi

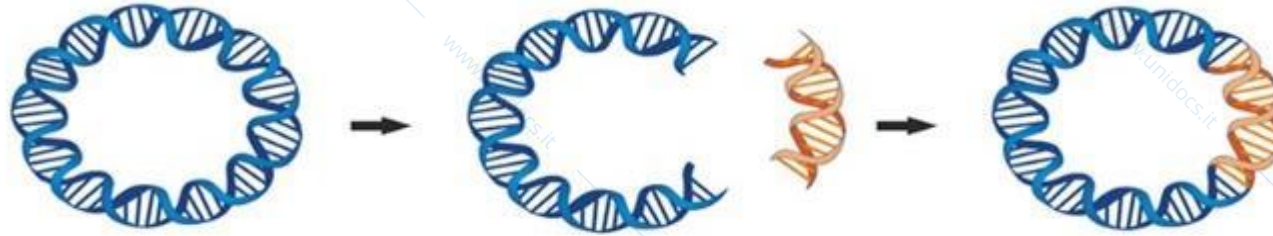


Elementi genetici di DNA, circolari della cellula batterica che si replicano in maniera autonoma rispetto al cromosoma batterico.

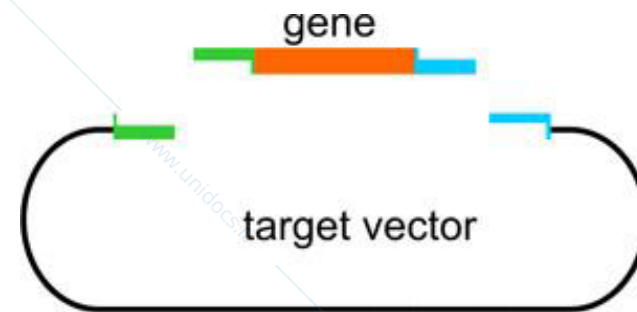
Sono stati usati per effettuare il primo clonaggio del DNA, avvenuto negli anni '70.



Caratteristiche dei plasmidi



- ✓ sono molecole di DNA extracromosomiale naturali che replicano in maniera indipendente
- ✓ esprimono geni che codificano per enzimi capaci di metabolizzare antibiotici (presentano quindi una resistenza per un antibiotico, utile per selezionare le cellule che hanno ricevuto il plasmide)
- ✓ possono essere tagliati da enzimi di restrizione.

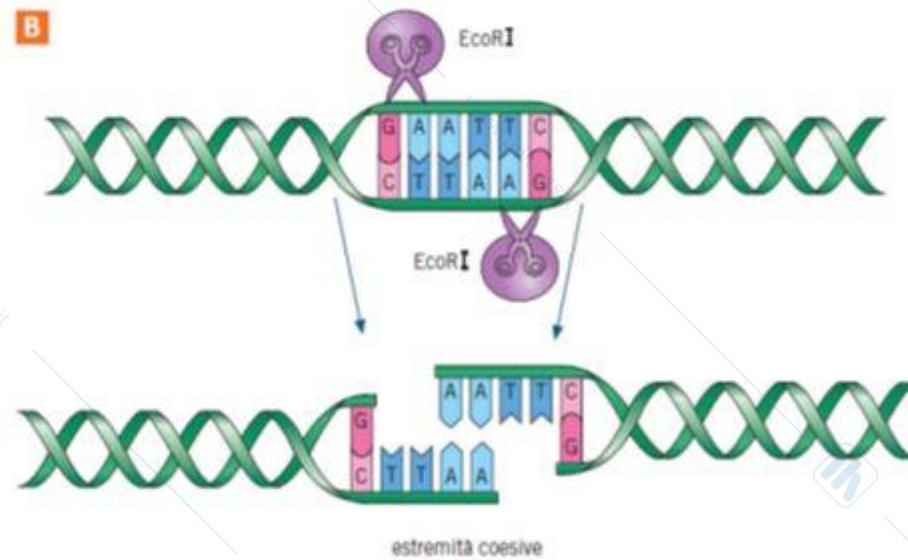
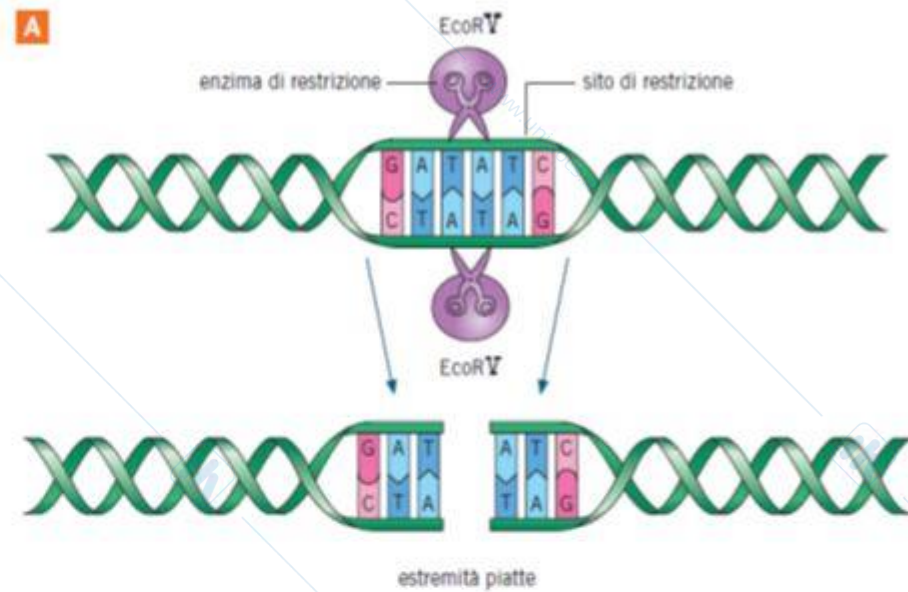




Gli enzimi di restrizione

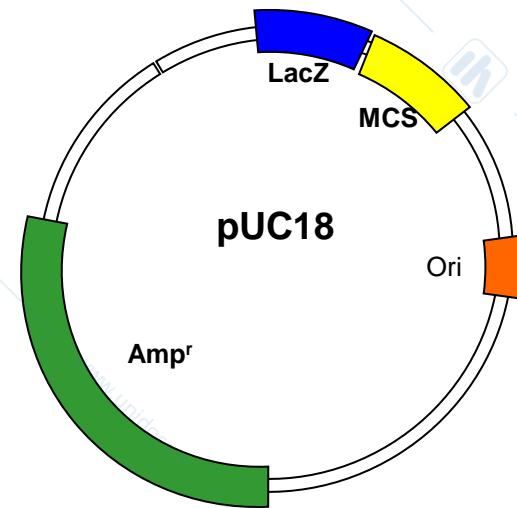
Sono enzimi capaci di riconoscere specifiche sequenze (**siti di restrizione**) e di tagliare la molecola.

I tagli lasciano estremità **piatte** o **coesive**.



Vettori di clonaggio

- Plasmidi utili come vettori devono avere:
 - Un'origine di replicazione
 - Un marker di selezione (geni che esprimono resistenza ad antibiotici, come ampicillina).
 - Sito multiplo di clonaggio (MCS) (siti dove si inserisce il DNA esogeno, non viene distrutta l'origine di replicazione o inattivati geni essenziali).

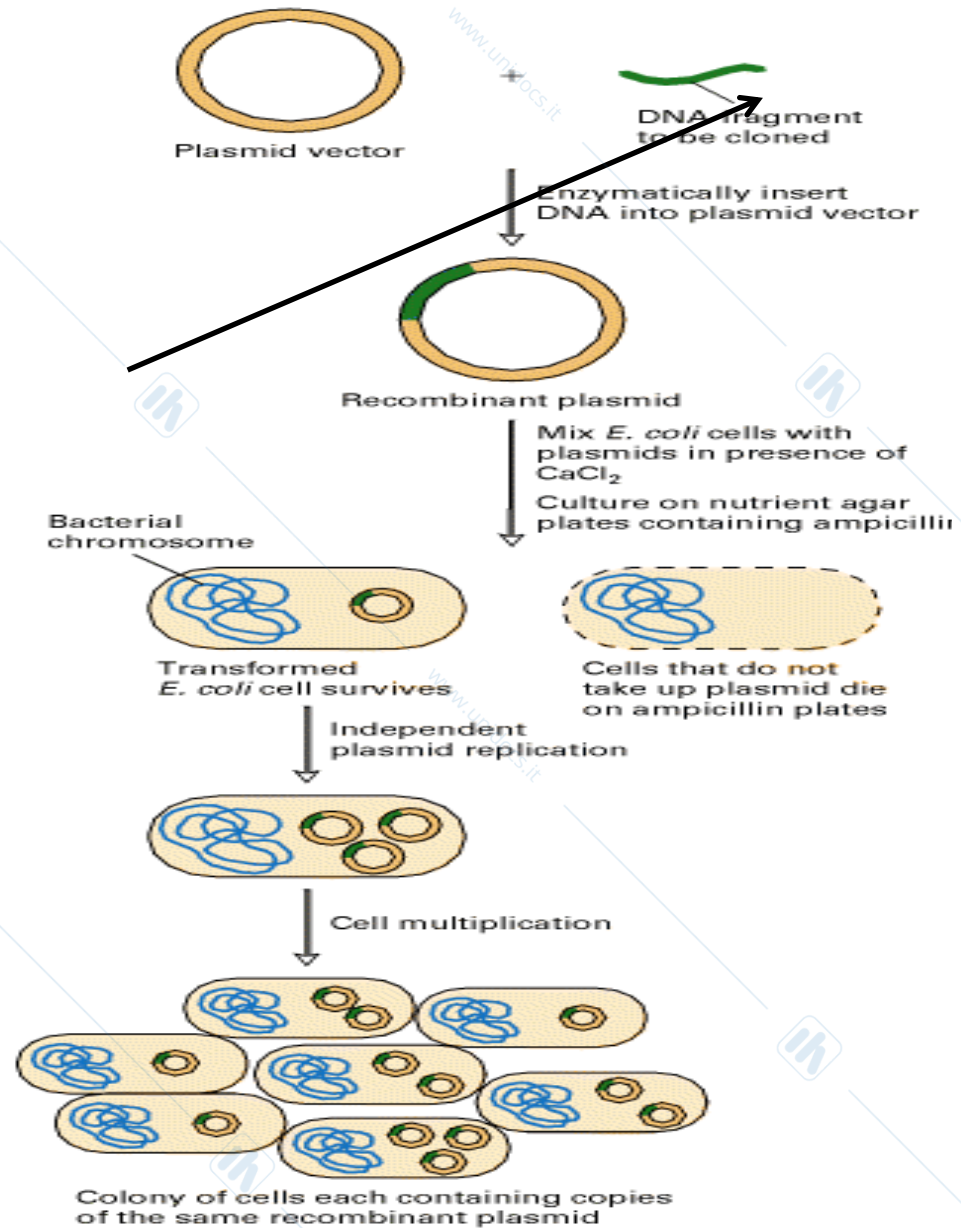


CLONAGGIO del DNA:

Trasferire un frammento di DNA (umano) in un vettore plasmidico (di origine batterica)

Utilità:

- 1) ISOLARE , STUDIARE , MODIFICARE GENI
- 2) ESPRIMERE UNA PROTEINA



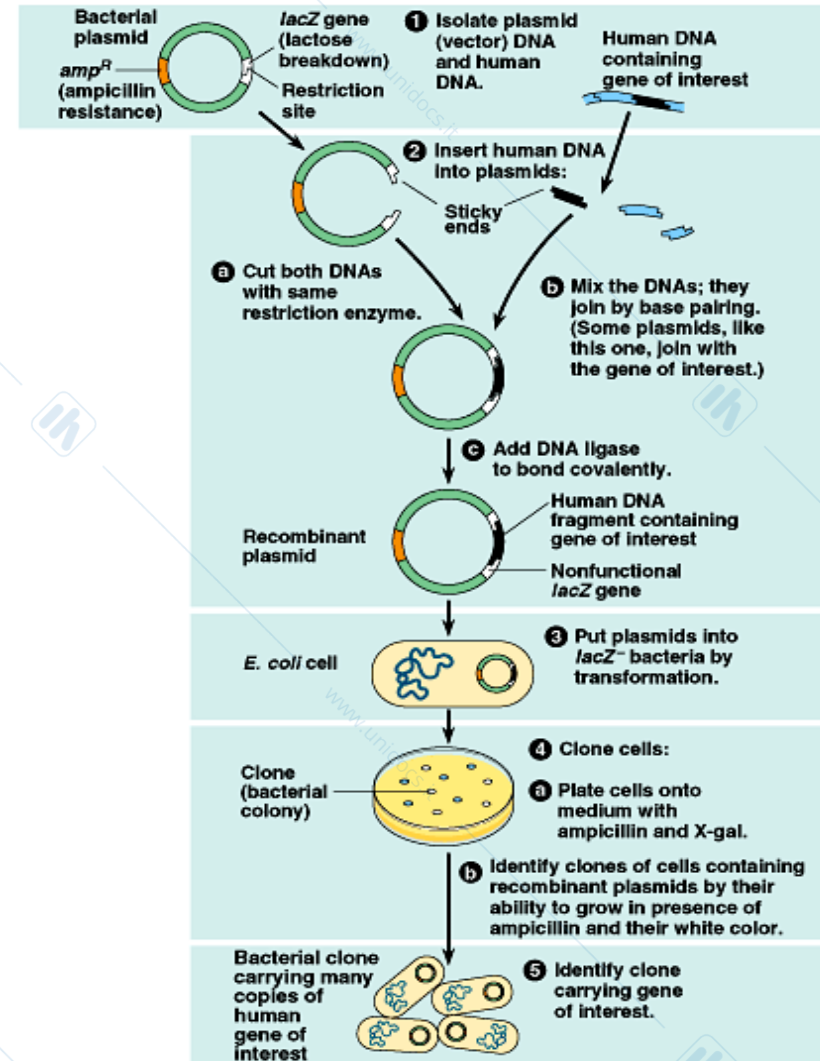
Perché manipolare i geni?

- Per facilitare lo studio dell'espressione genica e della regolazione fisiologica
- Vaccini ricombinanti
- Colture geneticamente modificate
- Anticorpi monoclonali
- Colture cellulari e tissutali
- Xenotrapianti
- Produzione di antibiotici
- Bioterrorismo
- Indagini polizia scientifica (RIS, etc)
- Terapia genica



PROCEDURA di CLONAGGIO

- 1) ISOLAMENTO del gene
- 2) INSERZIONE del gene in un VETTORE PLASMIDICO
- 3) INTRODUZIONE del vettore plasmidico IN CELLULE VIVENTI per propagarlo
- 4) IDENTIFICAZIONE del clone cellulare portante il gene di interesse



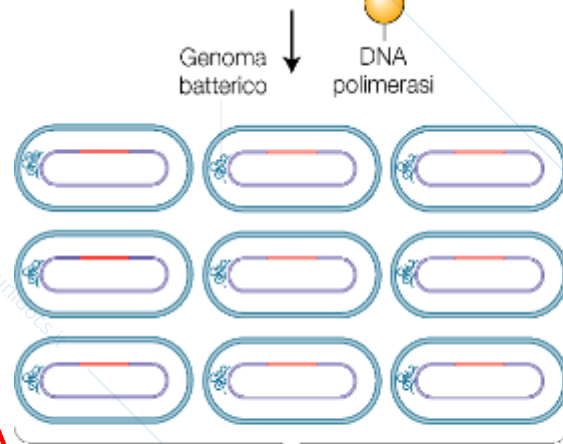
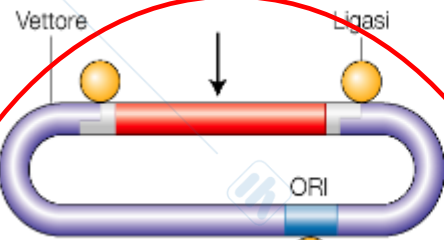
Copyright © Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.



metodi per isolare geni di interesse

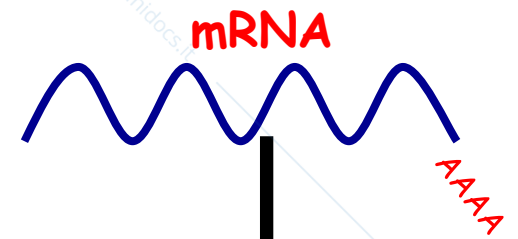
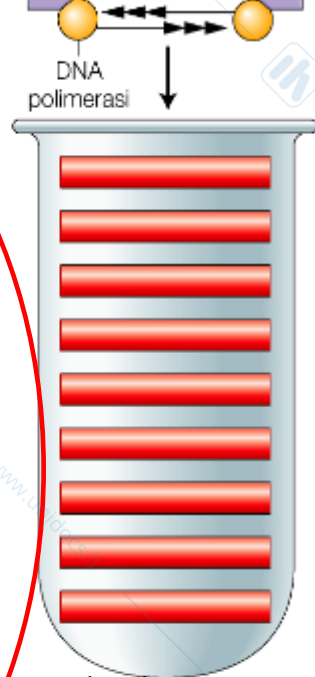


a) *In vivo*



Enzimi che si legano al DNA Primer per la polimerizzazione del DNA

b) *In vitro*

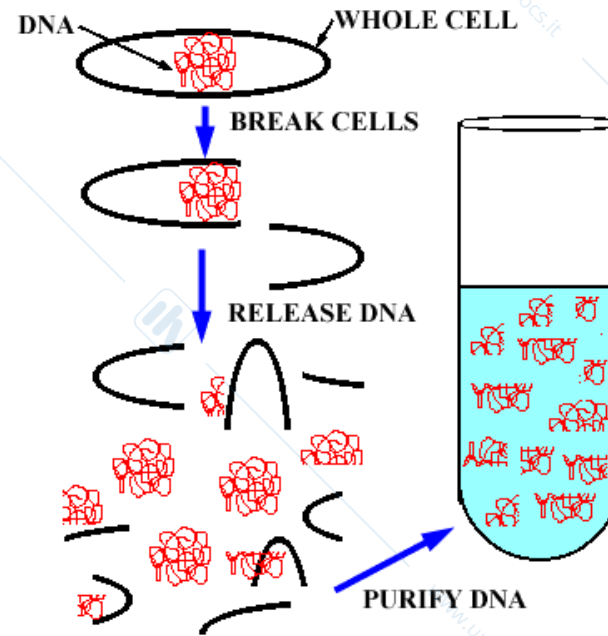


Reverse Transcriptase



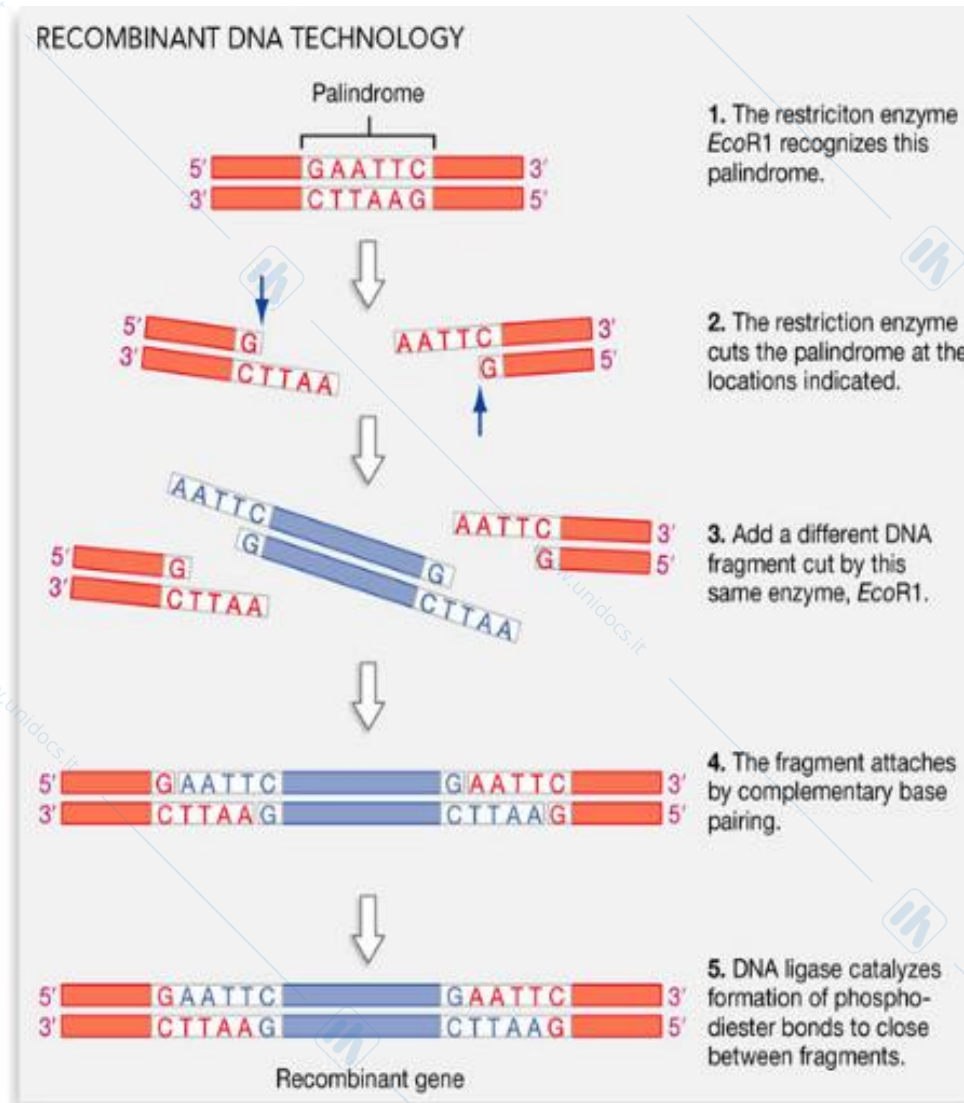
Estrazione del DNA

- E' possibile isolare il DNA contenente il gene di interesse da una cellula/tessuto animale o vegetale



Come inseriamo il gene isolato nel plasmide?

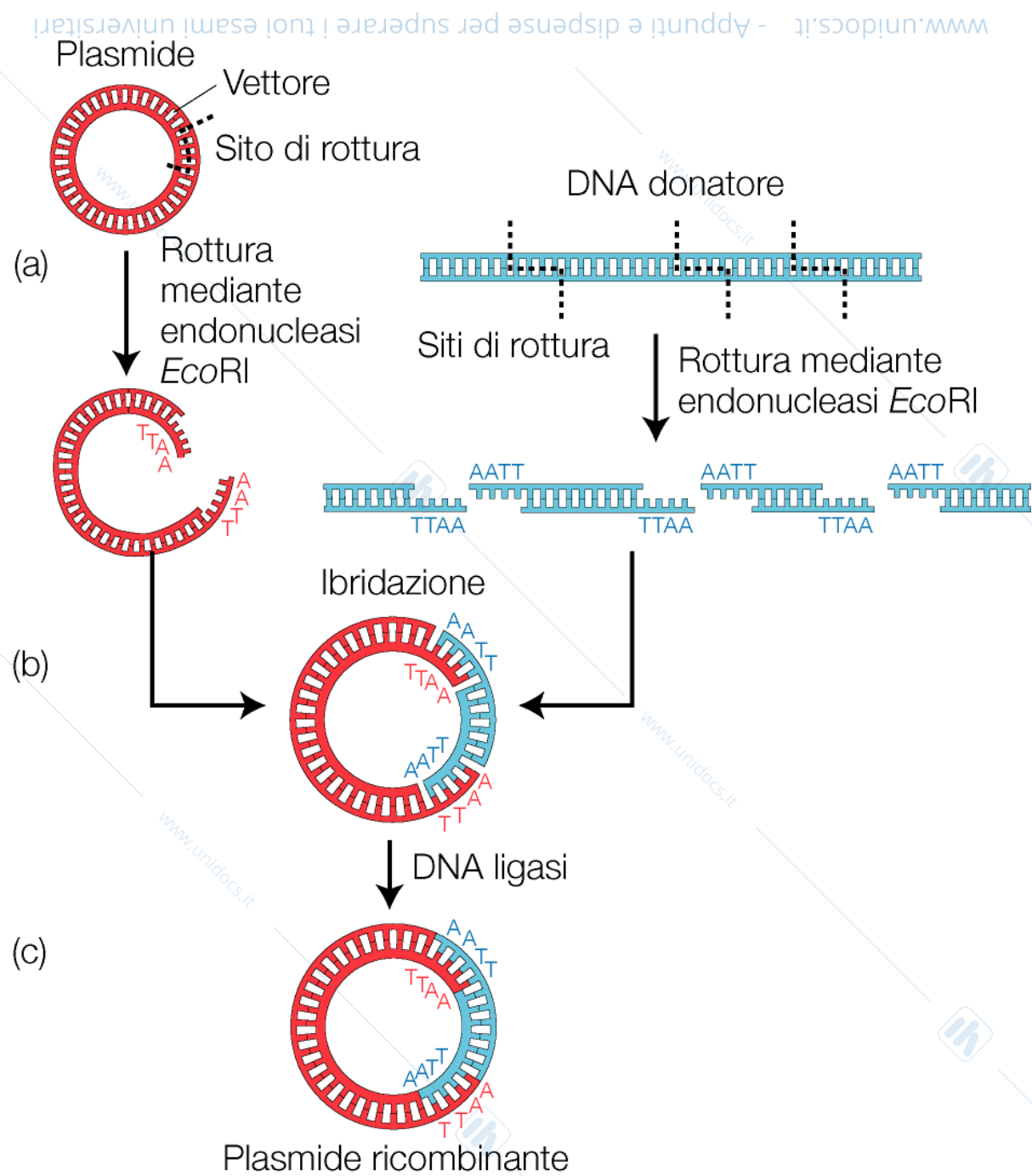
Utilizzo degli enzimi di restrizione: nucleasi che tagliano il DNA su di una specifica sequenza



**Frammento con
estremità coesive**

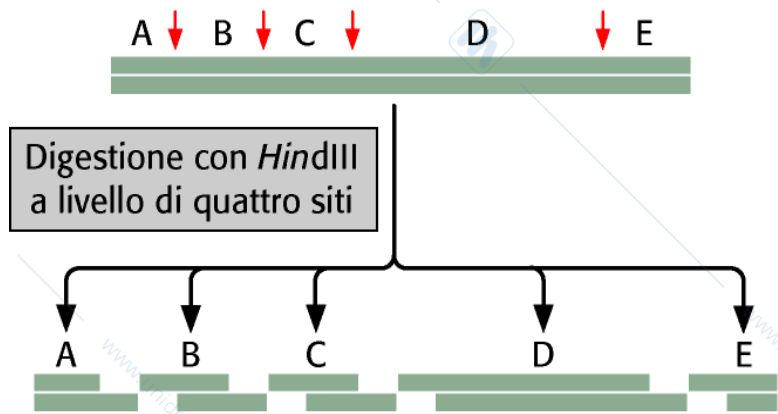
**Associazione dei
frammenti per
complementarietà**

**Il vettore
ricombinante**

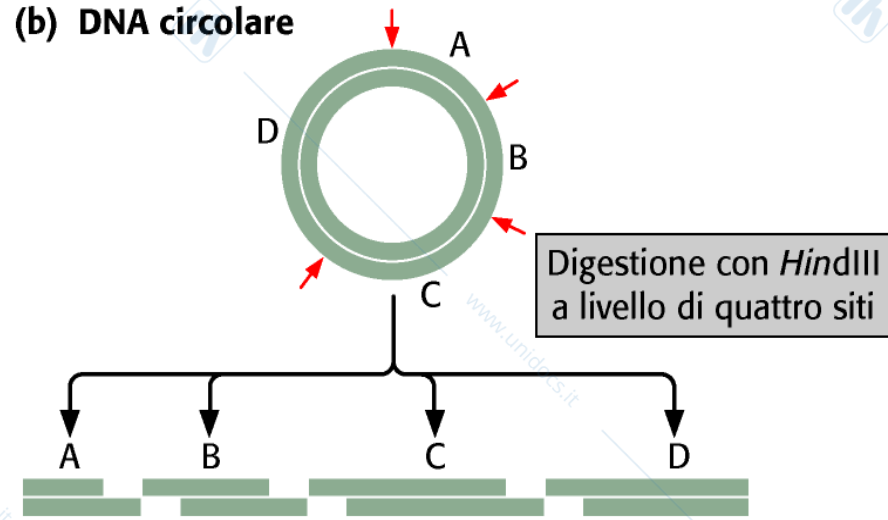


Digestione del DNA con gli enzimi di restrizione

(a) DNA lineare

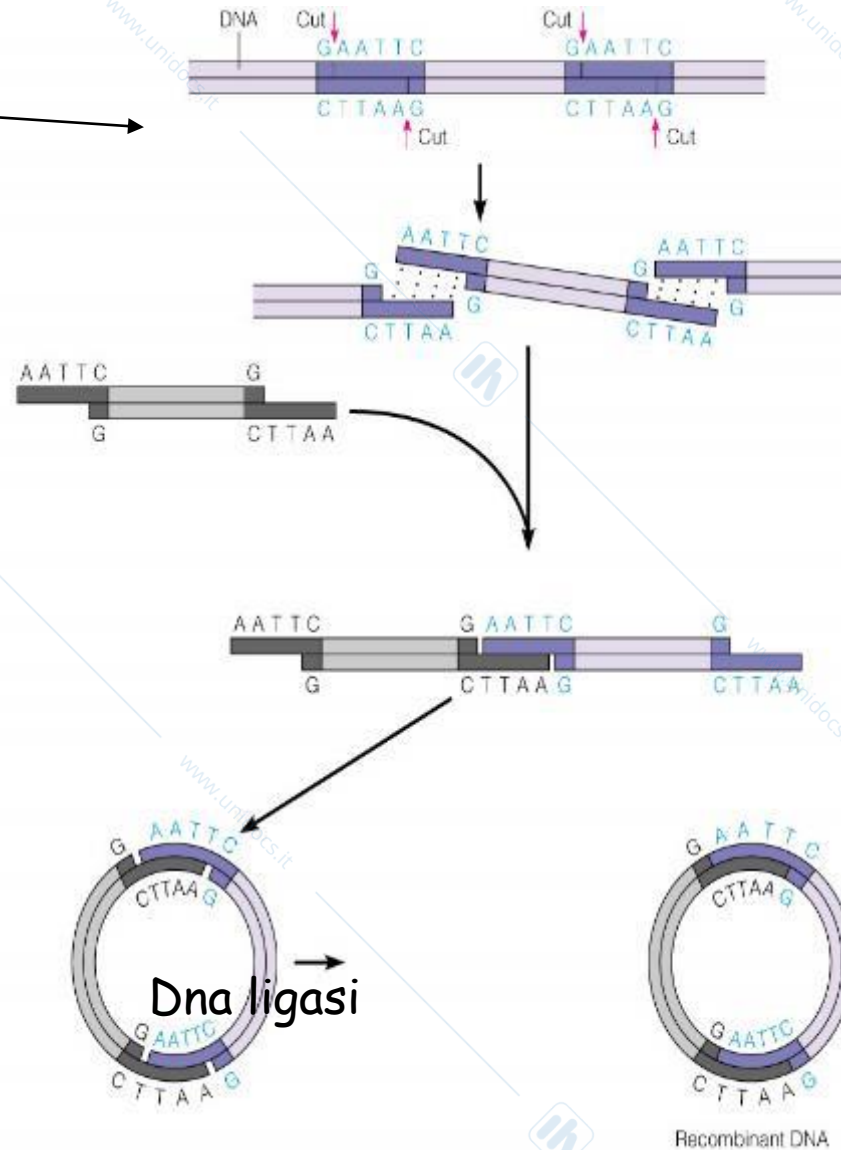


(b) DNA circolare



Enzimi di restrizione

Taglio



Frammento con
estremità coesive

Associazione dei
frammenti per
complementarietà

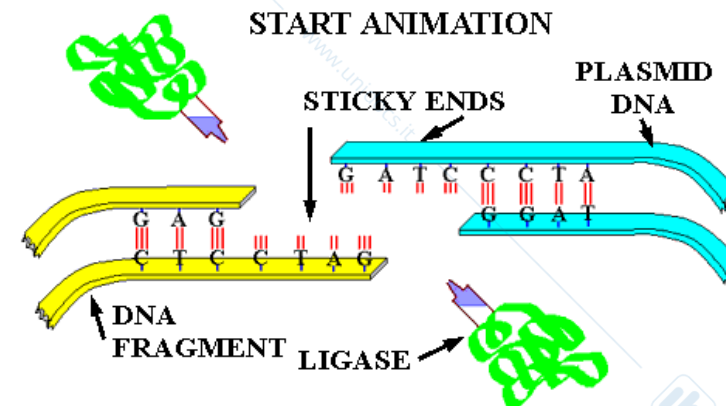
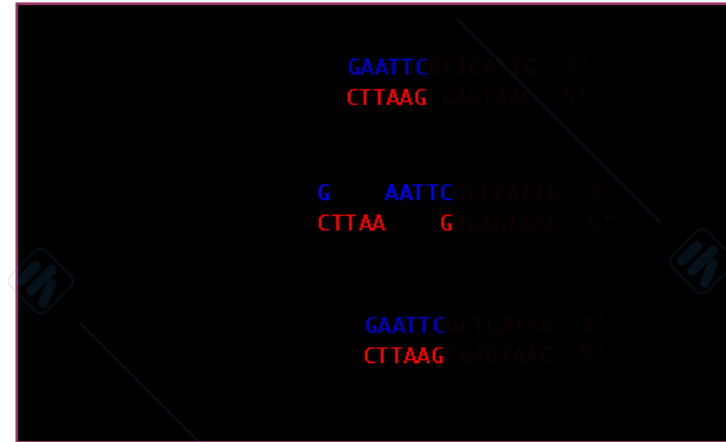
Formazione di una
molecola circolare

DNA
ricombinante



DNA Ligasi

- Enzima che "attacca" 2 frammenti di DNA insieme facendo legami covalenti tra gli zuccheri e i fosfati del DNA



La PCR

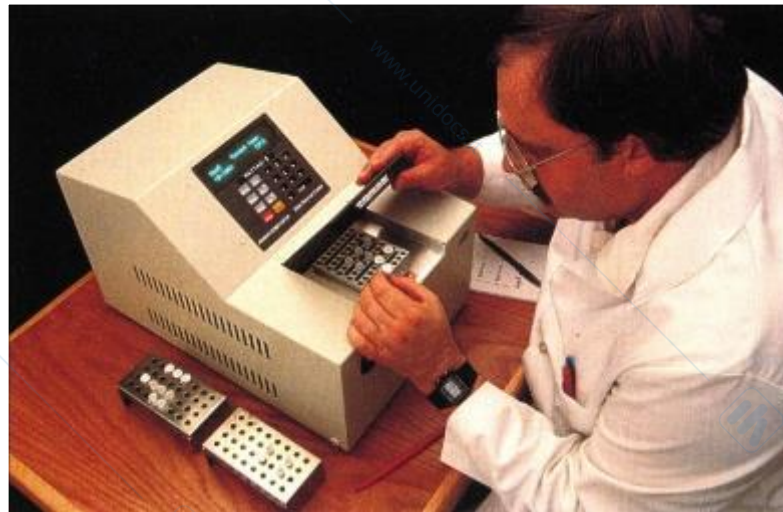
polymerase chain reaction



CHE COSA E' LA PCR?

- E' una tecnica per l'amplificazione SELETTIVA di un particolare segmento di DNA

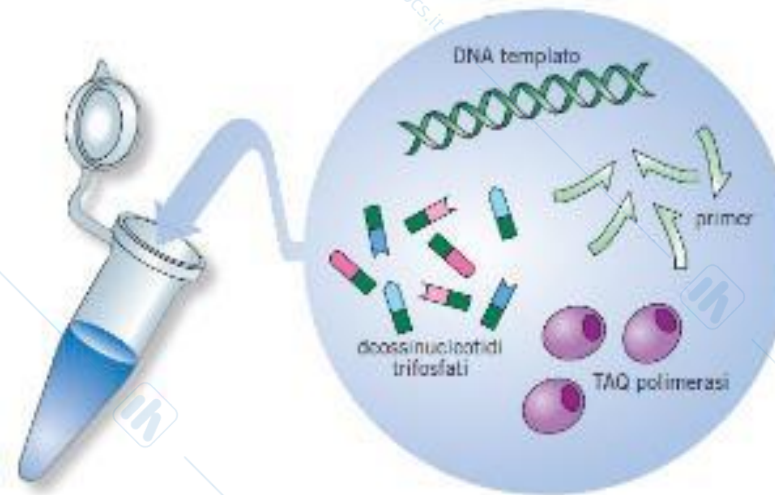
FOTOCOPIATRICE MOLECOLARE



COSA SERVE PER LA REAZIONE?

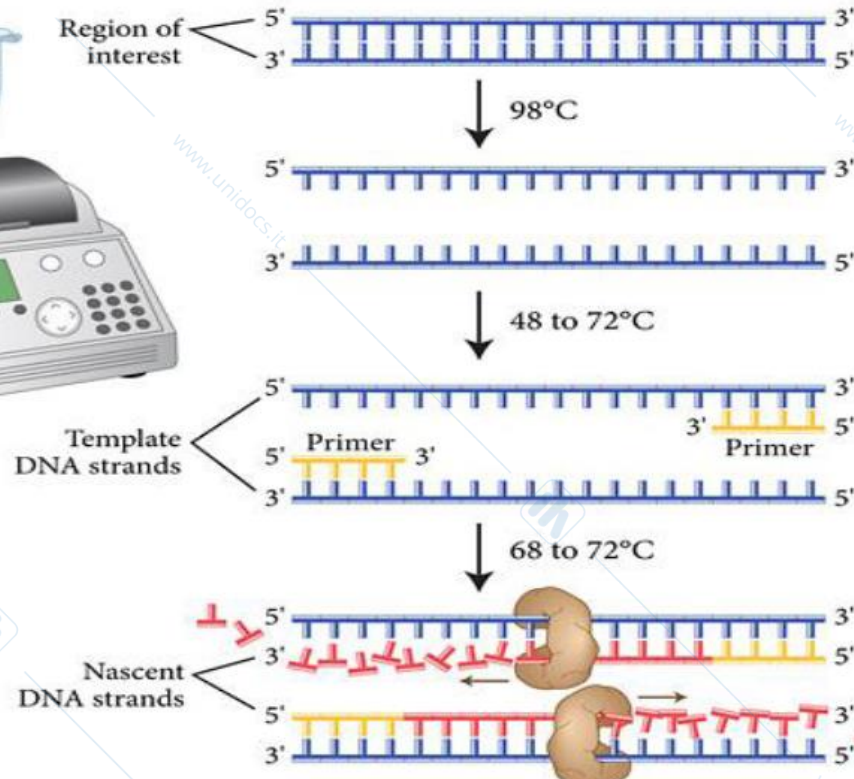
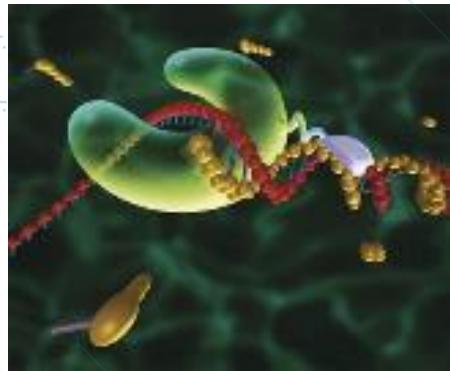
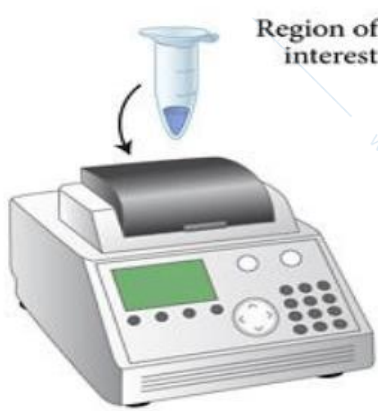
È una sintesi di DNA in vitro

- DNA stampo
- Nucleotidi (dNTPs)
- Tampone di reazione contenente ioni: essenziale la presenza di ioni Mg^{2+}
- Oligonucleotidi innesco (*primers*)
- DNA polimerasi termostabile (*Taq*)



PCR

E' una tecnica che consente di amplificare piccole quantità di DNA in vitro

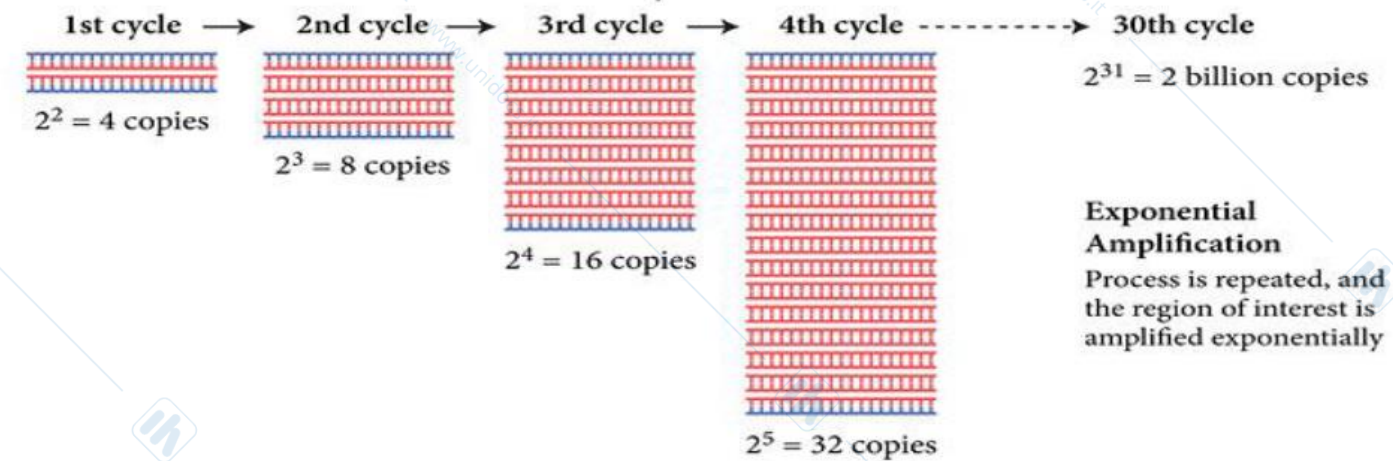


Denaturation
Temperature is increased to separate DNA strands

Annealing
Temperature is decreased to allow primers to base pair to complementary DNA template

Extension
Polymerase extends primer to form nascent DNA strand

DNA polimerasi di *Thermus aquaticus*



Exponential Amplification
Process is repeated, and the region of interest is amplified exponentially

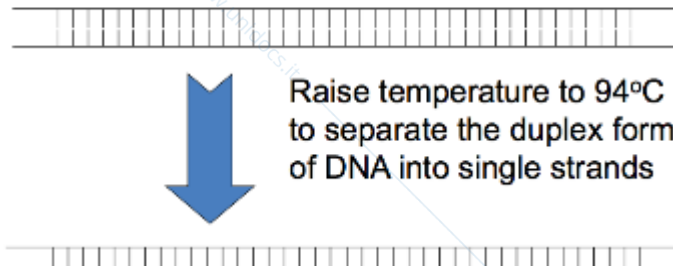
www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari



COSA ACCADE NELLA PROVETTA?

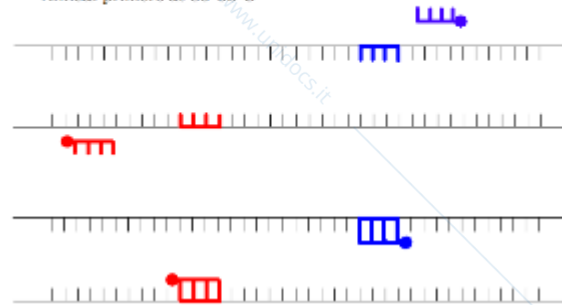
Step 1. Denaturation



DNA a doppia elica denaturato a $T > 94^{\circ} \text{C}$

Step 2. Annealing

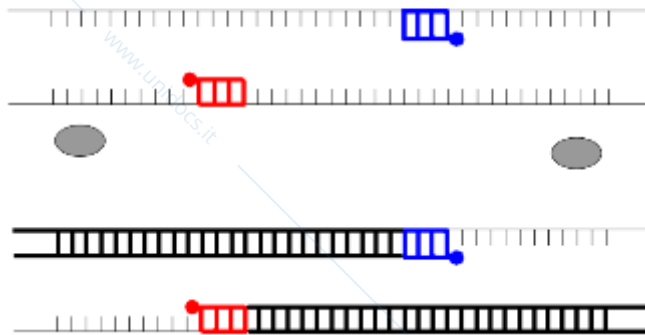
- Anneal primers at $50-65^{\circ}\text{C}$



I primers si legano alle sequenze bersaglio

Step 3. Extension

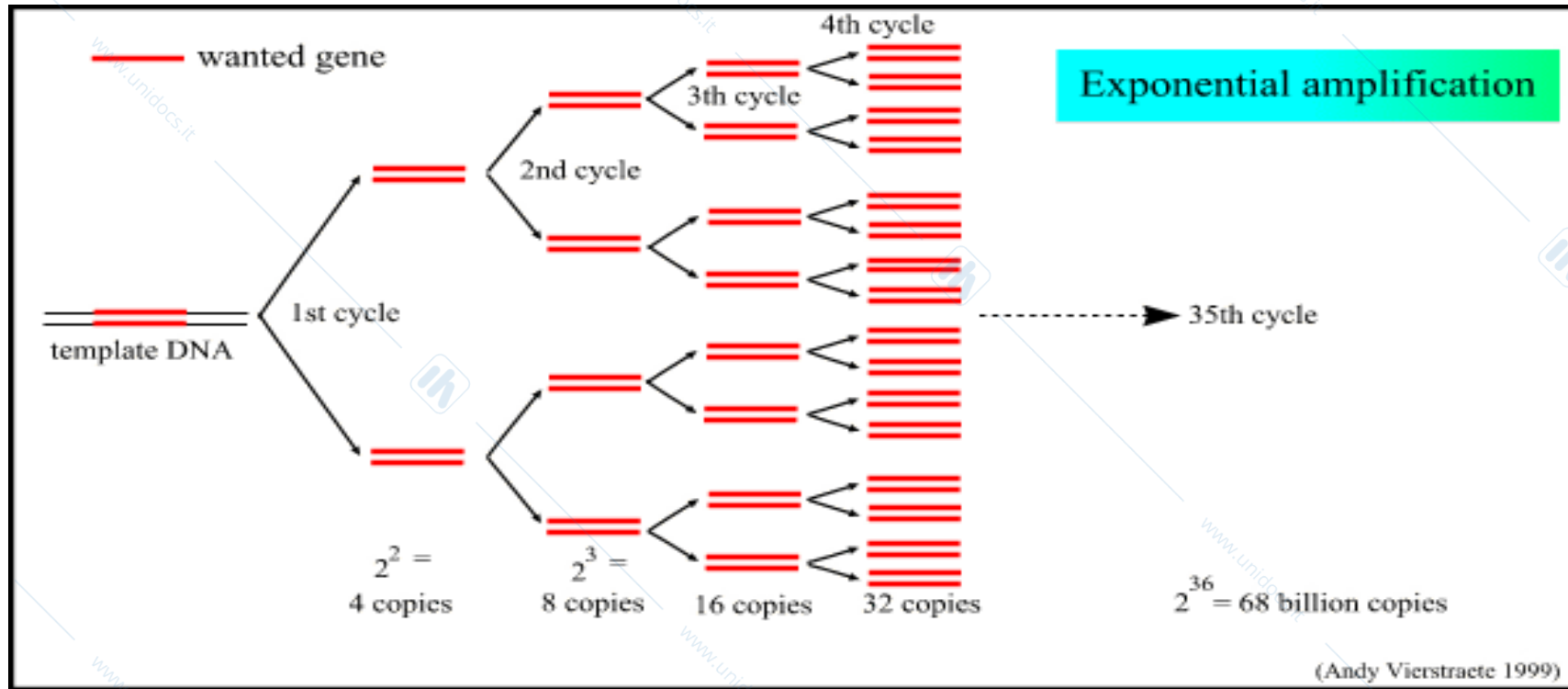
- Extend primers: raise temp to 72°C , allowing Taq pol to attach at each priming site and extend a new DNA strand



La Taq polimerasi allunga la sequenza bersaglio

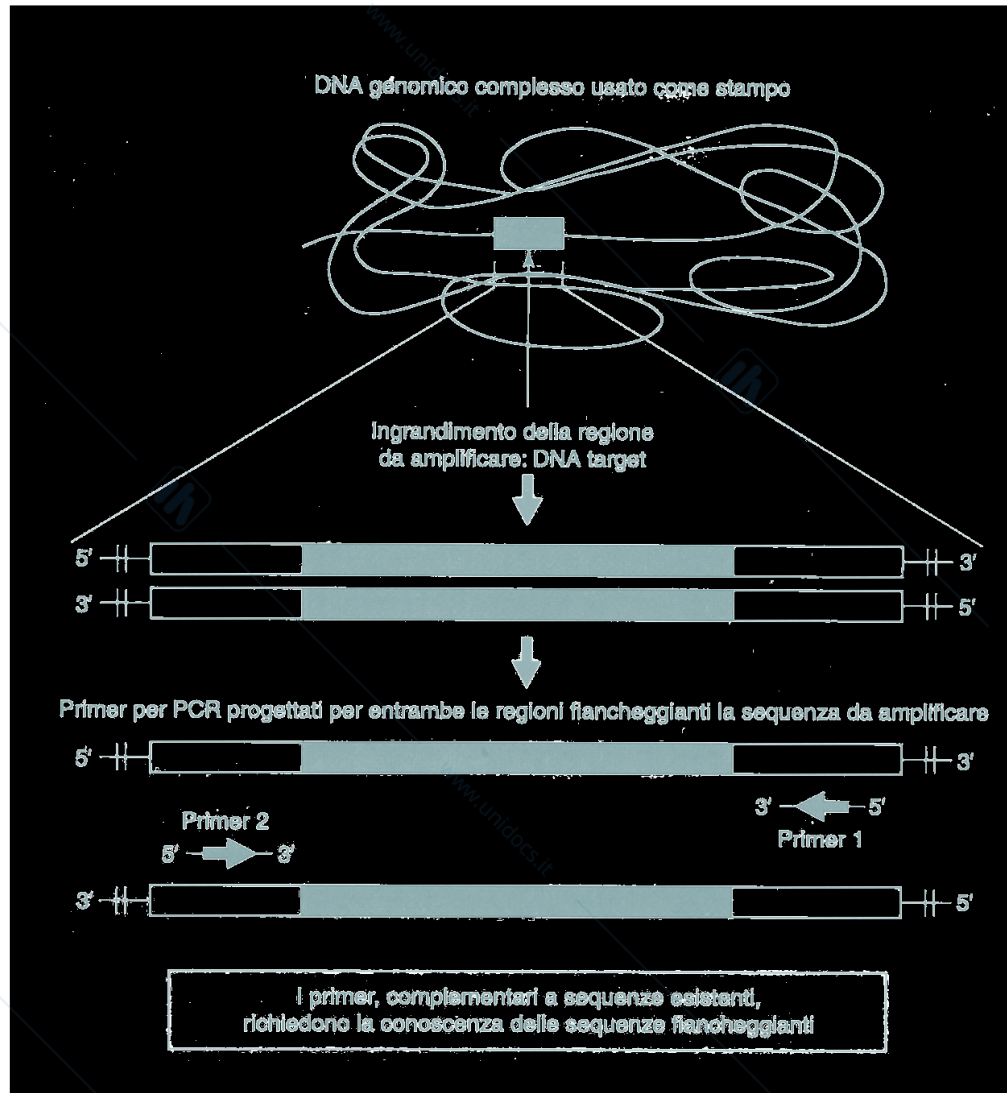
1 ciclo di PCR

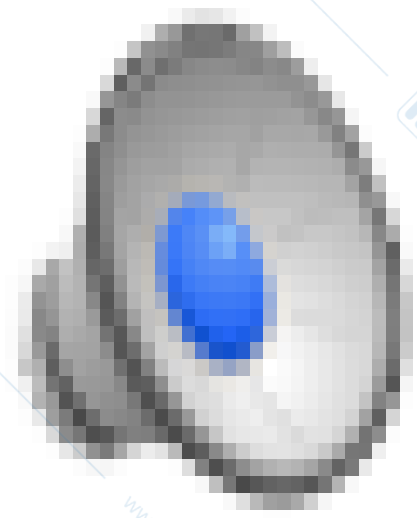
PCR



DISEGNAMO LE COPPIE DI PRIMERS

La loro posizione delimita la regione di DNA da amplificare

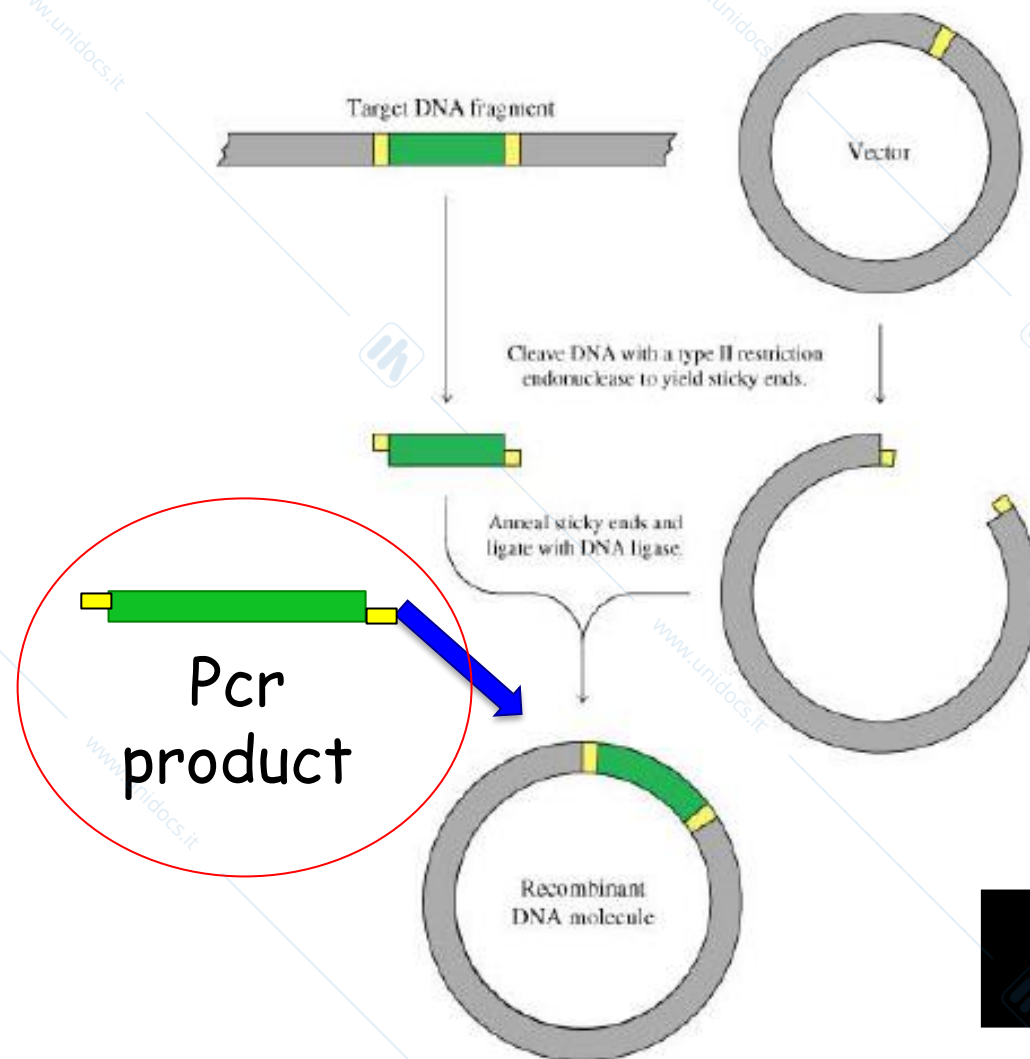




<https://www.youtube.com/watch?v=iQsu3Kz9NYo>



I frammenti di DNA ottenuti tramite digestione o PCR sono inseriti in specifici vettori di espressione opportunamente tagliati in modo da avere estremità adesive perfettamente complementari a quelle dei frammenti da inserire



E' possibile anche isolare la regione codificante del gene che corrisponde all'RNA messaggero e poi amplificarla e clonarla

Estrazione di RNA messaggero

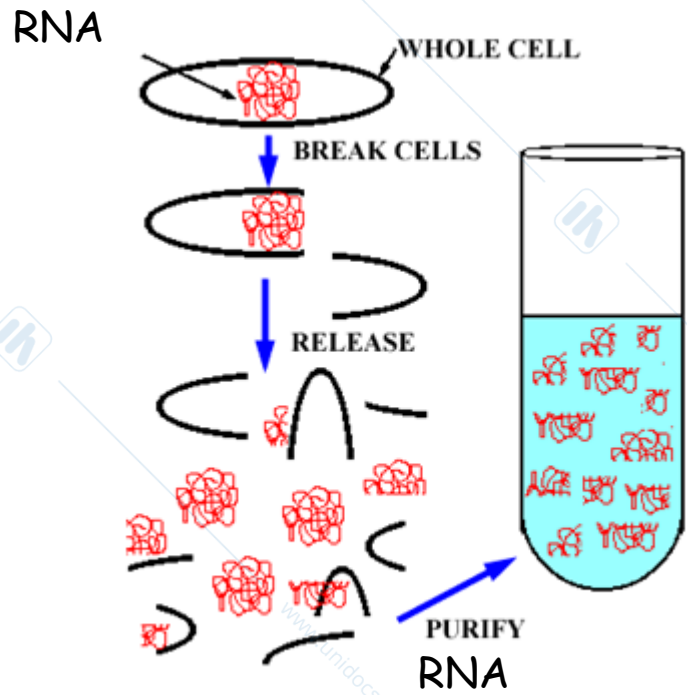
↓
Conversione dell'RNA in cDNA ad opera dell'enzima trascrittasi inversa (produce DNA a partire dall'RNA)

↓
Disegnare dei primers che riconoscono la regione del DNA che deve essere amplificata

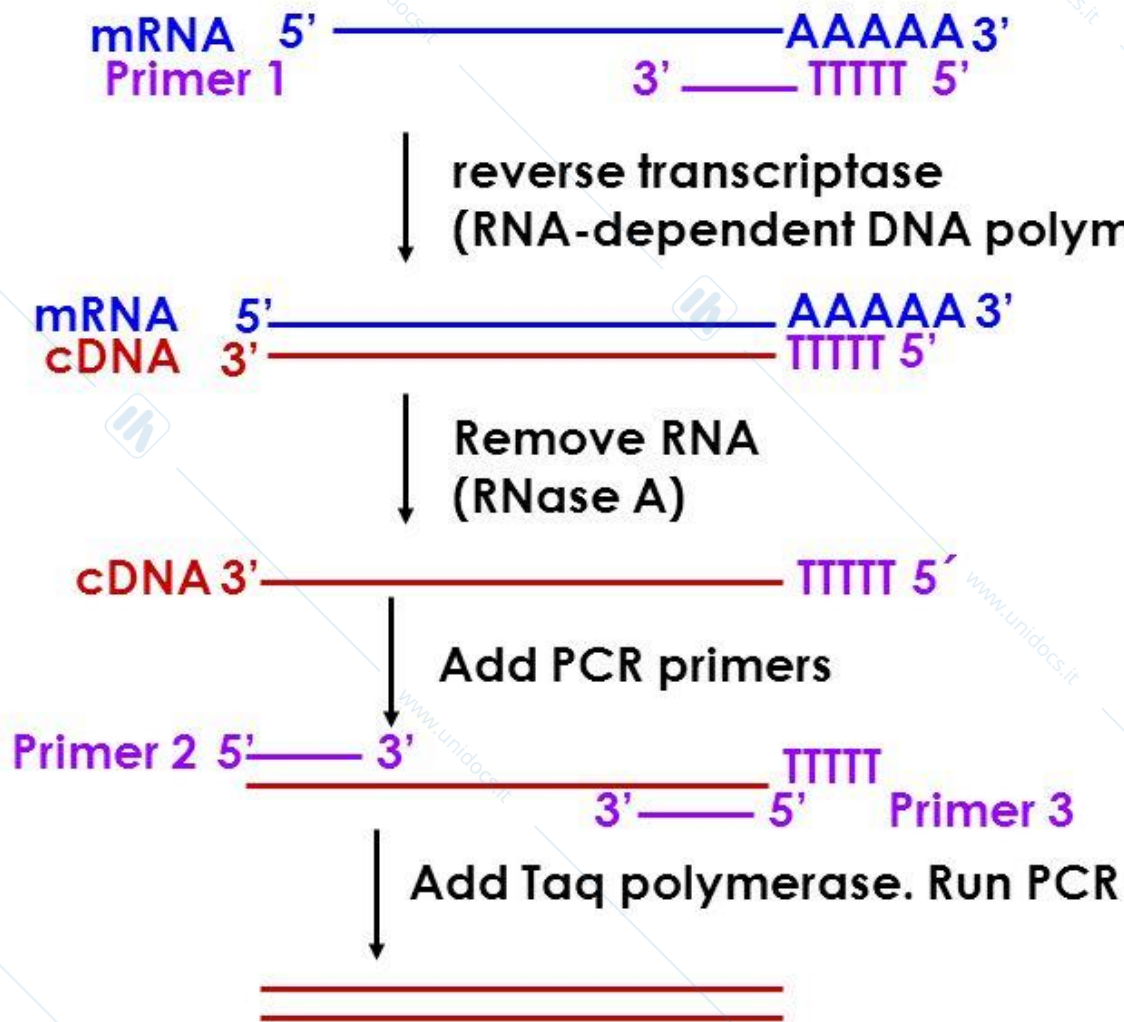
↓
PCR



Estrazione mRNA

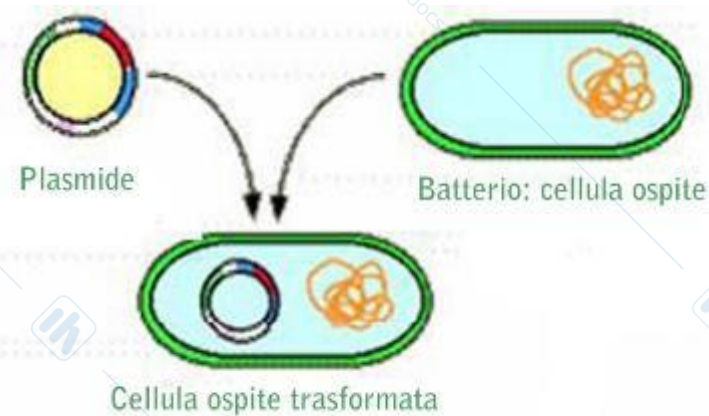


Trascrittasi inversa - PCR (RT-PCR)

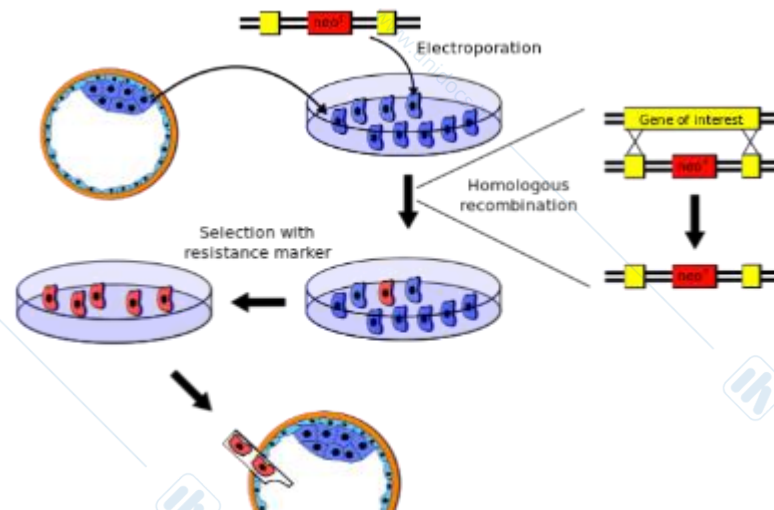


I plasmidi possono essere trasferiti

✓ in una cellula batterica che ne consente l'amplificazione di più copie. Questo processo si chiama **TRASFORMAZIONE** della cellula batterica

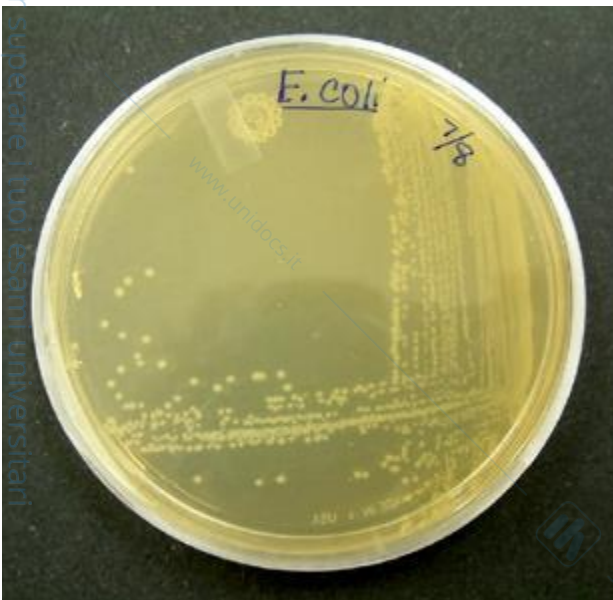
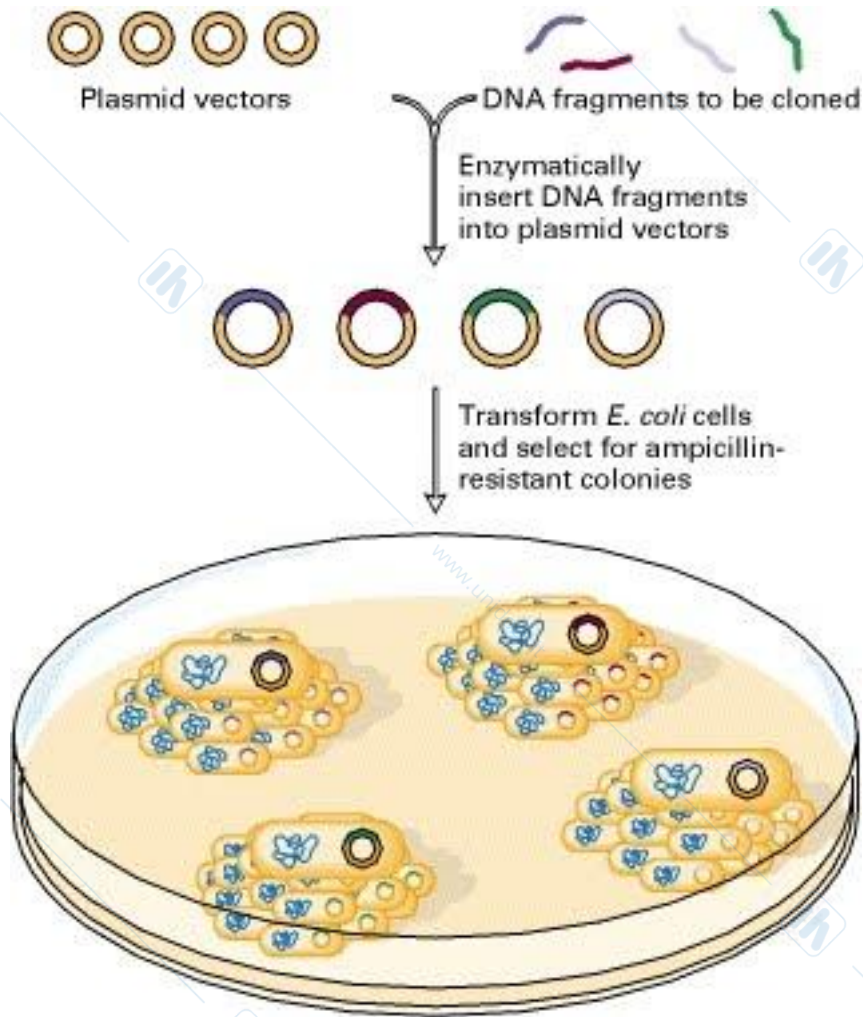


✓ In una cellula eucariotica per studi funzionali del gene: questo processo si chiama **TRAFEZIONE**



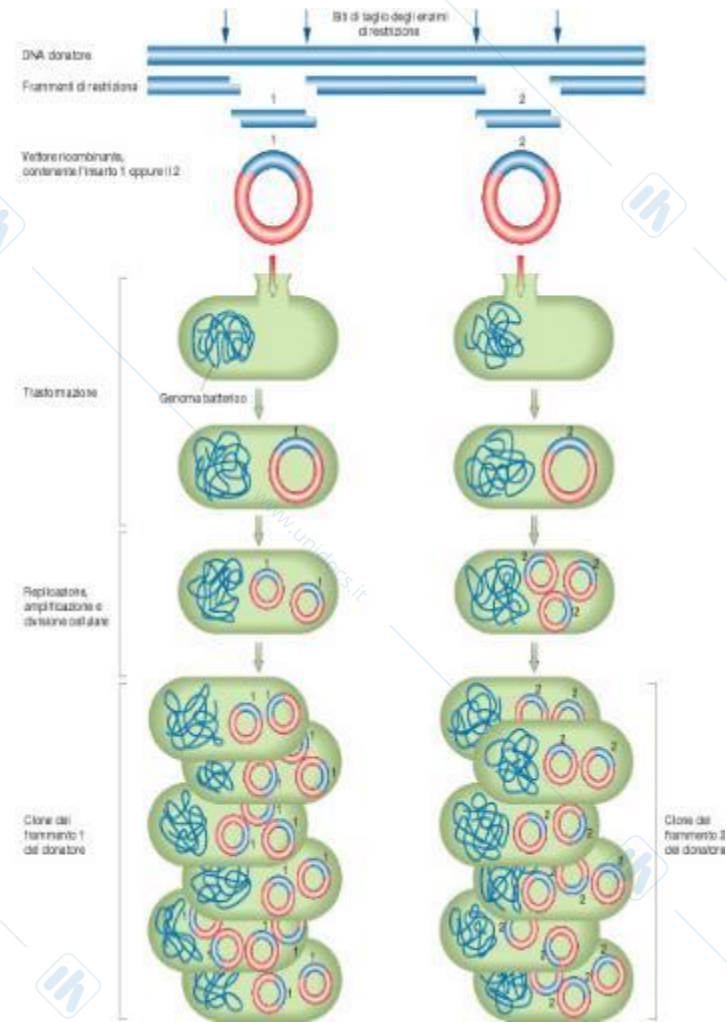
Trasformazione

- Il gene modificato può essere inserito nella cellula batterica (trasformazione)

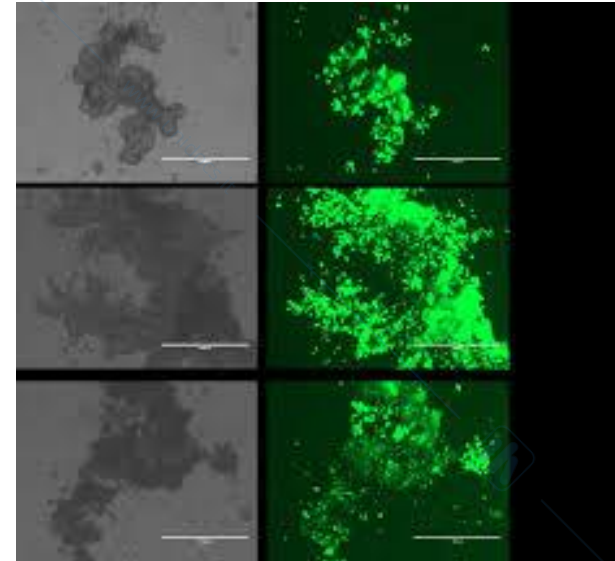
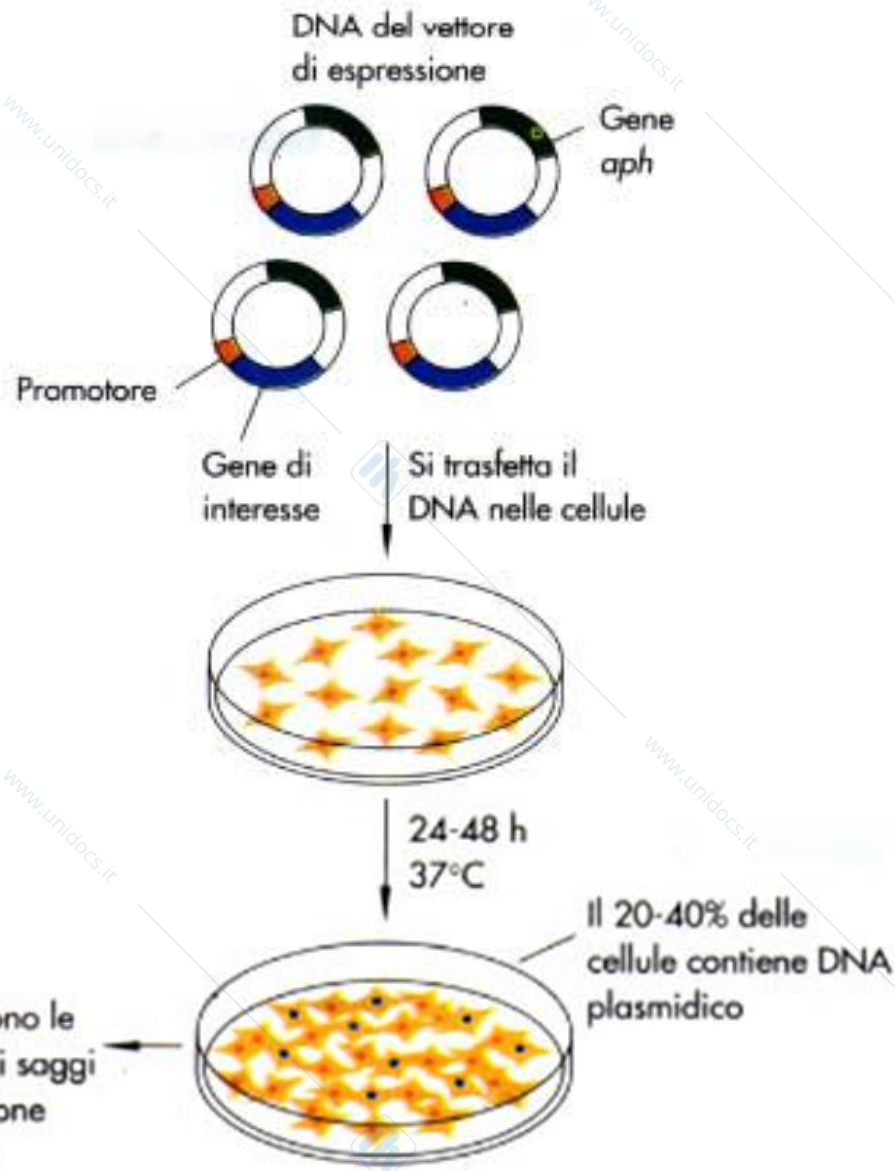


trasferimento del DNA ricombinante nella cellula batterica

- Ciascuna cellula riceve una molecola di DNA ricombinante = **CLONE**
- Dopo la replicazione si possono avere migliaia di copie di DNA ricombinante
- Non appena la cellula ospite si divide, il DNA ricombinante si divide nelle cellule figlie

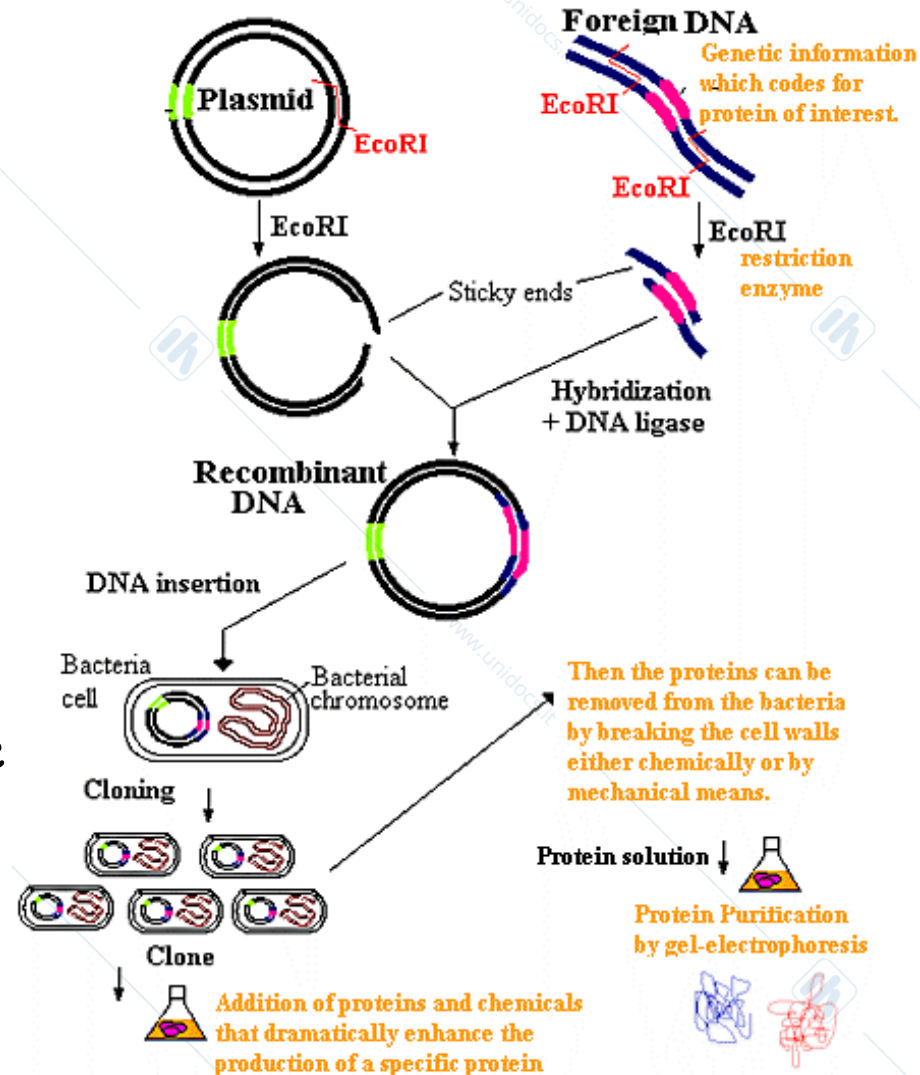


Trasfezione in cellule

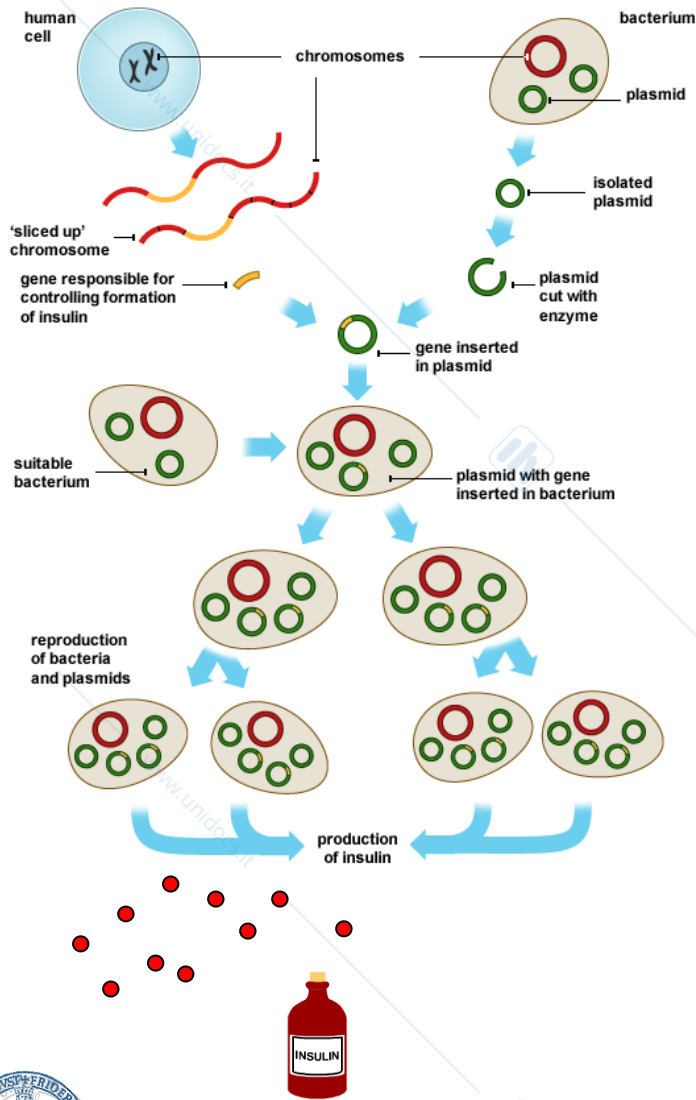


Riassunto della varie fasi del Clonaggio

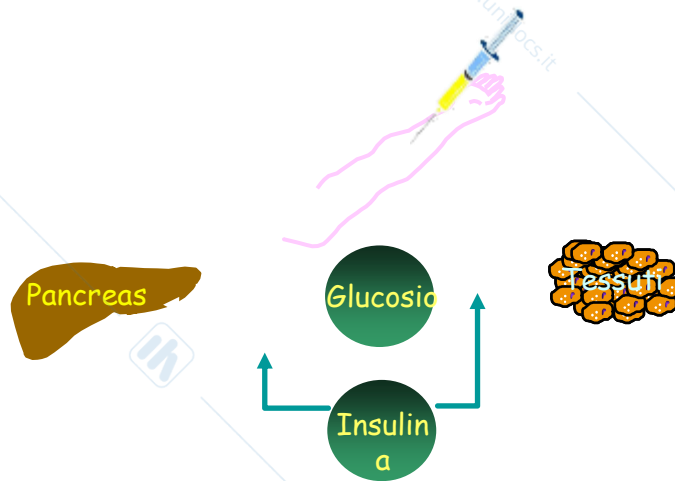
- 1. Tagliare il DNA genomico con un enzima di restrizione oppure amplificare il frammento dal DNA genomico mediante **PCR** o **RT-PCR**
- 2. Tagliare il plasmide con lo stesso enzima di restrizione
- 3. Mettere insieme i due DNA e aggiungere la DNA ligasi.
- 4. Inserire il DNA ricombinante nei batteri mediante trasformazione.
- 5. Crescere i batteri (*E. coli*) che contengono solo il nostro gene.



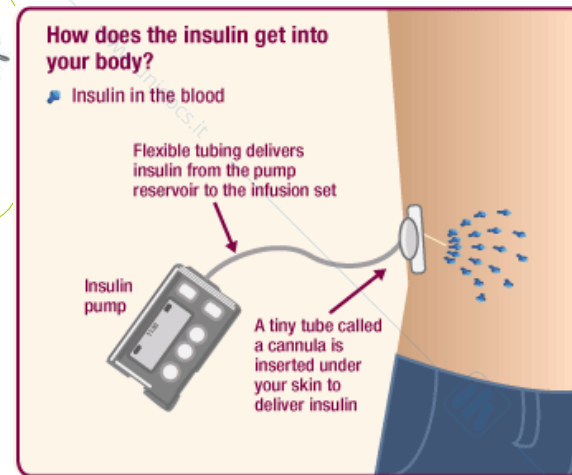
Esempi applicativi del DNA ricombinante



1) Iniezione manuale

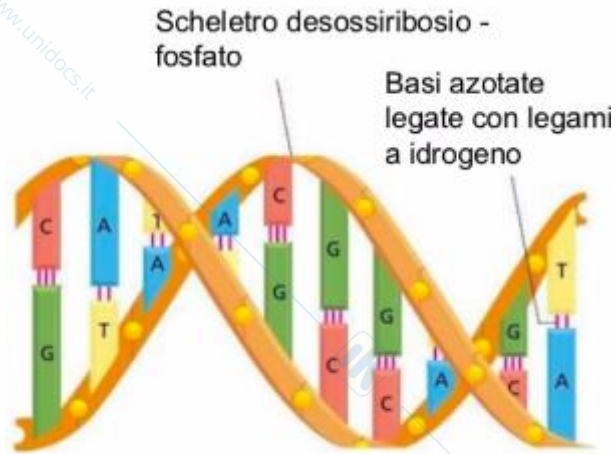


2) Micoinfusori di insulina



Il sequenziamento

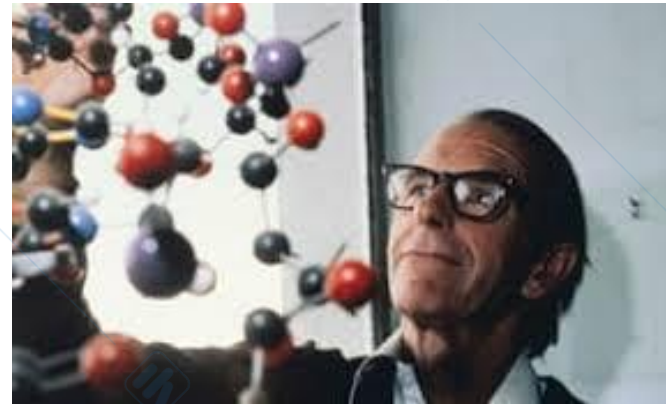
Sequenziare il DNA significa determinare la successione delle basi azotate di uno specifico tratto di DNA



Tratta da: The Molecular Biology Of The Cell di Alberts et al.



Il primo metodo di sequenziamento efficiente fu elaborato da Frederick Sanger nel 1975



A cosa serve il sequenziamento?

- Genomica per lo studio dei genomi di alcune specie e dell'uomo
- Diagnostica
- Ingegneria genetica nell'agricoltura OGM
- Medicina legale per poter identificare una persona con le tecniche di DNA finger printing
- Medicina personalizzata



Progetto Genoma Umano

Il Progetto Genoma Umano prevede l'analisi del genoma attraverso la tecnica del SEQUENZIAMENTO del DNA.



LE TAPPE DEL PROGETTO GENOMA

1977 Gli scienziati americani Allan Maxam and Walter Gilbert e l'inglese Frederick Sanger mettono a punto 2 diversi metodi per sequenziare il DNA, cioè per "leggere" la successione di basi nucleotidiche che lo compongono. **Il metodo di Sanger, oggi automatizzato, è quello tuttora utilizzato.**

1986 Il premio Nobel Renato Dulbecco e Leroy Hood lanciano l'idea di sequenziare l'intero genoma Umano.

1990 Negli Stati Uniti nasce ufficialmente lo Human Genome Project (HGP), sotto la guida di James Watson. Negli anni successivi Regno Unito, Giappone, Francia, Germania, Cina si uniscono al progetto formando un consorzio pubblico internazionale. In Italia il progetto genoma nasce nel 1987 ma si interrompe nel 1995.

1992 Craig Venter lasciò il progetto pubblico. Fonderà una compagnia privata, la Celera Genomics, portando avanti un progetto genoma parallelo.



1999 (Dicembre) Pubblicata su Nature la sequenza completa del cromosoma 22.

2000 (Maggio) pubblicata su Nature la sequenza completa del cromosoma 21.

2001 La bozza completa del genoma umano (che gli inglesi chiamano working draft) è pubblicata su Nature (quella del consorzio pubblico) e su Science (quella della Celera)

Aprile 2003: il progetto è dichiarato finito con due anni di anticipo rispetto a tempi previsti



Metodi di sequenziamento

Prima generazione: metodo Sanger

Seconda generazione: next generation sequencing

Terza generazione: next next generation



Metodi di sequenziamento: vantaggi e svantaggi

Prima generazione: possiamo sequenziare solo una regione di DNA che abbiamo già amplificato con la PCR

Seconda generazione: sequenziamento massivo e parallelo di più geni insieme. Anche intere parti di genoma di più pazienti. Maggiore velocità

Terza generazione: si può sequenziare la singola cellula (*single cell sequencing*), anche qui non amplificando. In questo modo si può studiare l'eterogeneità di un campione



Metodi di sequenziamento: vantaggi e svantaggi

Prima generazione: sequenziamento di piccole regioni del genoma

Seconda generazione: più rapida, analisi contemporanea di più geni

Terza generazione: metodo ancora usato solo in ricerca



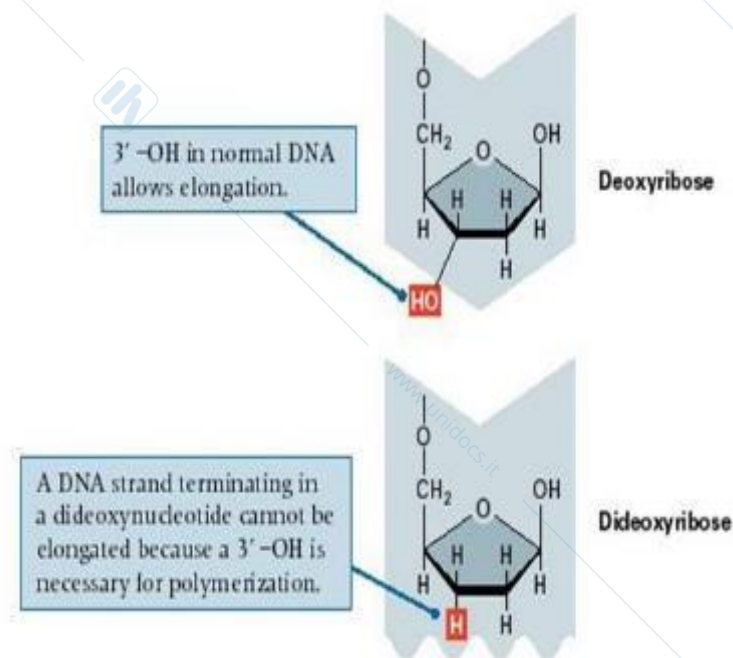
Sequenziamento secondo SANGER

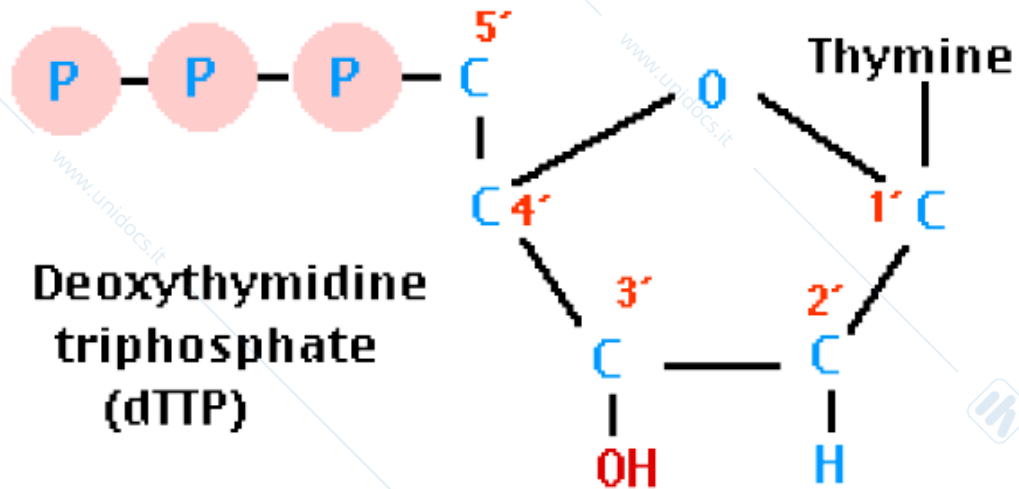
La rivoluzione introdotta nel metodo di Sanger si basa sull'impiego dei **nucleotidi terminatori di catena**, ovvero **didesossinucleotidi (ddNTP)**:

rispetto ai nucleotidi usati dalle cellule per la sintesi del DNA (**dNTP**), i ddNTP sono privi del gruppo 3'-OH dello zucchero, che è necessario per formare il legame fosfodiesterico con il nucleotide successivo.

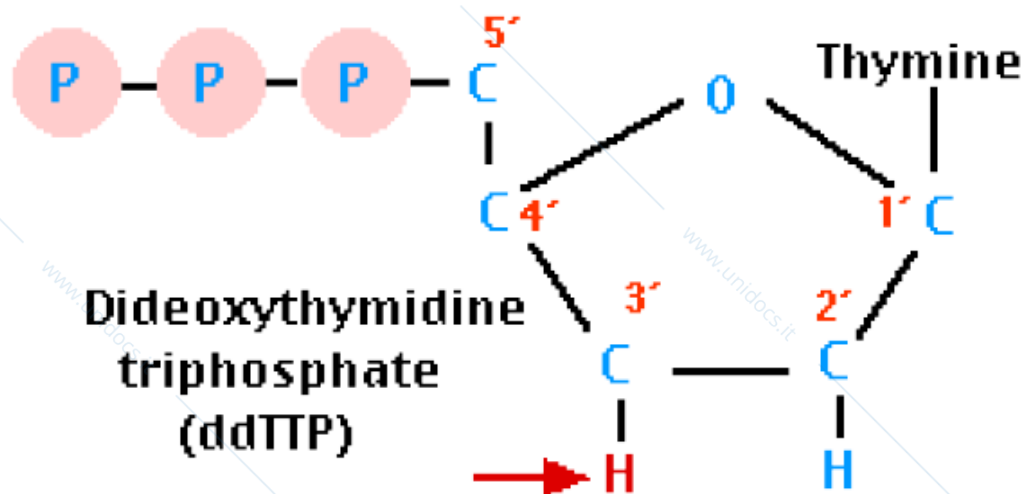
Una volta incorporati nella catena nascente di DNA, i ddNTP causano l'**interruzione della sintesi**.

Deoxy- vs. Dideoxy





deoxy NTPs have a 3' hydroxyl group
...so chain elongation can occur

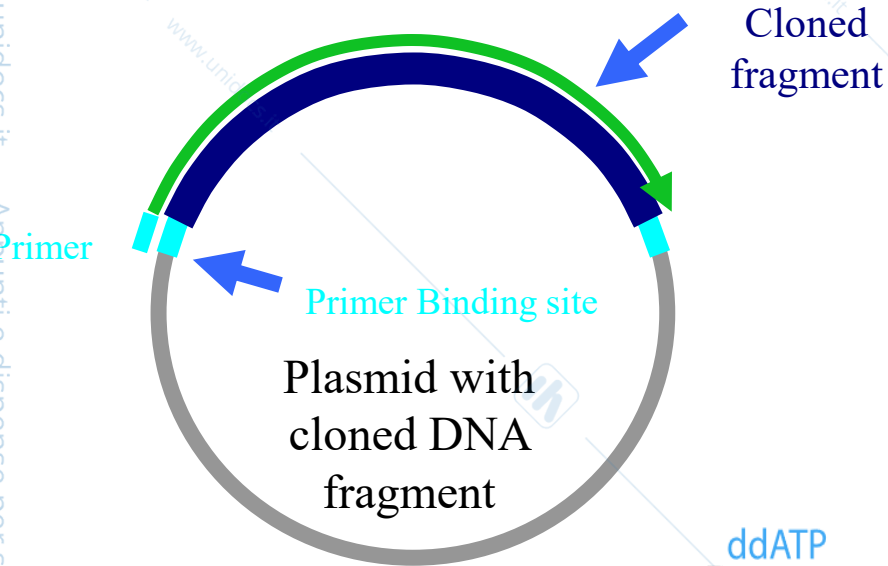


dideoxy NTPs don't have a 3' hydroxyl group
...so when this NTPs is added, chain elongation terminates

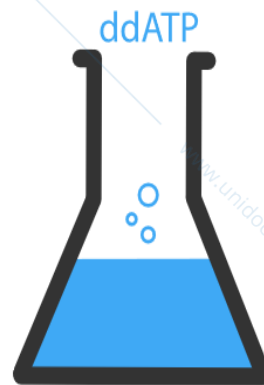


Sequenziamento Sanger

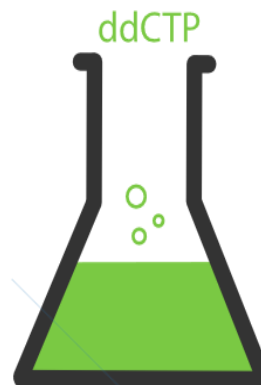
Vengono allestite 4 reazioni dove in ognuna viene utilizzata un dideossinucleotide marcato diverso capace di terminare la reazione



dATP + dCTP + dGTP + dTTP
DNA Polymerase
Template DNA
Primer



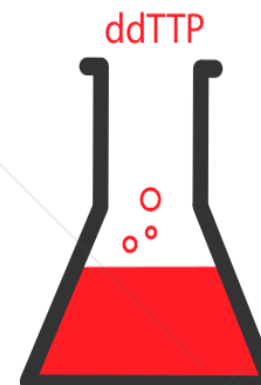
ACTCAGATGCT
ACTCAGA
ACTCA
A



ACTCAGATGCT
ACTCAGATGC
ACTC
AC



ACTCAGATGCT
ACTCAGATG
ACTCAG



ACTCAGATGCT
ACTCAGAT
ACT



- ✓ Al procedere della reazione, vengono incorporati nel nuovo filamento sia **dNTP** normali, che permettono alla reazione di proseguire, sia **ddNTP** che bloccano la sintesi
- ✓ al termine della reazione, si avrà una miscela di filamenti con lunghezza diversa, a seconda di dove è avvenuto l'inserimento del ddNTP terminatore di catena.

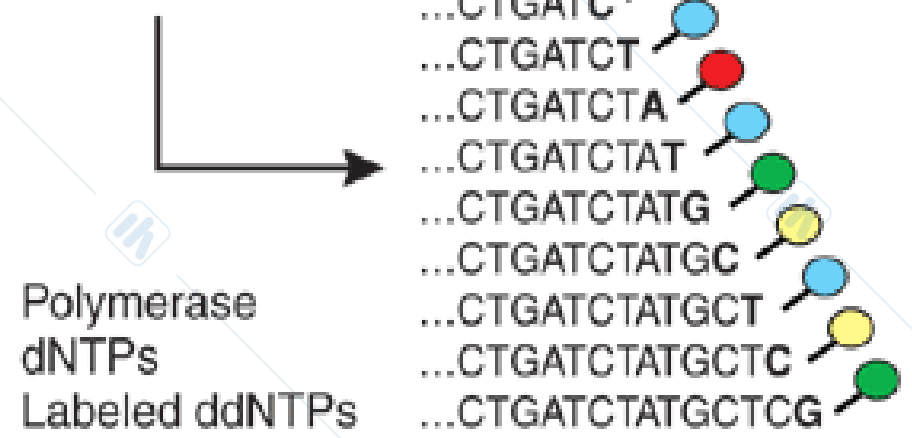


✓ I frammenti di DNA sintetizzati si separano grazie all'elettroforesi su gel

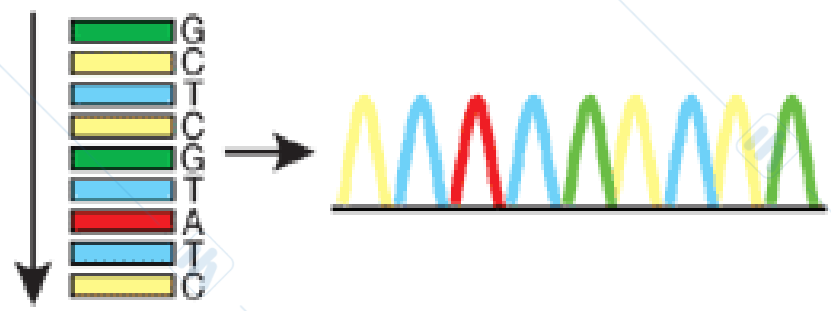
✓ I diversi frammenti vengono ordinati in base alla loro lunghezza: la disposizione dei frammenti svelerà la sequenza dei nucleotidi e il frammento del DNA stampo che si voleva sequenziare

Cycle sequencing

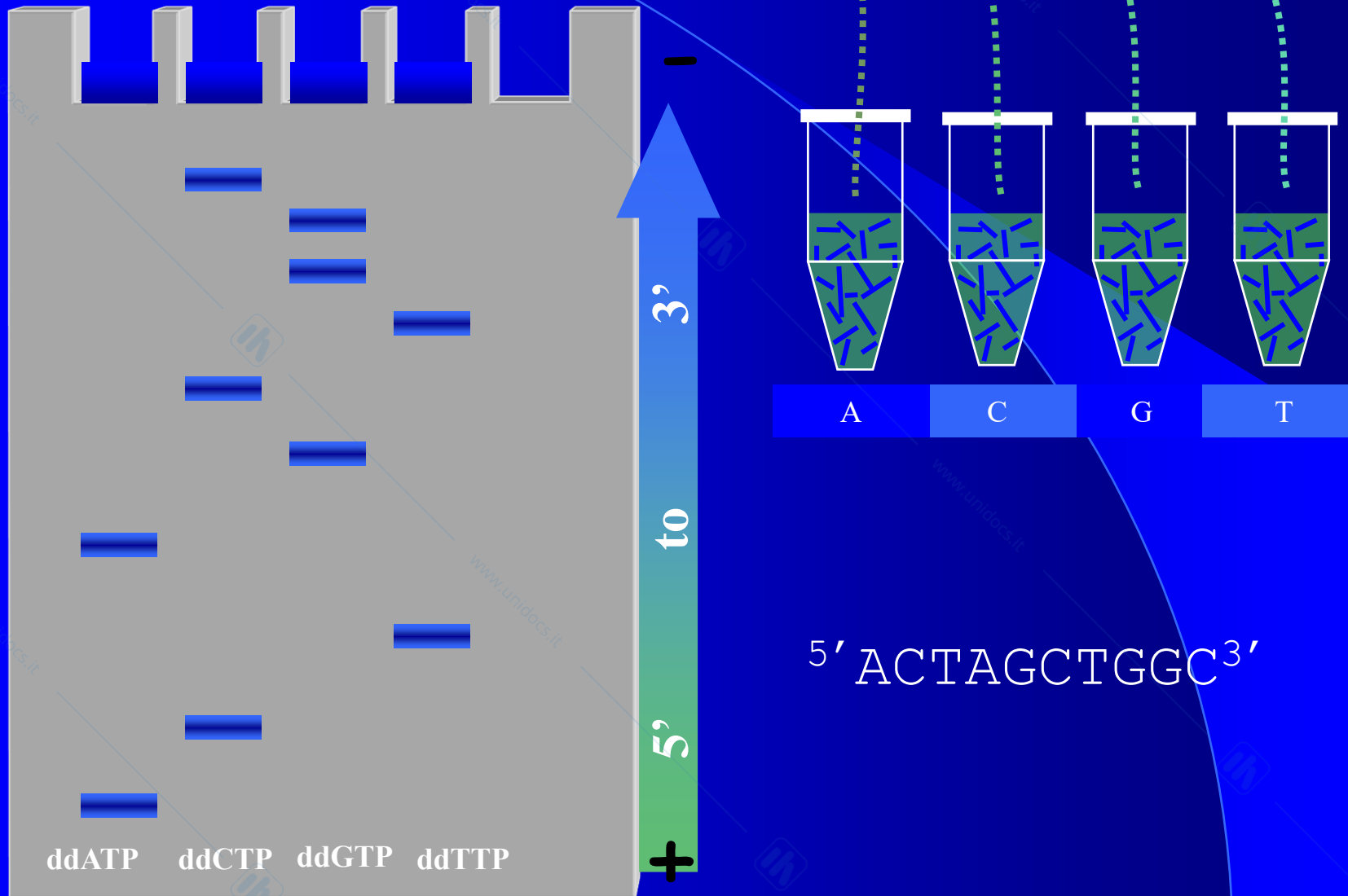
3'-... GACTAGATACGAGCGTGA...-5' (template)
5'-... CTGAT (primer)



Electrophoresis (1 read/capillary)

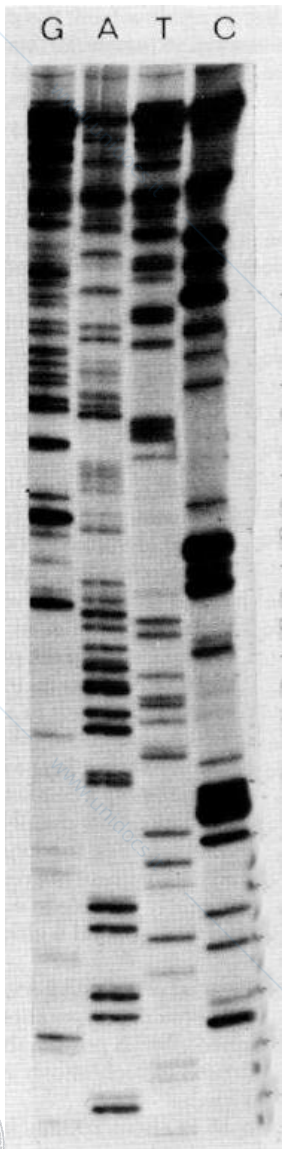


Separation of Fragments:



©2001 Timothy G. Standish

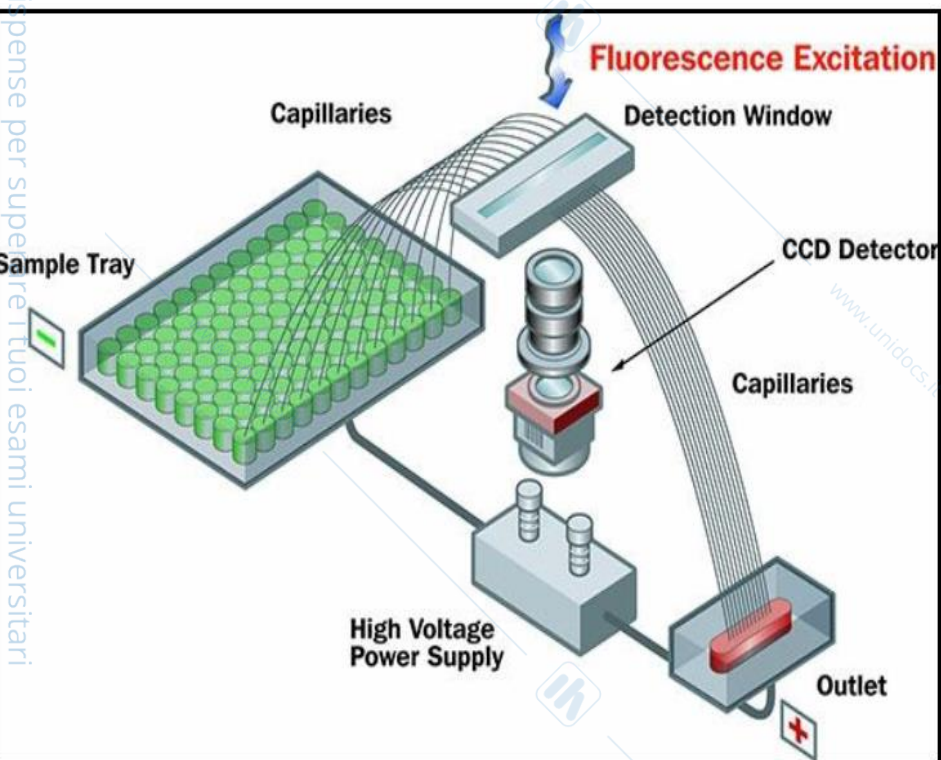
Sviluppo di una lastra autoradiografica



<https://www.youtube.com/watch?v=sRt6fS77DQQ>



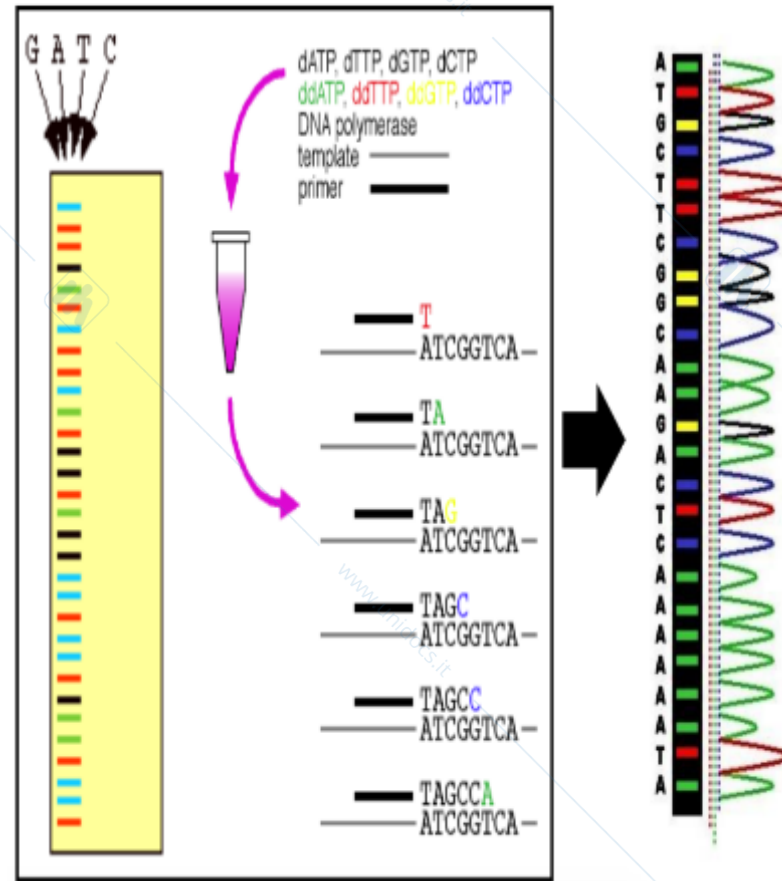
Negli anni, il metodo di Sanger è stato ottimizzato con l'impiego dell'**elettroforesi capillare** (in cui il gel di separazione è inserito in un tubo capillare) e con lo sviluppo di **sequenziatori automatici** che uniscono la sensibilità della PCR all'uso di ddNTP legati a molecole fluorescenti.



Questo sistema offre il grande vantaggio di non dover più preparare quattro reazioni separate, ma può svolgersi contemporaneamente per tutti i nucleotidi in un'unica provetta.

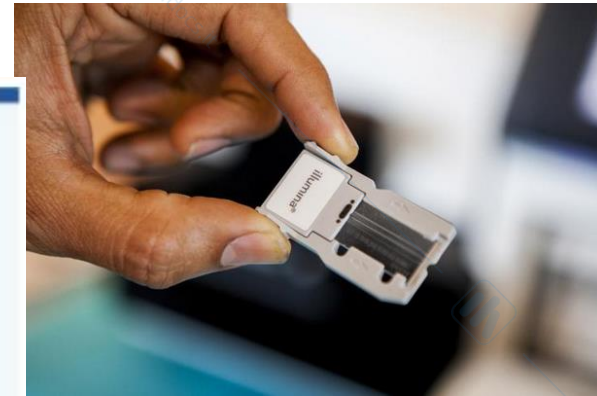
Ogni ddNTP è infatti associato a un colore diverso e un raggio laser permette di stabilire l'identità del nucleotide via via che viene inserito nel filamento sintetizzato dalla PCR. Il risultato è una sequenza di picchi di quattro colori diversi (cromatogramma), uno per ogni nucleotide.

Fluorescent DNA sequencing

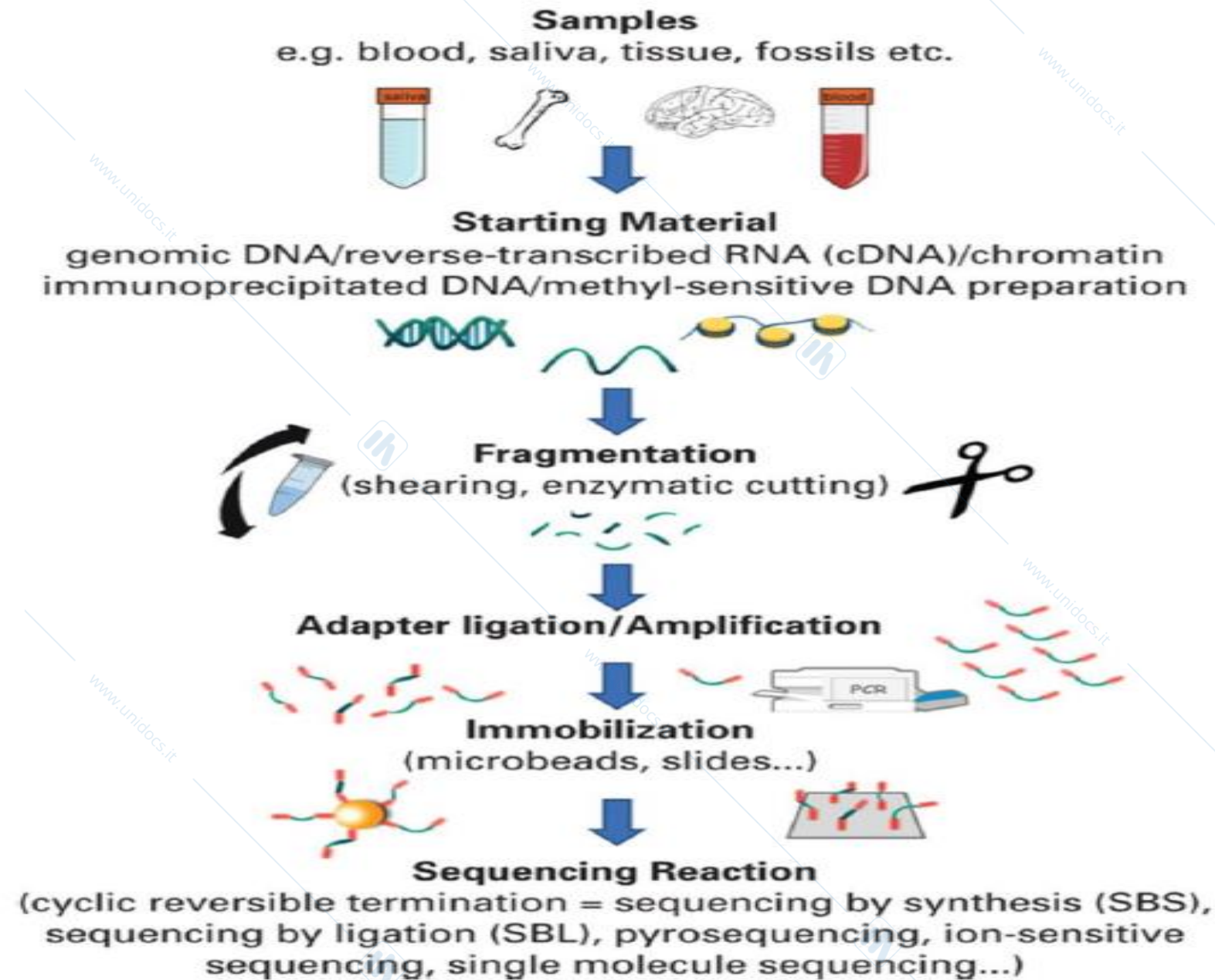


NGS: Next generation Sequencing

Advances in Sequencing Technology



Next Generation Sequencing



2a generazione “next-generation sequencing (NGS)”

Il principale vantaggio è la possibilità tecnica di produrre un volume enorme di dati a **costi** estremamente più bassi ed in **tempi** estremamente più rapidi



Tra le nuove tecnologie, il **Next Generation Sequencing** (chiamata comunemente **NGS**) è quella che più di tutte ha rappresentato un'evoluzione del metodo Sanger.

I primi sequenziatori NGS commerciali sono stati introdotti sul mercato nel 2005 e oggi fanno parte degli strumenti di base di molti laboratori di ricerca genetica.



Le tecniche di NGS permettono di sequenziare:

•DNA genomico:

- Intero genoma (la sequenza completa - piccoli genomi)
- Esoma (solo la parte di DNA trascritto in RNA, esoni)
- Geni mirati
- Ampliconi (solo prodotti PCR)

•Trascrittoma:

- RNA totale
- mRNA
- small RNA (<30 nt)

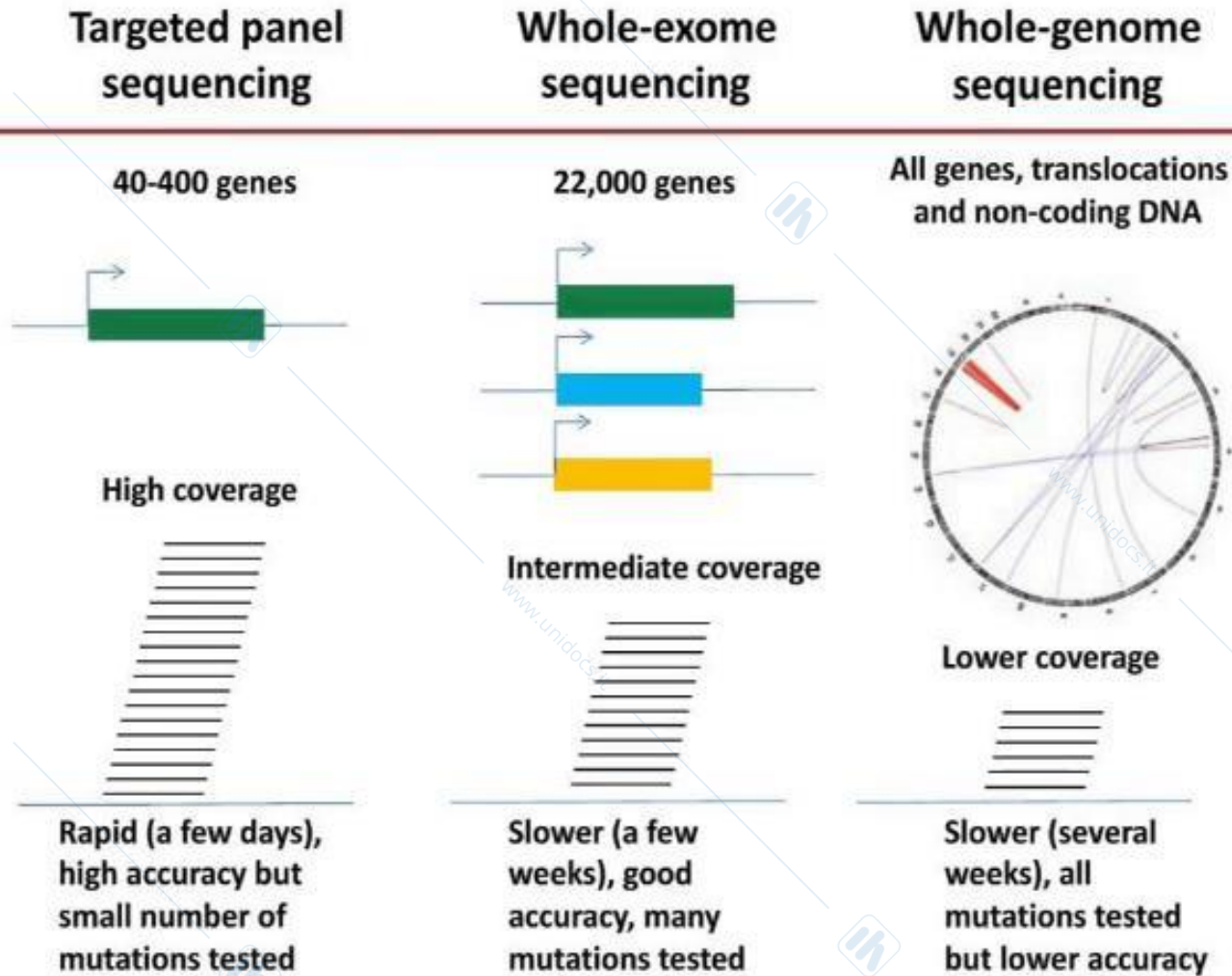
•Epigenoma:

- ChIP-Seq (*Chromatin immunoprecipitation sequencing*: DNA o RNA a cui sono legati specifiche proteine)
- Metil-Seq (studio del pattern di metilazione del DNA)



NEXT GENERATION SEQUENCING

Può essere utilizzata per sequenziare l'intero genoma (**Whole exome sequencing**) oppure solo porzioni specifiche (**targeted sequencing**)



- ✓ Esistono diversi tipi di sequenziatori NGS, spesso identificati con il nome della compagnia che li ha sviluppati.
- ✓ I principali sono: **Illumina** e **Ion Torrent**



Fasi del sequenziamento

library

- Frammentazione
- Legame adattatori

Template preparation

- Serve a raggiungere una quantità di DNA stampo sufficiente per la lettura del sequenziamento

sequencing

- Sequencing by synthesis
- Lettura del segnale

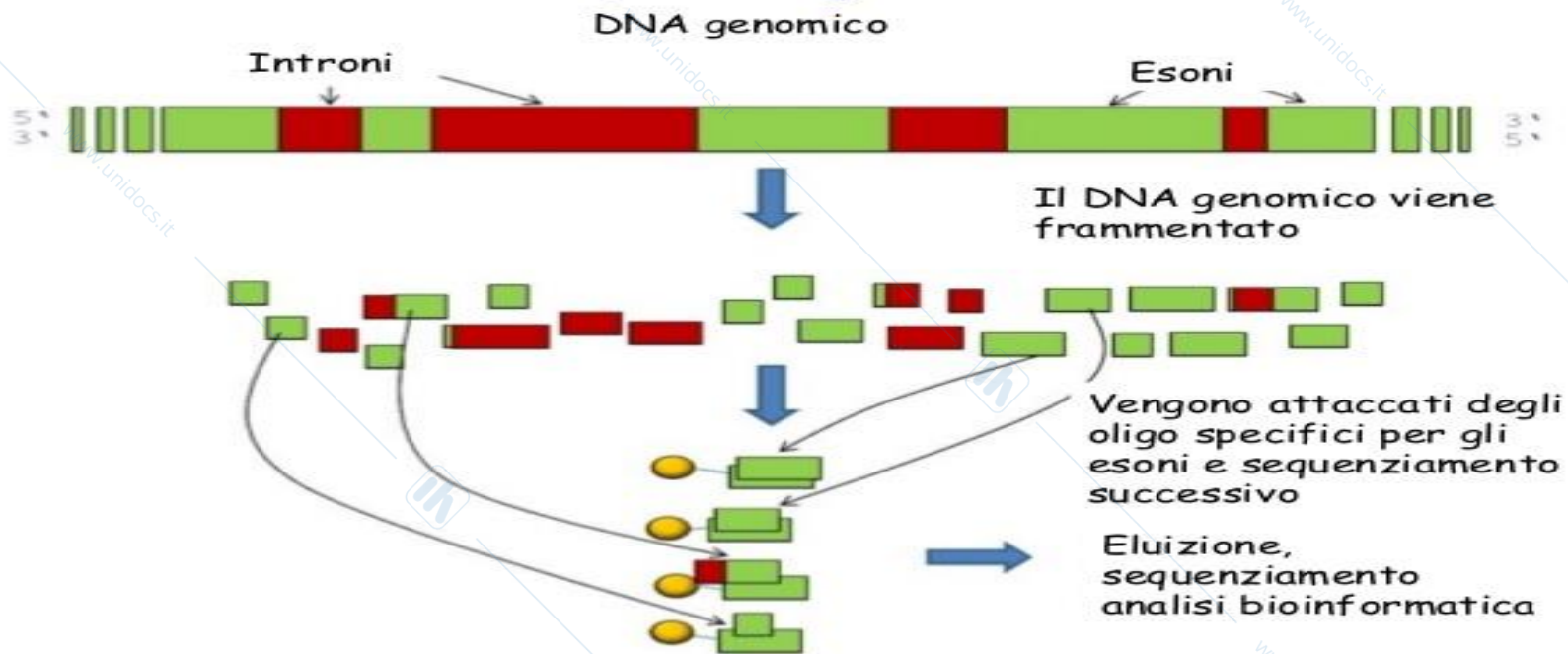


- ✓ Prima fase del sequencing consiste nella preparazione della libreria

Una libreria NGS consiste in un set di frammenti di acidi nucleici coniugati con sequenze terminatrici (adattatori)



Exome sequencing: come funziona



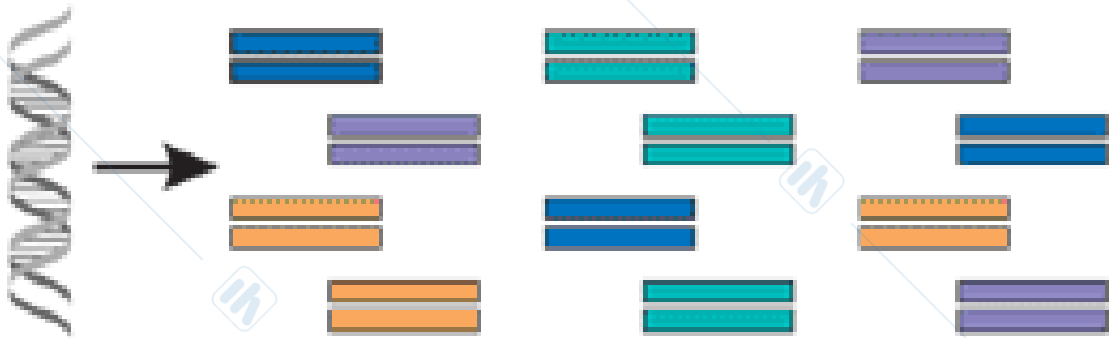
Le librerie vengono usate per generare un DNA a singolo filamento (ssDNA) che servirà come stampo per il successivo sequenziamento



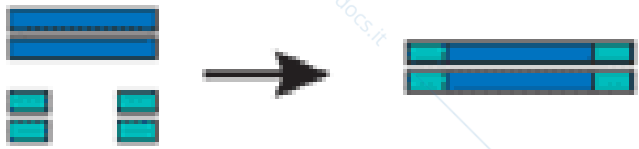


b

DNA fragmentation

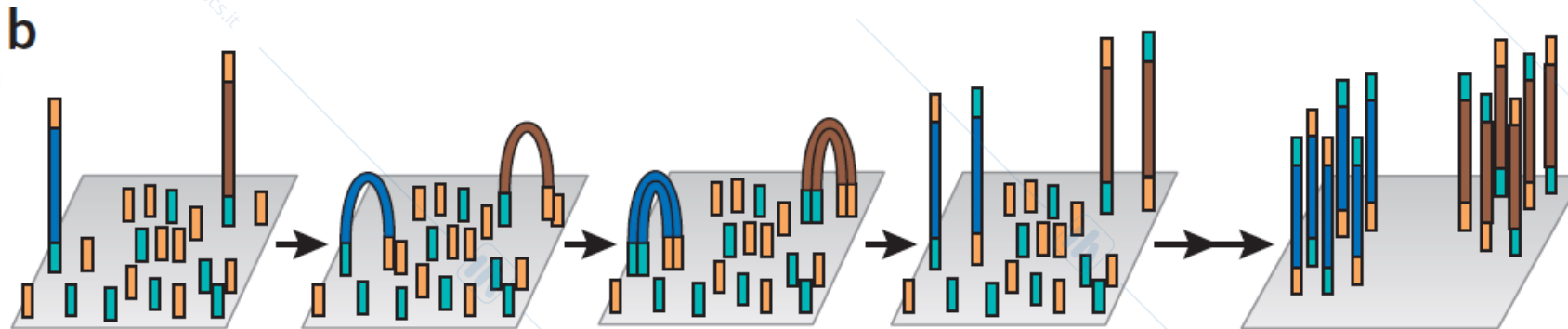
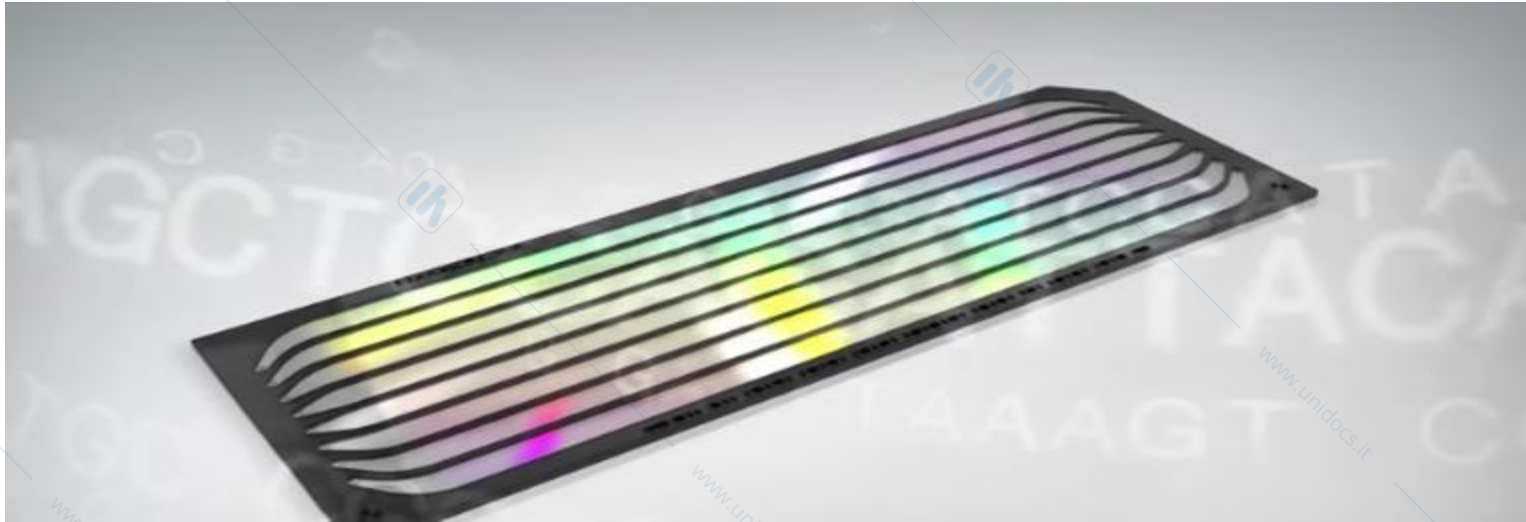


In vitro adaptor ligation

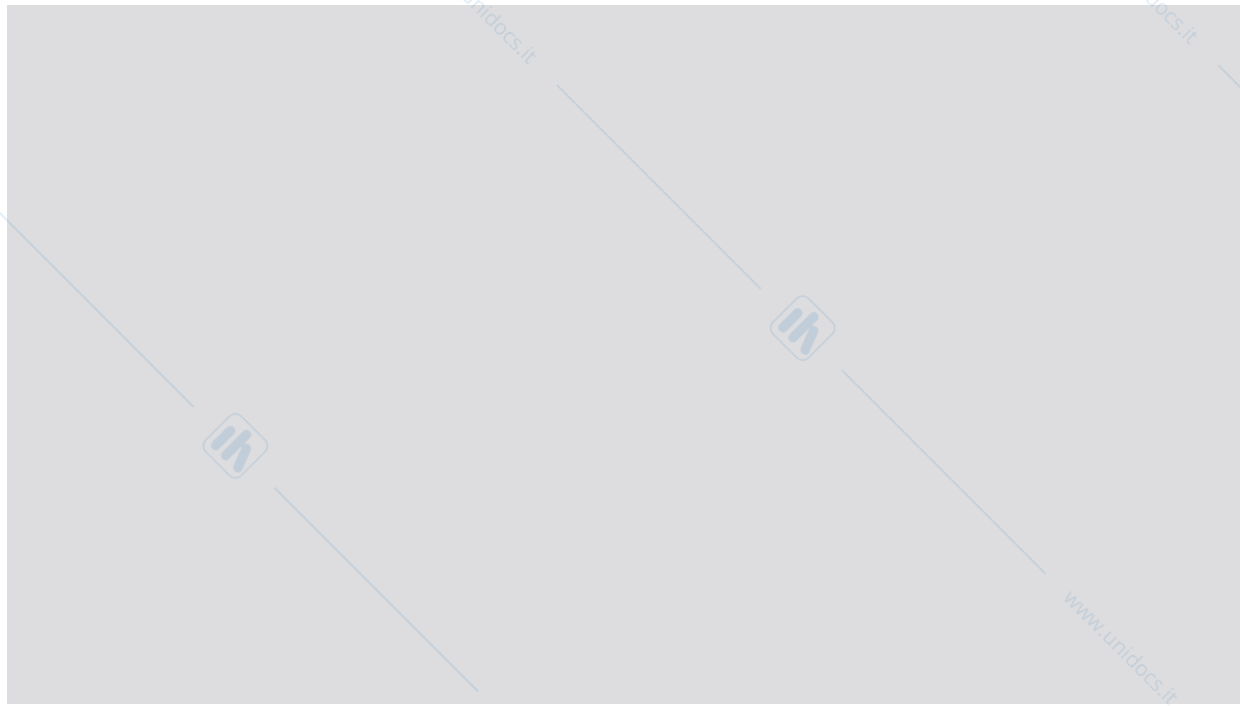


Le due tecnologie più diffuse del NGS (**Illumina e IonTorrent**) prevedono due differenti modalità di generazione del ssDNA:

- **Illumina:** la libreria è fissata su un supporto solido (Flow Cell) sul quale sono stati sintetizzati e ibridati primers complementari agli adattatori;



ION TORRENT



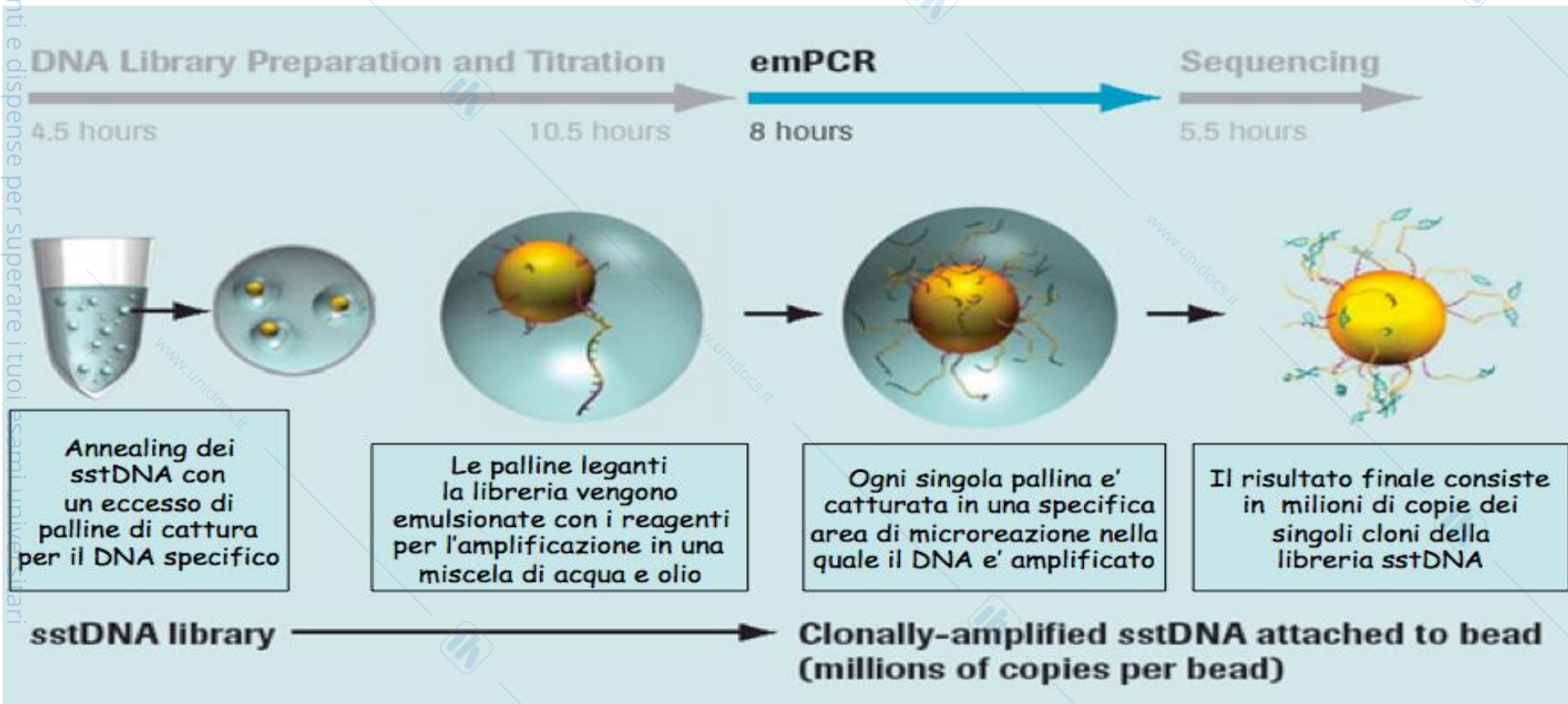
<https://www.youtu.be/WYBzbXlfuKs>



IonTorrent:

la libreria è sottoposta ad un processo di PCR ad emulsione con piccole gocce di soluzione oleosa

ogni singola molecola di libreria entra in contatto con una biglia magnetica ricoperta di primers complementari agli adattatori



La tecnologia Ion Torrent

CHIP



Jonathan Rothberg
Fondatore Ion
Torrent Company

Personal Genome Machine (PGM)



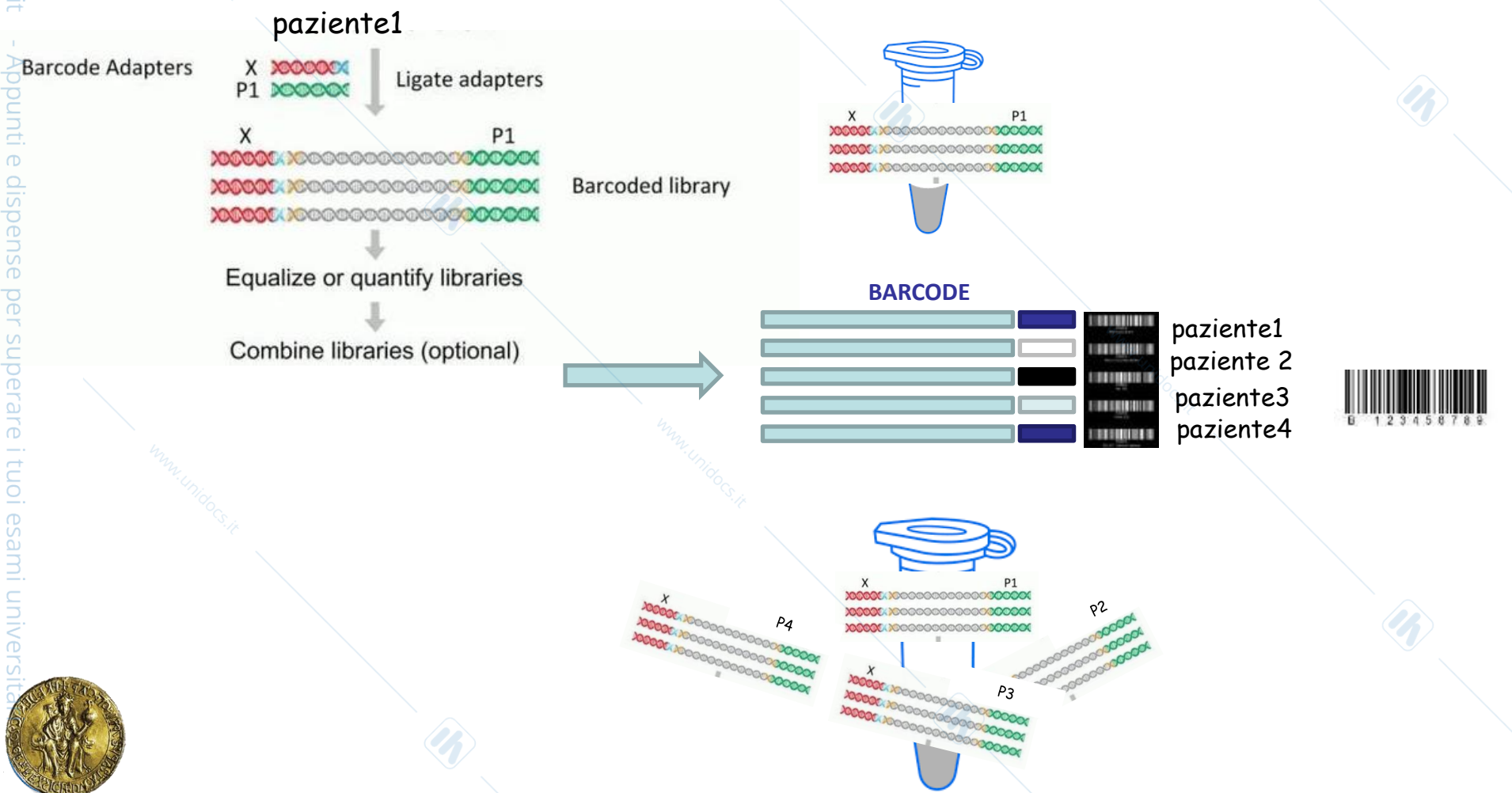
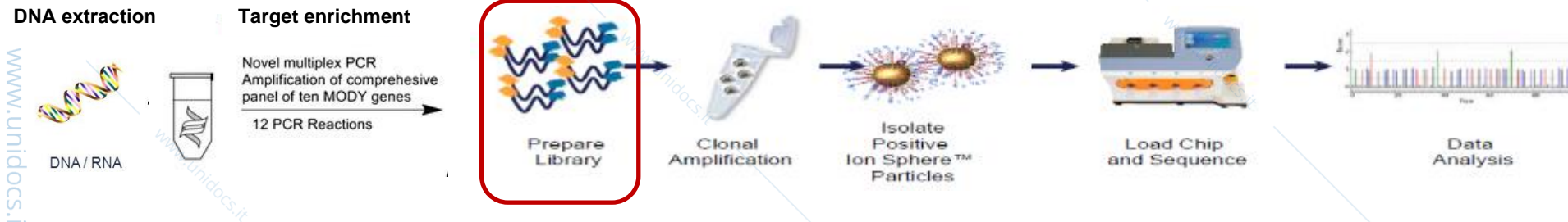
“The chip is the machine”

- ✓ Semplice
- ✓ Poco costosa
- ✓ High-throughput
- ✓ Veloce
- ✓ Flessibile

- ✓ Solo 10 ng DNA
- ✓ DNA di bassa qualità (FFPE)



2. Library preparation



www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

www.unidocs.it

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

www.unidocs.it

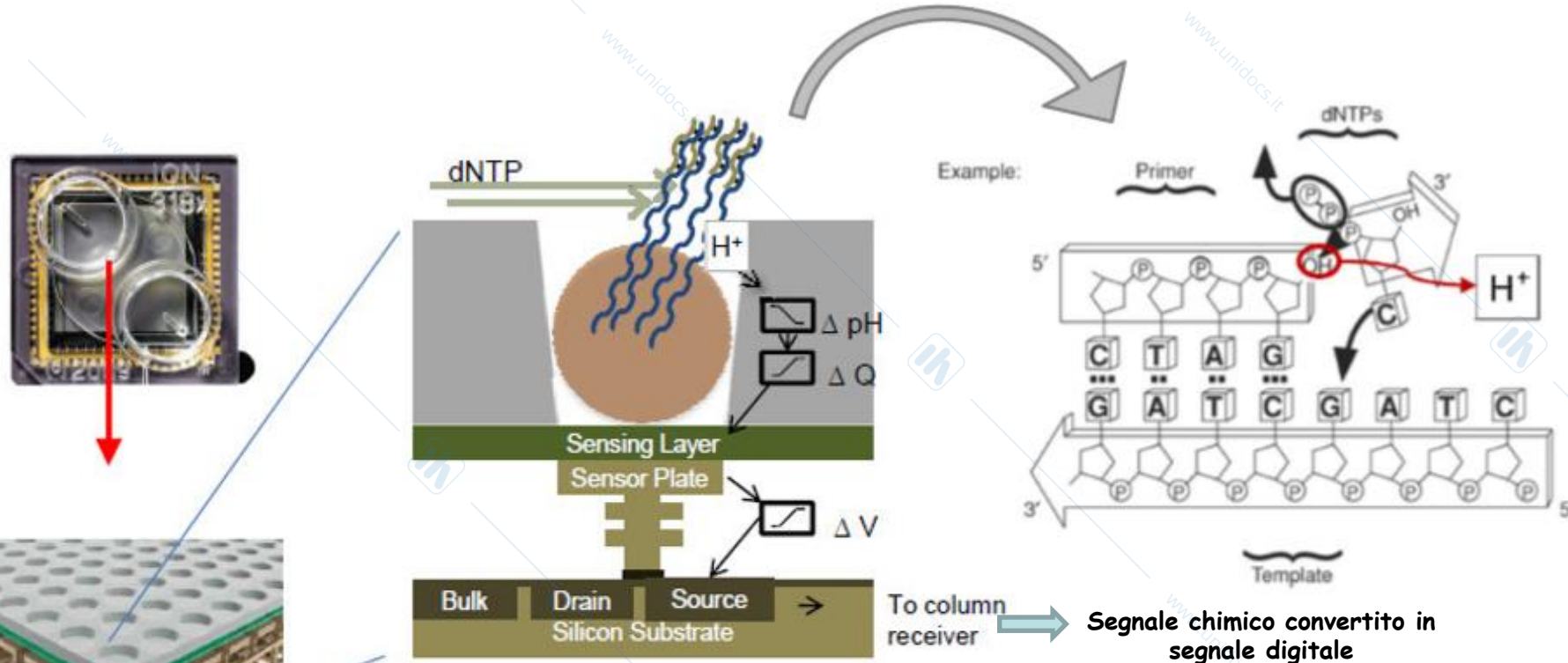
www.unidocs.it

www.unidocs.it

www.unidocs.it - Appunti e dispense per superare i tuoi esami universitari

www.unidocs.it

Come avviene la reazione di sequenziamento?



- Chip 314: 1.2 million wells
- Chip 316: >6 million wells
- Chip 318: >11 million wells
- Diametro well: 3 μm

- Flusso sequenziale di nucleotidi sul chip (ogni 4 sec)
- Importante il pH delle soluzioni
- Milioni di reazioni di sequenziamento contemporanee
- Analisi in real-time

Analisi molecolari delle mutazioni più frequenti nei tumori

Pannello melanoma

BRAF mut (PCR)
NRAS mut (PCR)
c-Kit mut (PCR)

Pannello Colon-Retto

KRAS mut (PCR)
BRAF mut (PCR)
NRAS mut (PCR)

Pannello polmone

EGFR mut (PCR)
KRAS mut (PCR)
BRAF mut (PCR)
HER2 mut (PCR)
ALK - ROS trasl (FISH)



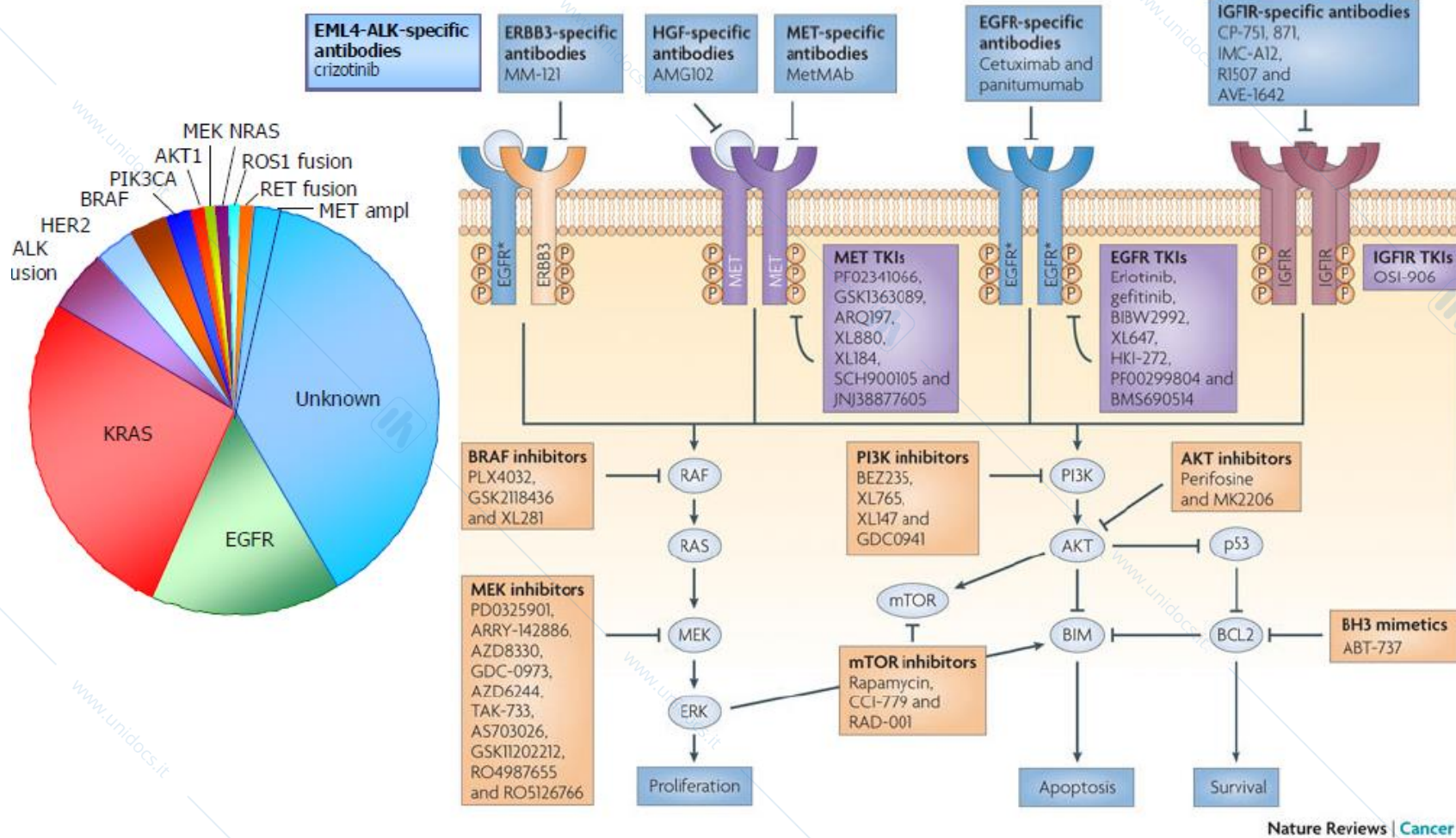
Pannello Tiroide

KRAS mut (PCR)
NRAS mut (PCR)
HRAS mut (PCR)
BRAF mut (PCR)
PAX8/PPARG trasl (RT-PCR)
RET/PTC trasl (RT-PCR)

Pannello cervello

IDH1 mut (PCR)
IDH2 mut (PCR)
MGMT met
EGFR ampl (FISH)
1p36/19q13 (FISH)

ADK polmonare: alterazioni molecolari e terapie target



A SECONDO DELLE MUTAZIONI SI POSSONO UTILIZZARE TERAPIE DIVERSE E MIRATE

William Pao & Juliann Chmielecki Nature Reviews Cancer 10, 760-774



la ricerca sta ora puntando verso **metodiche di terza generazione**, come per esempio il sequenziamento basato su nanopori

Questa tecnologia deriva da un'osservazione emersa già negli anni Ottanta: quando un DNA a singolo filamento passa attraverso un canale molto stretto (nanoporo) genera un flusso di ioni con un pattern caratteristico, che dipende in modo univoco dalla sua sequenza.

Questa tecnologia permetterebbe di sequenziare milioni di nucleotidi, senza ricorrere all'amplificazione dei frammenti di DNA.

