Il Progetto Genoma Umano

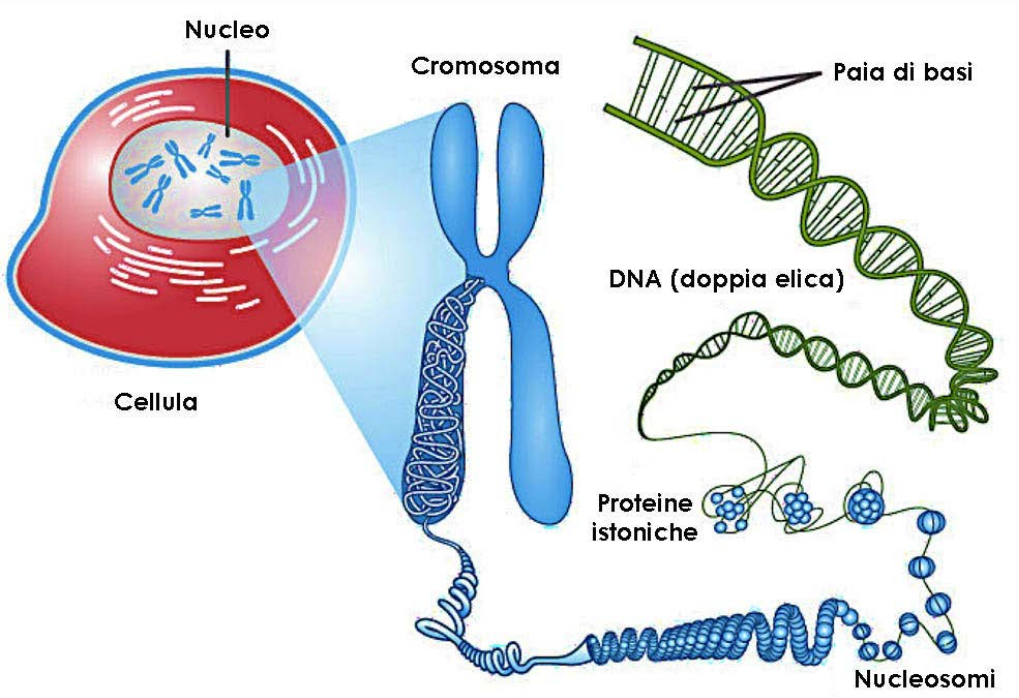
Presentazione a cura di Assunta Croce, PhD

FONDAZIONE DiaSorin

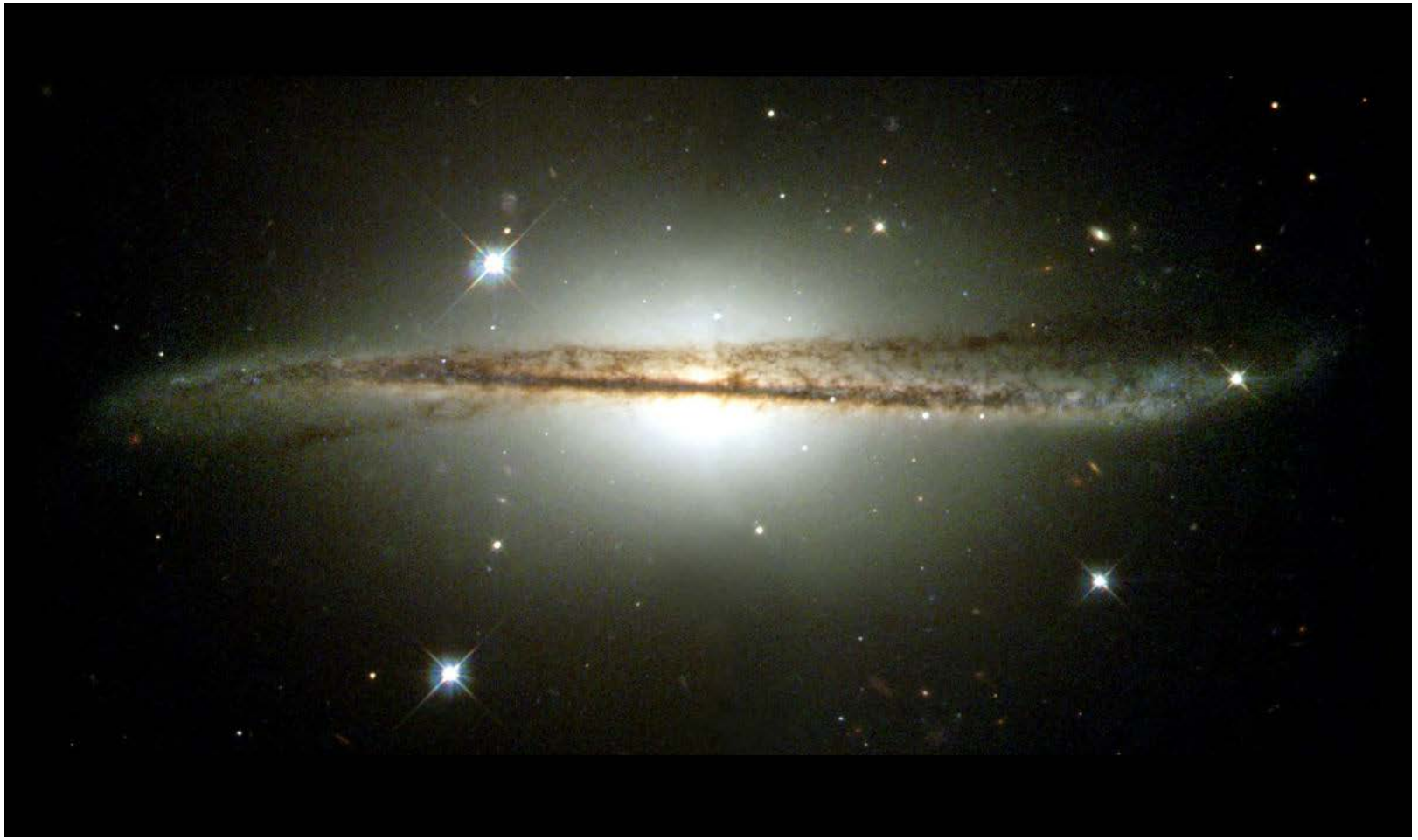
Indice

Che cosa è il Genoma?

- Insieme di tutte le informazioni genetiche contenute nel DNA di una cellula di organismo vivente
- Il manuale di istruzioni che indica alla cellula e all'organismo COME realizzare i processi alla base della vita



Il Progetto Genoma Umano, un’esplorazione di noi stessi



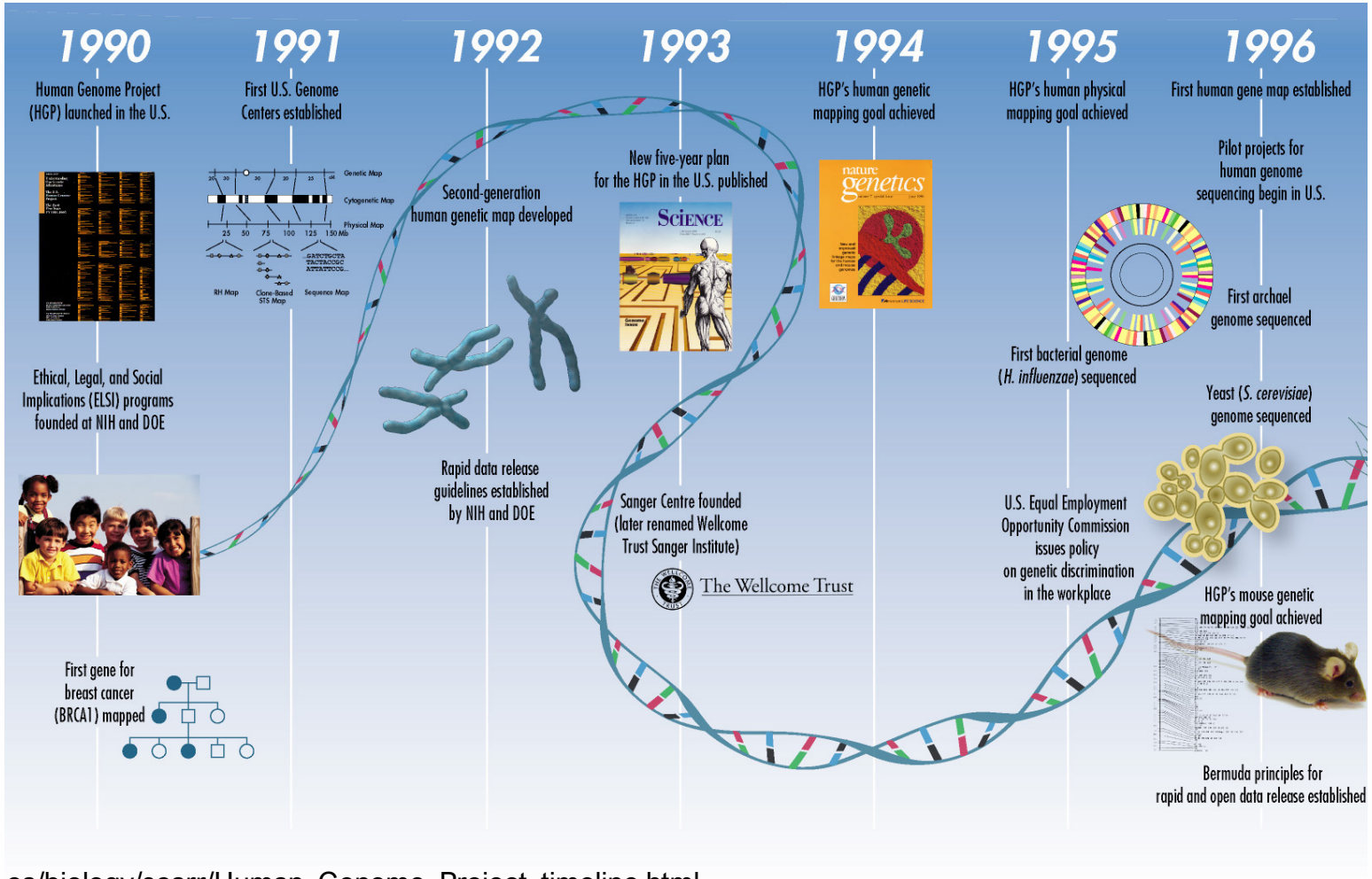
Credit & Copyright: Conselice et al., Hubble Heritage Team (STScI/AURA), NASA

Obiettivi del progetto

- **Sequenziare il genoma umano**, cioè scoprire l'esatta **successione** dei nucleotidi presenti nel DNA **rappresentativo** di un essere umano (diversi volontari) in 15 anni
- Definire una **mappa fisica** e **genetica** del genoma umano
- Sequenziare e mappare **5 organismi modello** (incluso topo)

Stabiliti nel 1988 da un US Academy of Sciences e poi ripresi dall'ente americano che lanciò il progetto (Dipartimento dell'Energia)

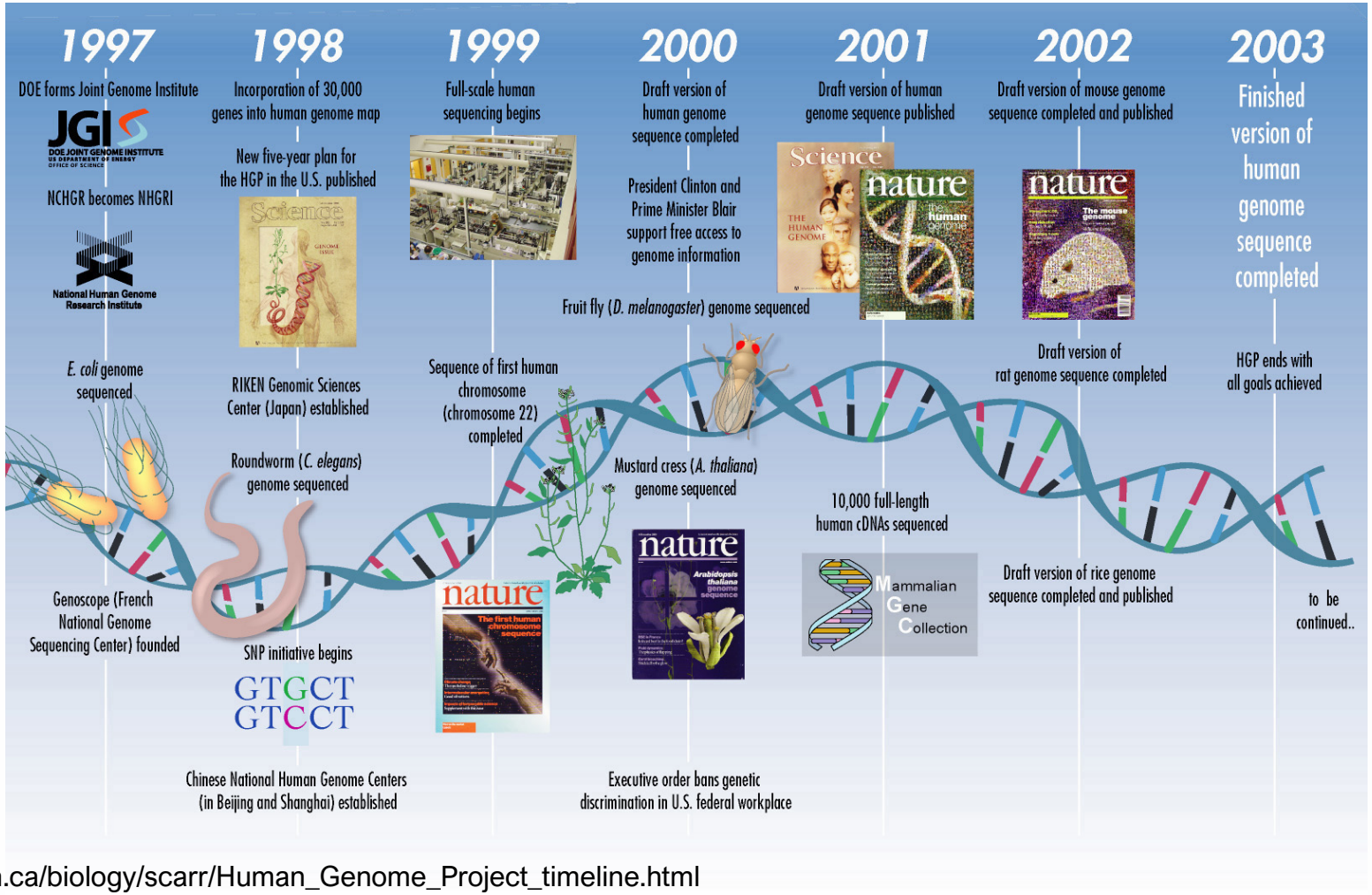
Timeline



Credit: https://www.mun.ca/biology/scarr/Human_Genome_Project_timeline.html

FONDAZIONE DiaSorin

Timeline



Credit: https://www.mun.ca/biology/scarr/Human_Genome_Project_timeline.html

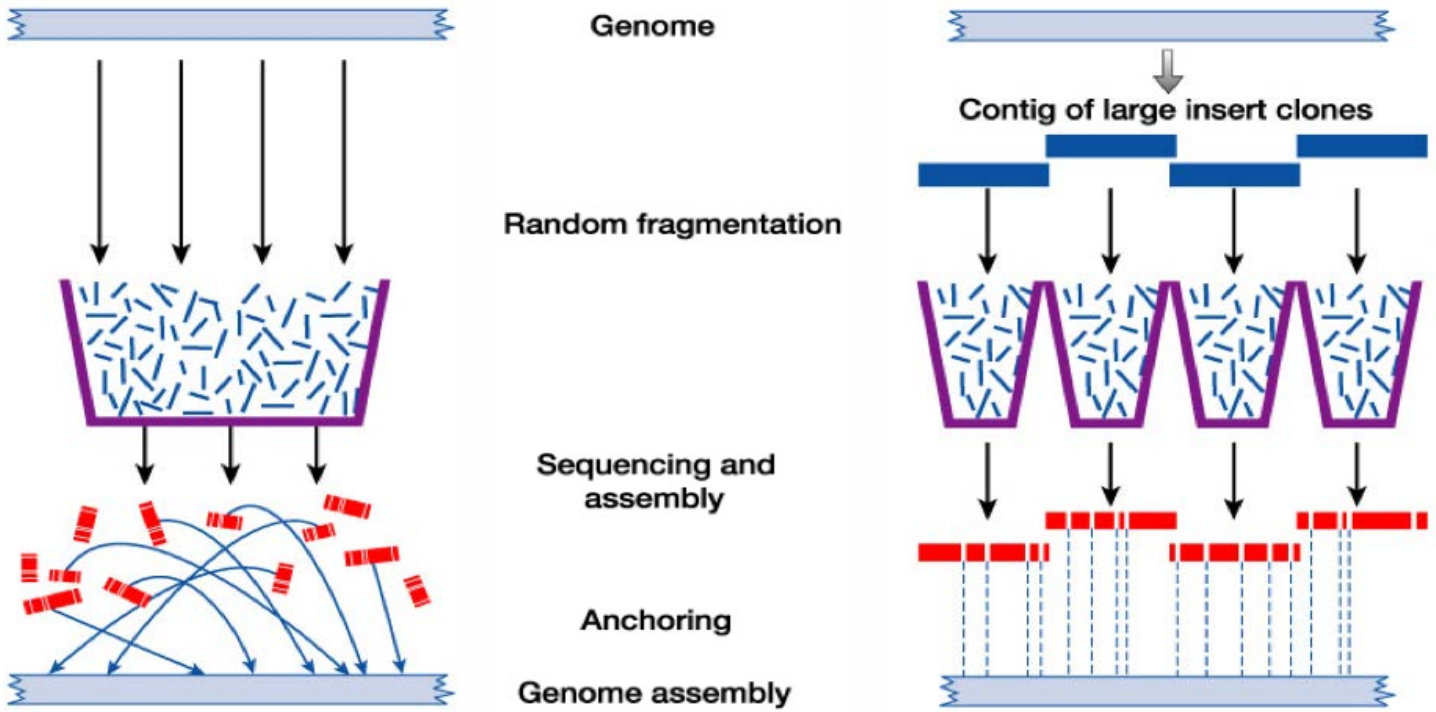
L’ annuncio nel 2001

FONDAZIONE DiaSorin

Due approcci diversi

Whole-genome shotgun (CELERA Genomics)

Hierarchical shotgun (Consorzio Pubblico)



Modified from Human Molecular Genetics, Garland Science 2004

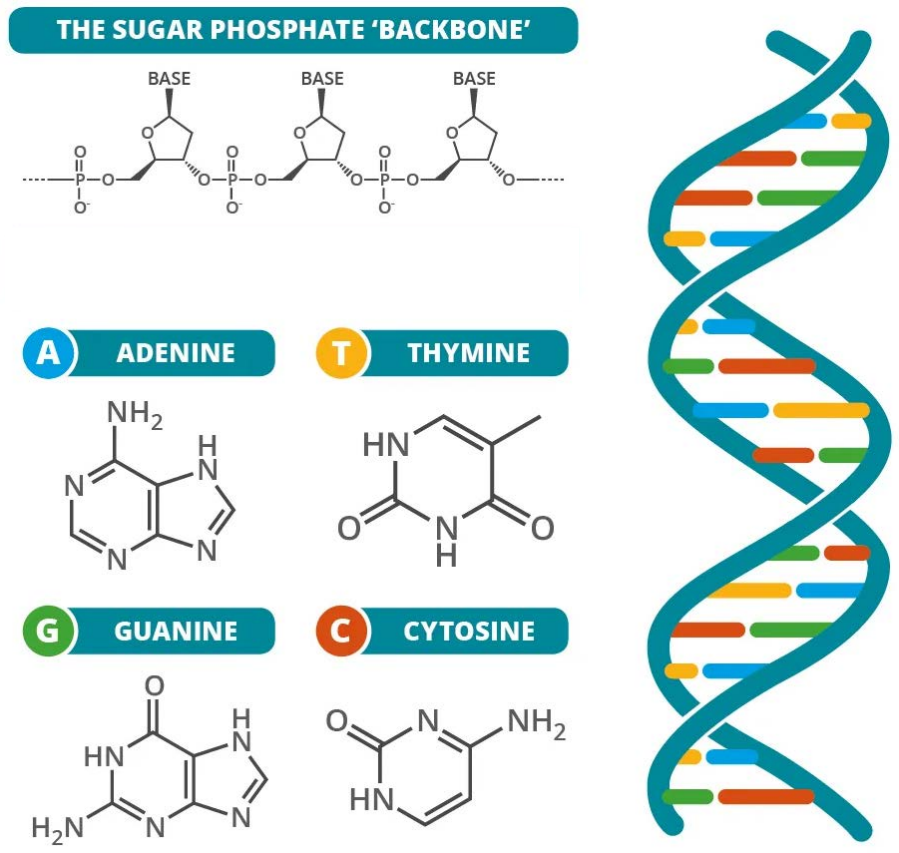
I numeri del progetto

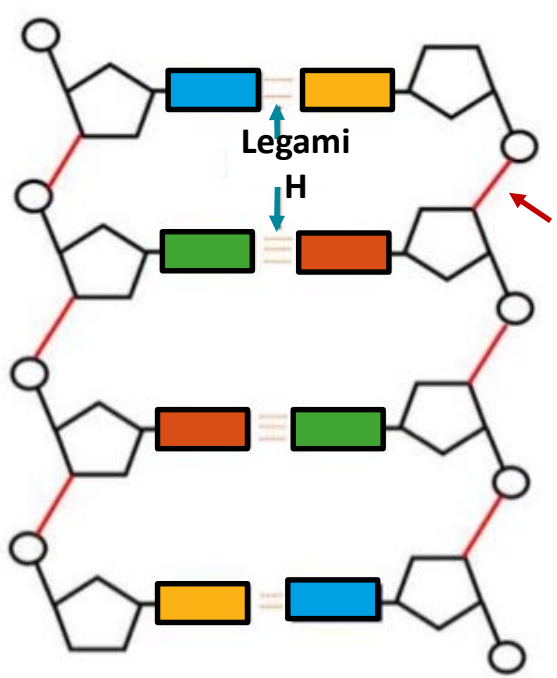
- Costo del progetto: 3 miliardi di dollari
- Completato in 13 anni (2 anni in anticipo)
- 20 Istituzioni di 6 Paesi diversi: UK, Francia, Germania, Giappone e Cina

Come si sequenzia il DNA?

FONDAZIONE DiaSorin

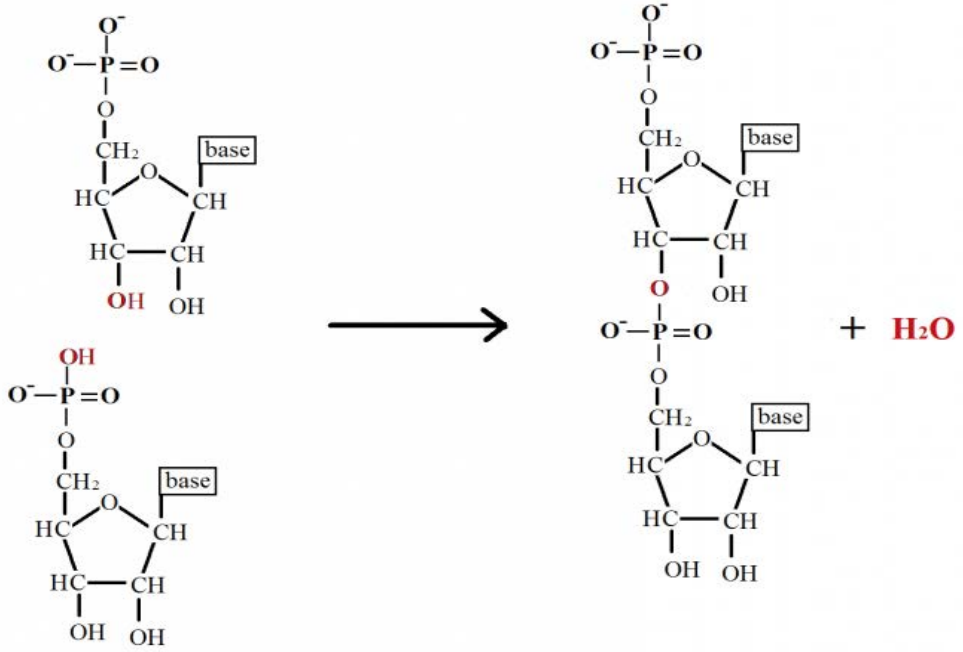
La struttura del DNA

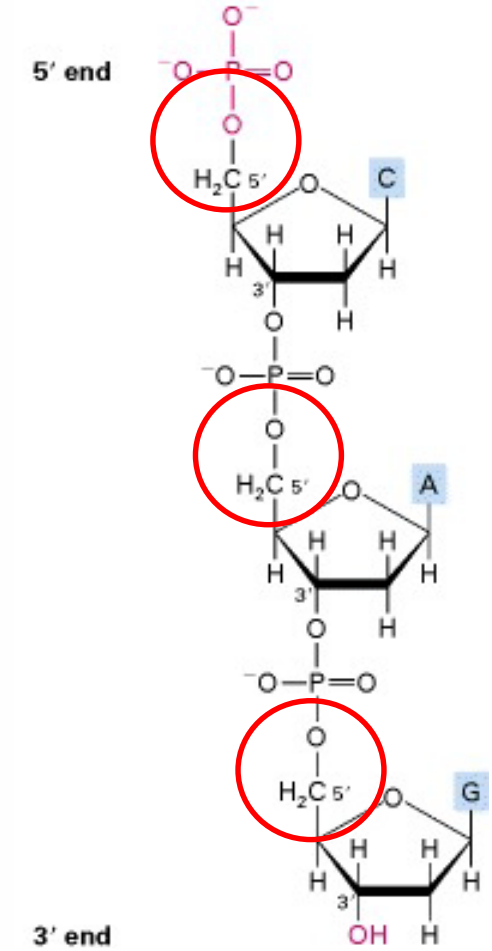




Modified from www.compoundchem.com and from bioknowledgy.weebly.com

I legami fosfo-di-esterici





FONDAZIONE DiaSorin

Metodo Sanger

- Metodo enzimatico (poiché sfrutta gli enzimi della replicazione del DNA)
- Sviluppato da Frederick Sanger nel 1977
- Basato sulla capacità di mimare *in vitro* la replicazione del DNA e sulla possibilità di interrompere la sintesi e identificare l'ultimo nucleotide inserito

Una scoperta da Nobel

Nature Vol. 265 February 24 1977

articles

Nucleotide sequence of bacteriophage ΦX174 DNA

F. Sanger, G. M. Air*, B. G. Barrell, N. L. Brown†, A. R. Coulson, J. C. Fiddes, C. A. Hutchison III‡, P. M. Slocombe§ & M. Smith‖

MRC Laboratory of Molecular Biology, Hills Road, Cambridge CB2 2QH, UK

A DNA sequence for the genome of bacteriophage ΦX174 of approximately 5,375 nucleotides has been determined using the rapid and simple 'plus and minus' method. The sequence identifies many of the features responsible for the production of the proteins of the nine known genes of the organism, including initiation and termination sites for the proteins and RNAs. Two pairs of genes are coded by the same region of DNA using different reading frames.

THE genome of bacteriophage ΦX174 is a single-stranded, circular DNA of approximately 5,400 nucleotides coding for nine known proteins. The order of these genes, as determined by genetic techniques[2–4], is *A–B–C–D–E–J–F–G–H*. Genes *F*, *G* and *H* code for structural proteins of the virus capsid, and gene *J* (as defined by sequence work) codes for a small basic protein

strand DNA of ΦX has the same sequence as the mRNA and, in certain conditions, will bind ribosomes so that a protected fragment can be isolated and sequenced. Only one major site was found. By comparison with the amino acid sequence data it was found that this ribosome binding site sequence coded for the initiation of the gene *G* protein[15] (positions 2,362–2,413).

At this stage sequencing techniques using primed synthesis with DNA polymerase were being developed[16] and Schott[17] synthesised a decanucleotide with a sequence complementary to part of the ribosome binding site. This was used to prime into the intercistronic region between the *F* and *G* genes, using DNA polymerase and ^{32}P-labelled triphosphates[18]. The ribo-substitution technique[16] facilitated the sequence determination of the labelled DNA produced. This decanucleotide-primed system was also used to develop the plus and minus method[1]. Suitable synthetic primers are, however, difficult to prepare and as

The Nobel Prize in Chemistry 1980

Photo from the Nobel Foundation archive.

Paul Berg

Prize share: 1/2

Photo from the Nobel Foundation archive.

Walter Gilbert

Prize share: 1/4

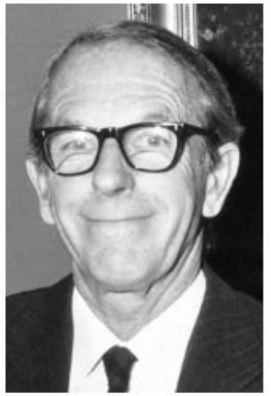


Photo from the Nobel Foundation archive.

Frederick Sanger

Prize share: 1/4

The Nobel Prize in Chemistry 1980 was divided, one half awarded to Paul Berg "for his fundamental studies of the biochemistry of nucleic acids, with particular regard to recombinant-DNA", the other half jointly to Walter Gilbert and Frederick Sanger "for their contributions concerning the determination of base sequences in nucleic acids."

FONDAZIONE DiaSorin

Step 1 – Allestimento reazione

5′-CCTACGATGTTACGACTATACATGGCAT-3′

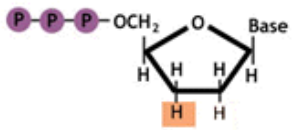
3′-GGATGCTACAATGCTGATATGTACCGTA-5′

ddNTPs dNTPs

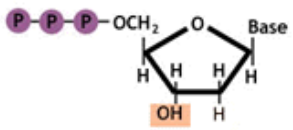
5′-CCTACG-3′
5′-CCTACG-3′
5′-CCTACG-3′
5′-CCTACG-3′

primer

DNA polimerasi



dideoxynucleotide (ddNTP)



deoxynucleotide (dNTP)

FONDAZIONE DiaSorin

Step 2 – Amplificazione

5′-CCTACGATGTTACGACTATACATGGCAT-3′

3′-GGATGCTACAATGCTGATATGTACCGTA-5′

Denaturazione

5′-CCTACGATGTTACGACTATACATGGCAT-3′

3′-GGATGCTACAATGCTGATATGTACCGTA-5′

Step 2 – Amplificazione

5′-CCTACGATGTTACGACTATACATGGCAT-3′

3′-GGATGCTACAATGCTGATATGTACCGTA-5′

5′-CCTACGATGTTACGACTATACATGGCAT-3′

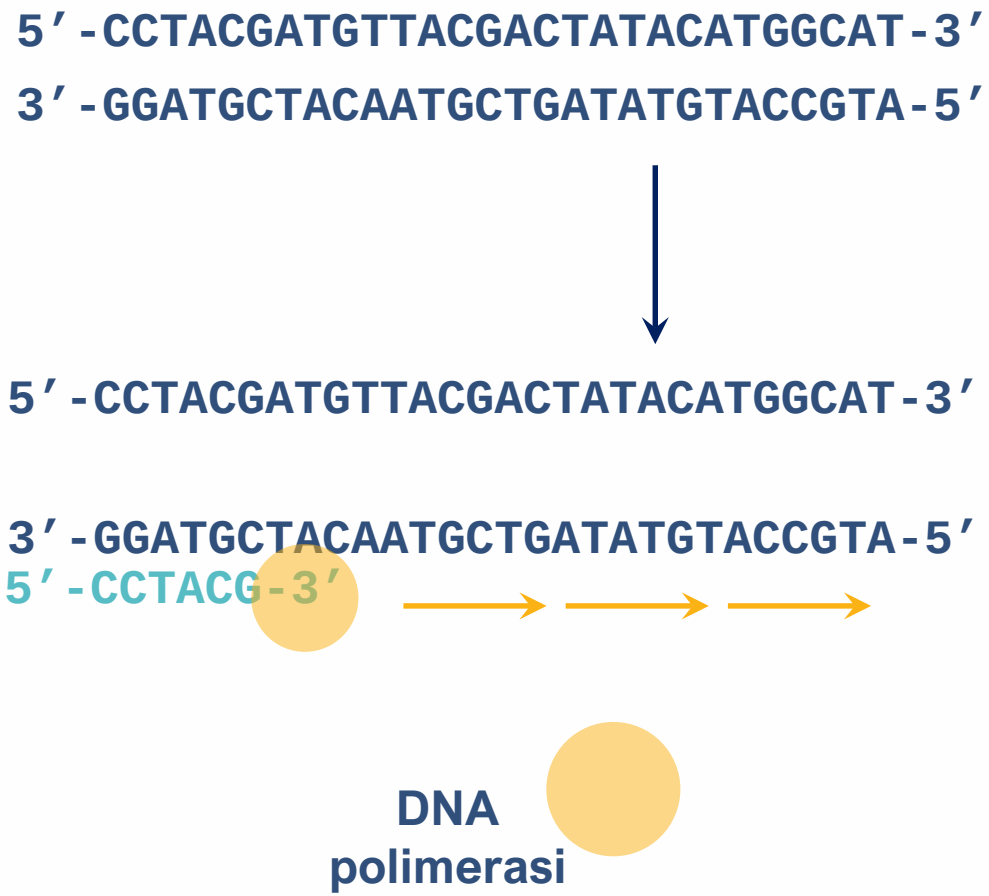
3′-GGATGCTACAATGCTGATATGTACCGTA-5′

5′-CCTACG-3′

5′-CCTACG-3′

primer

Step 2 – Amplificazione

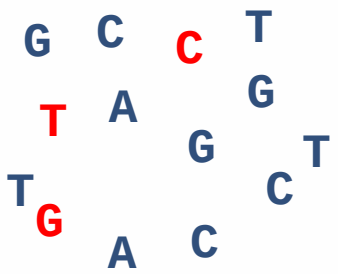


FONDAZIONE DiaSorin

I ddNTPs interrompono la reazione

5′-CCTACGATGTTACGACTATACATGGCAT-3′

3′-GGATGCTACAATGCTGATATGTACCGTA-5′



5′-CCTACGATGTTACGACTATACATGGCAT-3′

3′-GGATGCTACAATGCTGATATGTACCGTA-5′

5′-CCTACGATGTT

DNA polimerasi

Quattro reazioni per quattro provette

Provetta 1

5′-CCTACGATGTTACGACTATACATGGCAT-3′

3′-GGATGCTACAATGCTGATATGTACCGTA-5′

ddNTPs dNTPs

5′-CCTACG-3′

5′-CCTACG-3′

5′-CCTACG-3′

primer

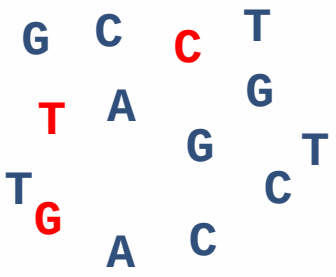
DNA polimerasi

Quattro reazioni per quattro provette

Provetta 1

5′-CCTACGATGTTACGACTATACATGGCAT-3′

3′-GGATGCTACAATGCTGATATGTACCGTA-5′



ddNTPs **dNTPs**

3′-GGATGCTACAATGCTGATATGTACCGTA-5′

5′-CCTACGATGTTA

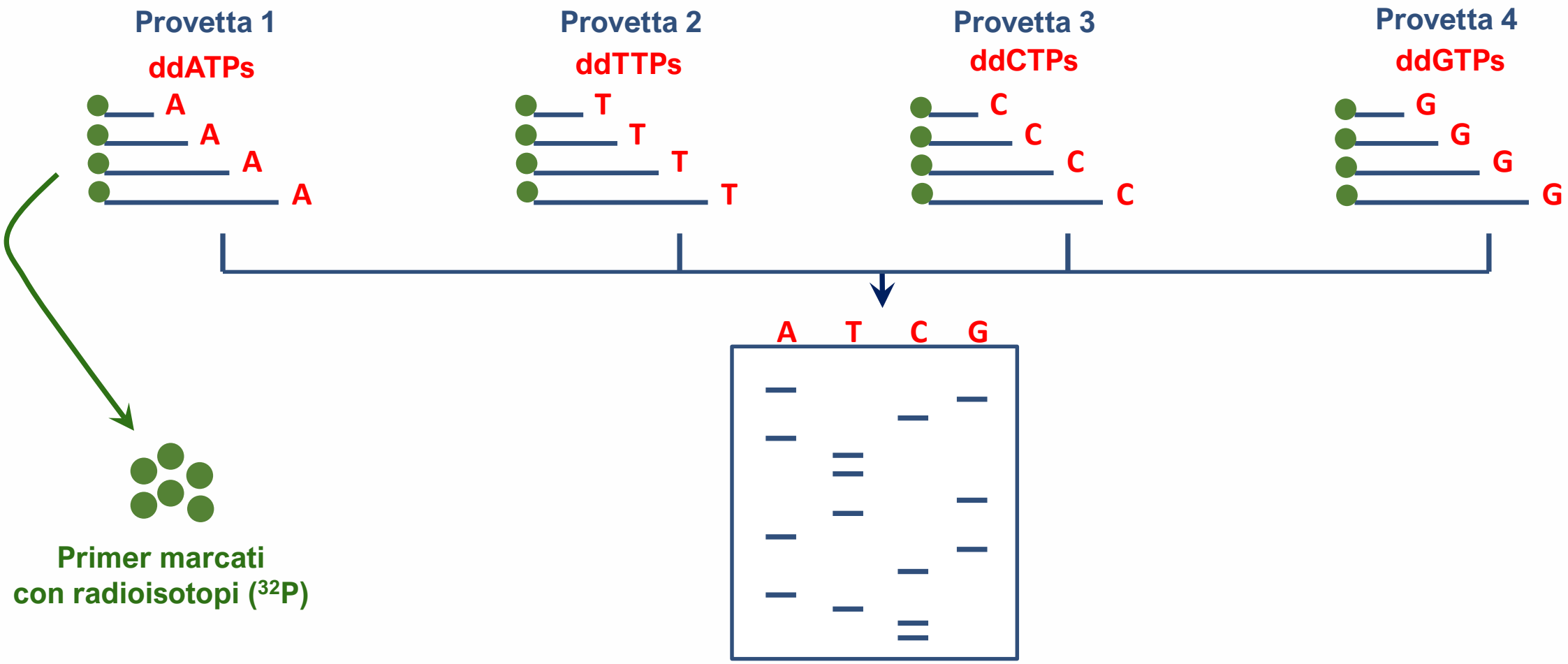
5′-CCTACGATGTTACGA

5′-CCTACGA

5′-CCTACGATGTTACGACTA

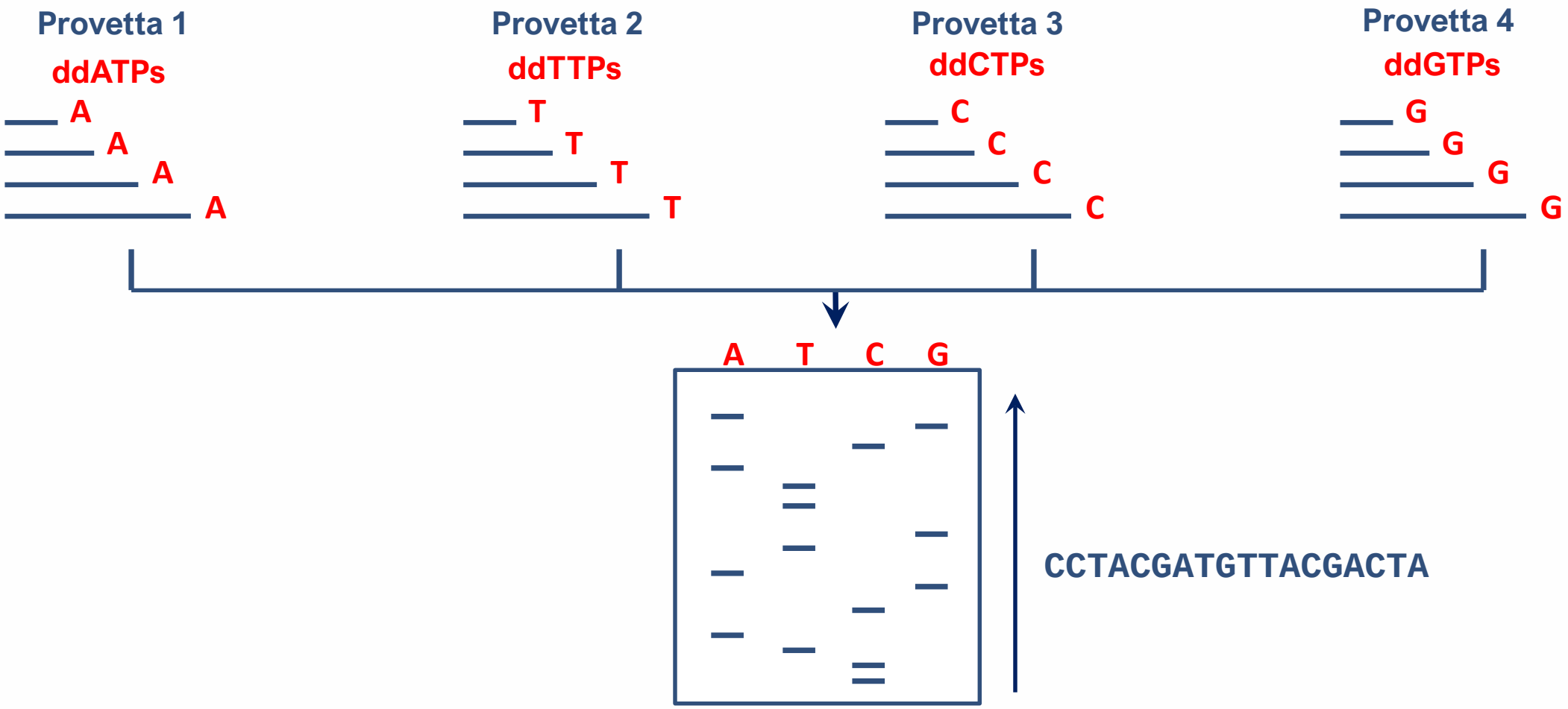
FONDAZIONE DiaSorin

Quattro reazioni per quattro provette



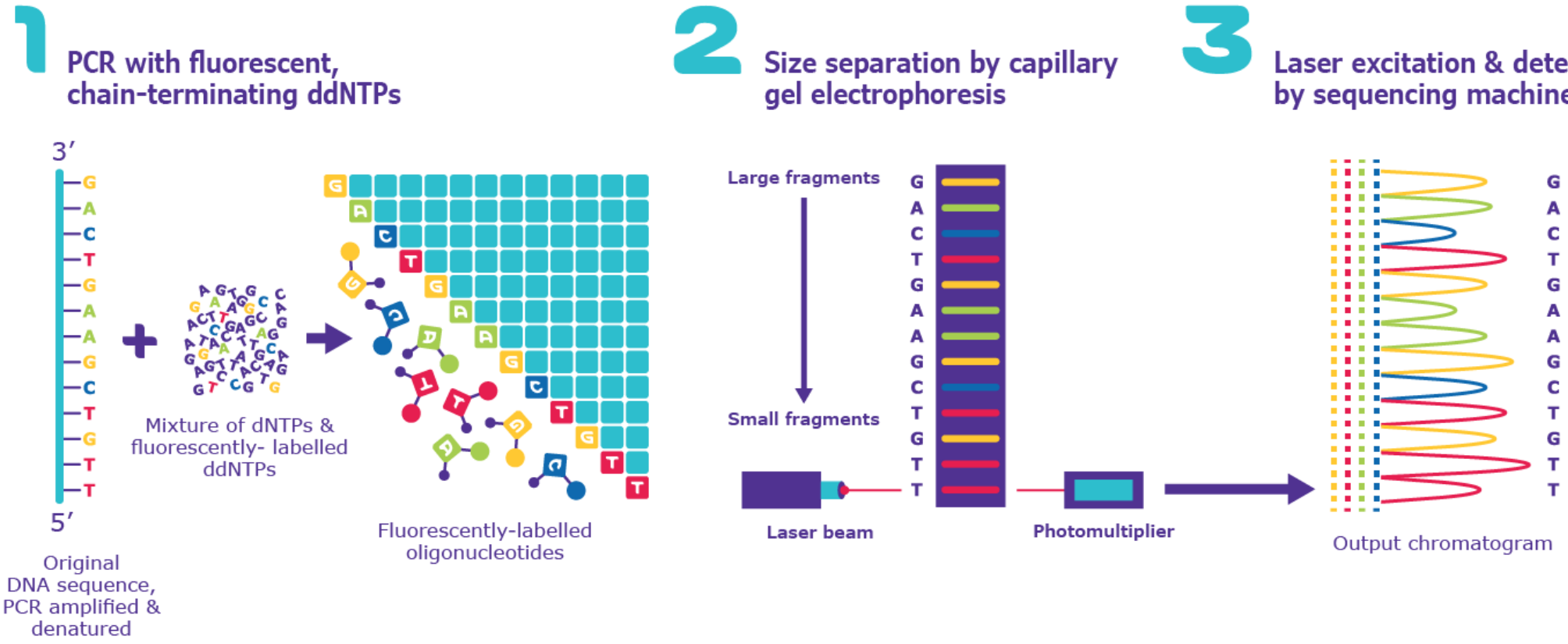
FONDAZIONE DiaSorin

Quattro reazioni per quattro provette



FONDAZIONE DiaSorin

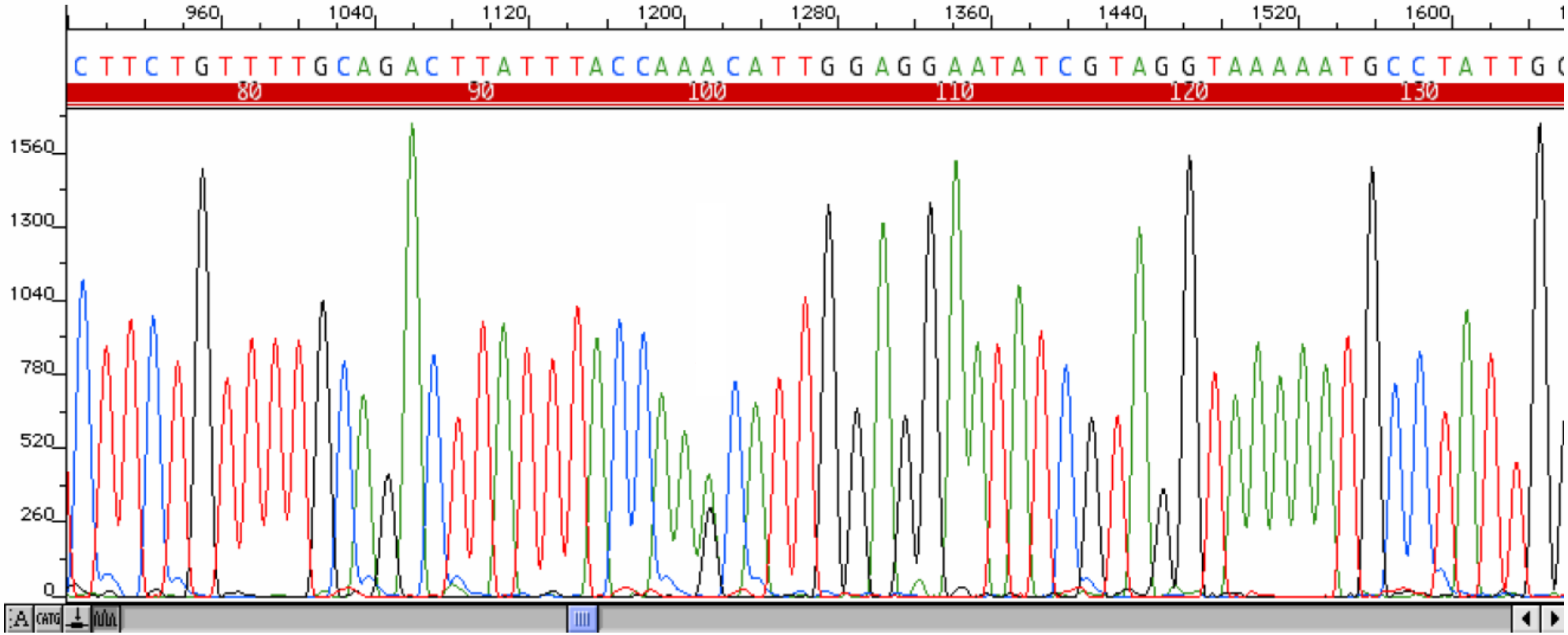
Sequenziamento automatico



Credit: Sigma Aldrich

FONDAZIONE DiaSorin

Elettroferogramma



Credit: S. Volorio, Sequencing Unit Cogentech

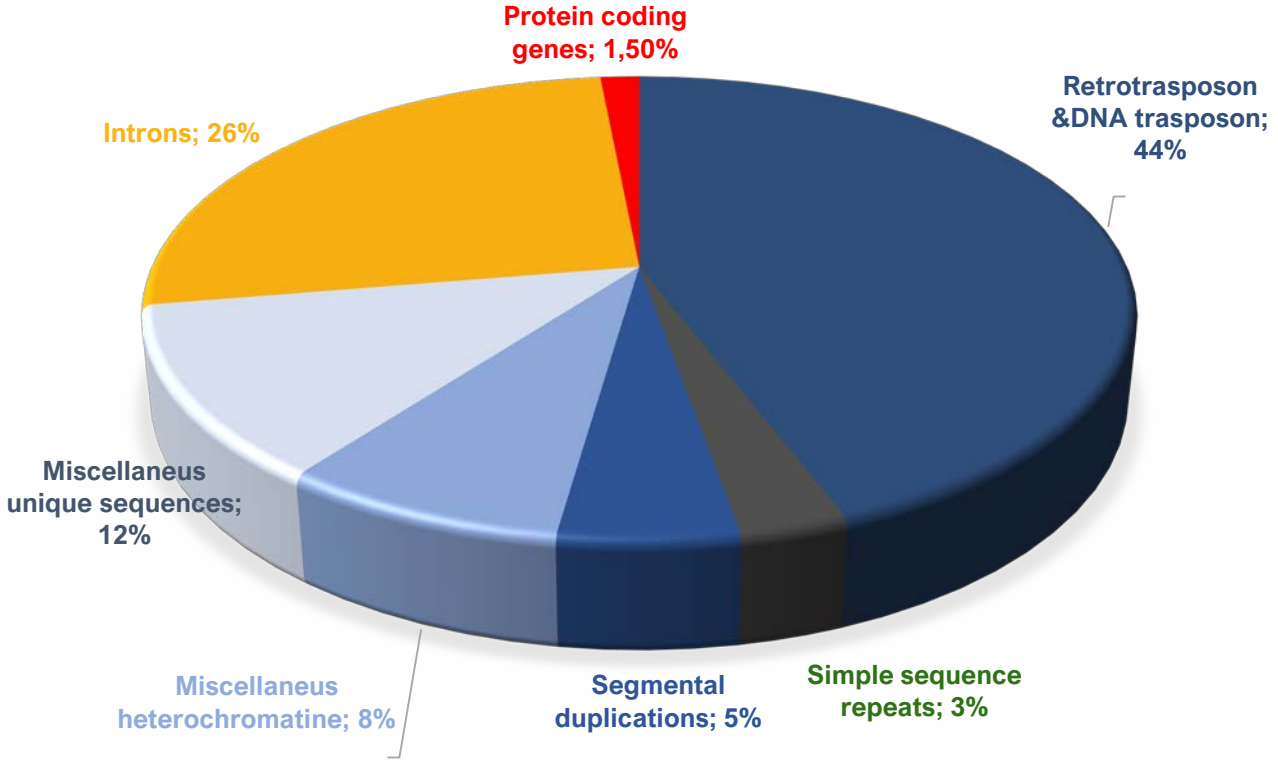
FONDAZIONE DiaSorin

L’impatto del Progetto Genoma Umano

FONDAZIONE DiaSorin

Che cosa è stato scoperto?

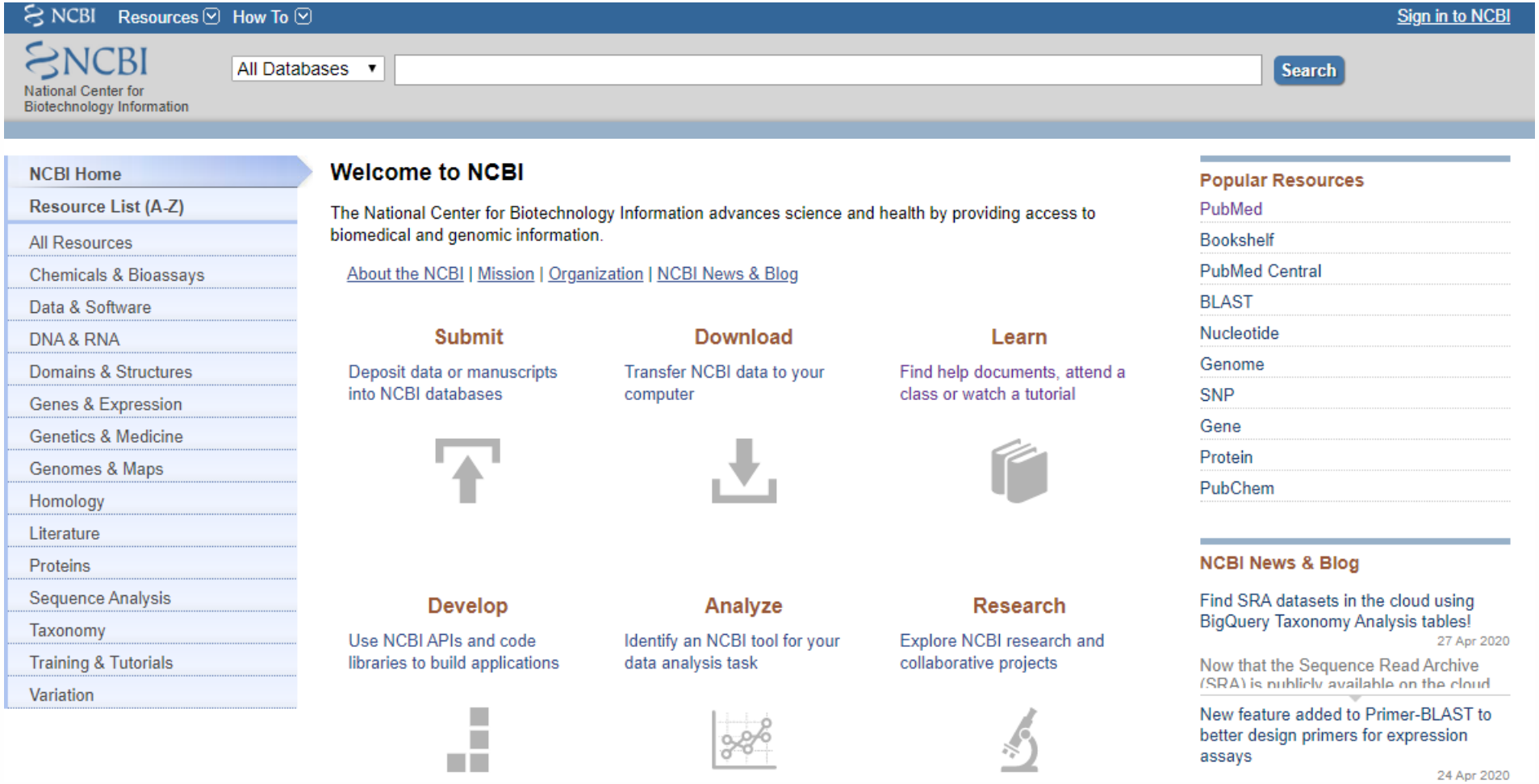
- Il genoma umano è lungo circa 3.2 miliardi di basi
- Possediamo tanto DNA da andare e tornare dal Sole per 41 volte!
- Possediamo «solo» 21.000 geni



Adapted from T. R. Gregory Nat Rev Genet. 9:699-708, 2005

Sviluppo di piattaforme tecnologiche

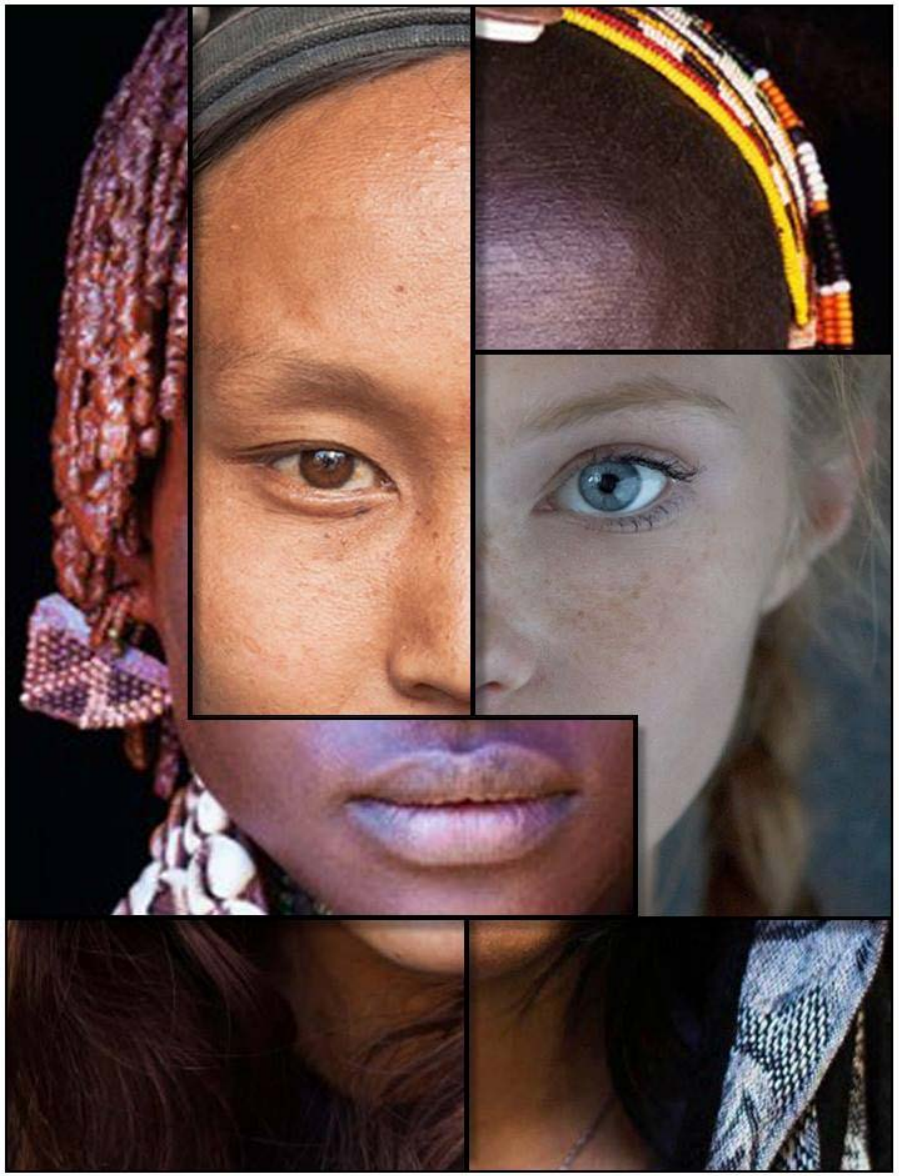
1. Strutture informatiche per **«depositare» le sequenze**
2. Sviluppo **di algoritmi/software** per analizzare i dati
3. Nascita di **nuove discipline** (genomica comparativa, farmacogenomica, bioinformatica)



https://www.ncbi.nlm.nih.gov

Così lontani, così vicini

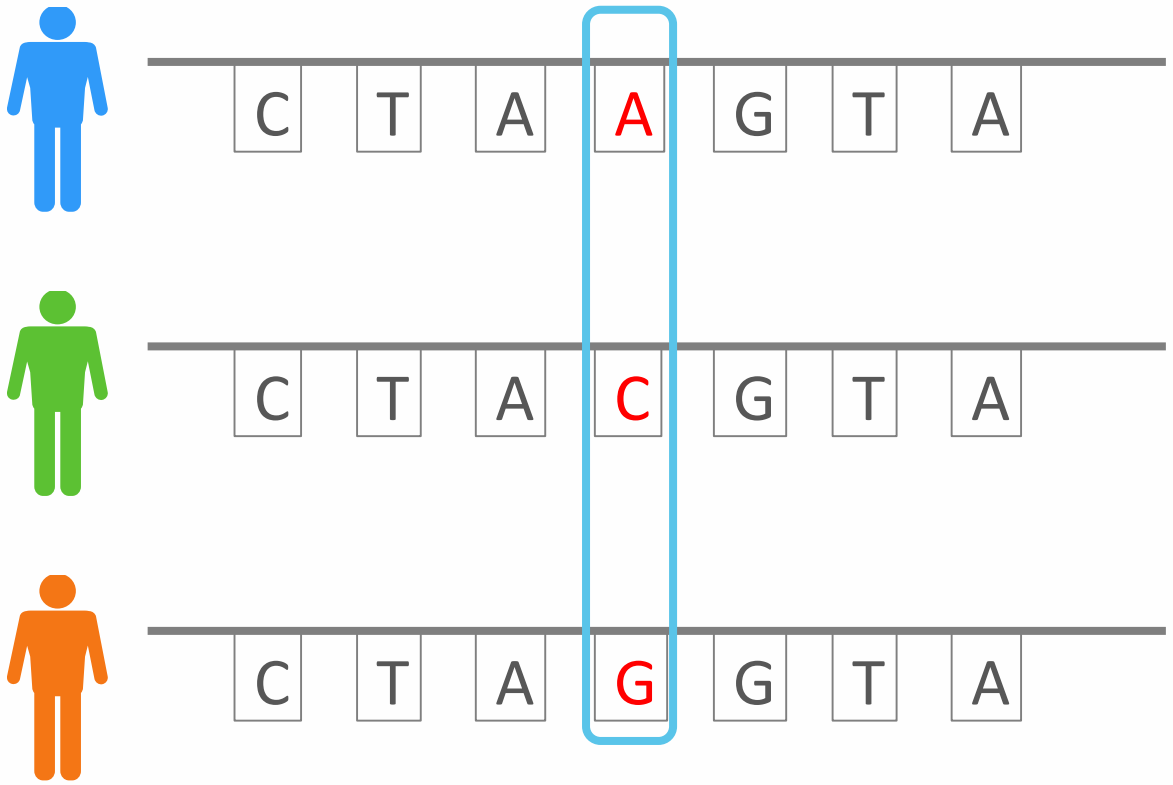
- Sequenziato genoma di scimpanzé nel 2005
- Genoma dello scimpanzé e dell'uomo IDENTICI per il 96%
- 29% delle proteine sono identiche



Nello **0.3%** del nostro genoma è racchiusa la **diversità umana**

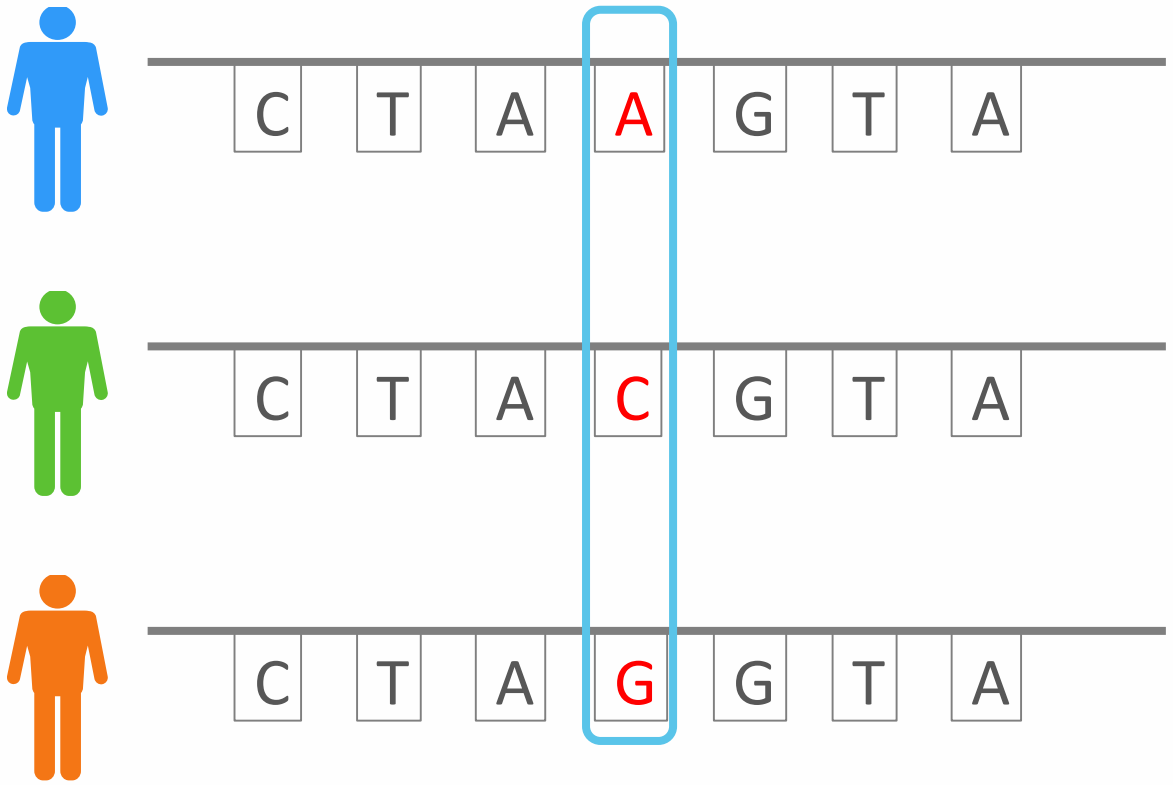
Credit: https://www.facebook.com/ManifestodellaDiversitaUmana/

Variazioni nel genoma



Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

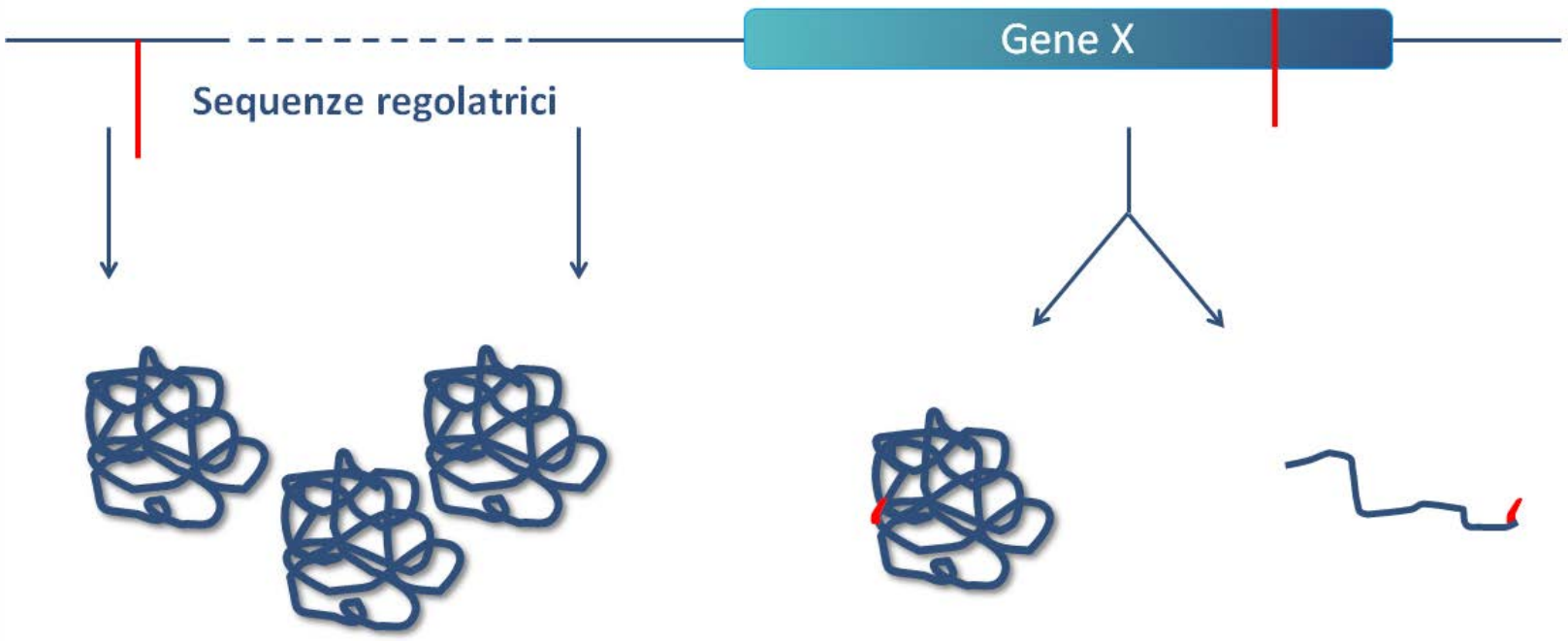
Variazioni nel genoma



Single Nucleotide Polymorphism (SNP)

- 1 SNP ogni 300 paia di basi
- Circa 10 milioni SNPs

Che significato biologico hanno?



Alterazione livelli di espressione del gene e di produzione della proteina

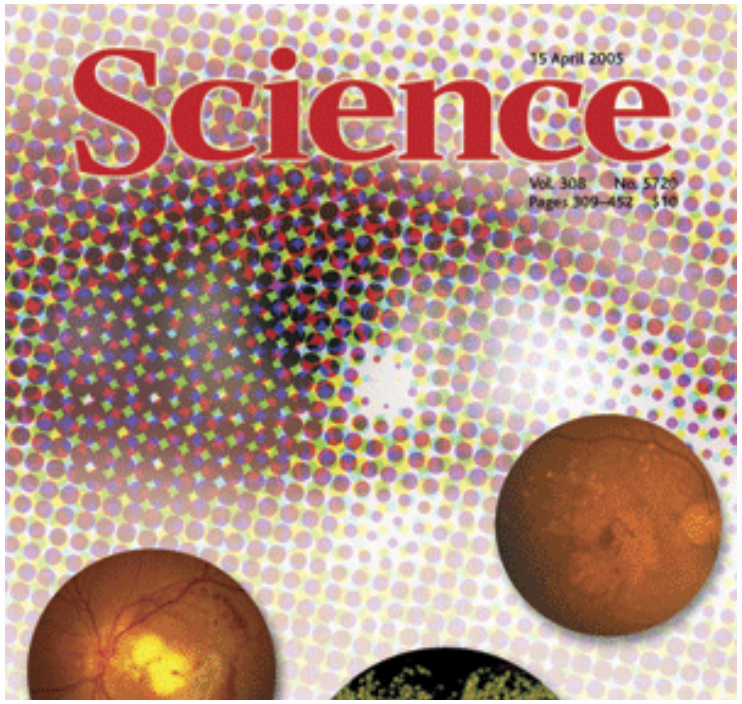
Proteina con alterazione amminoacidica

Proteina non più funzionante

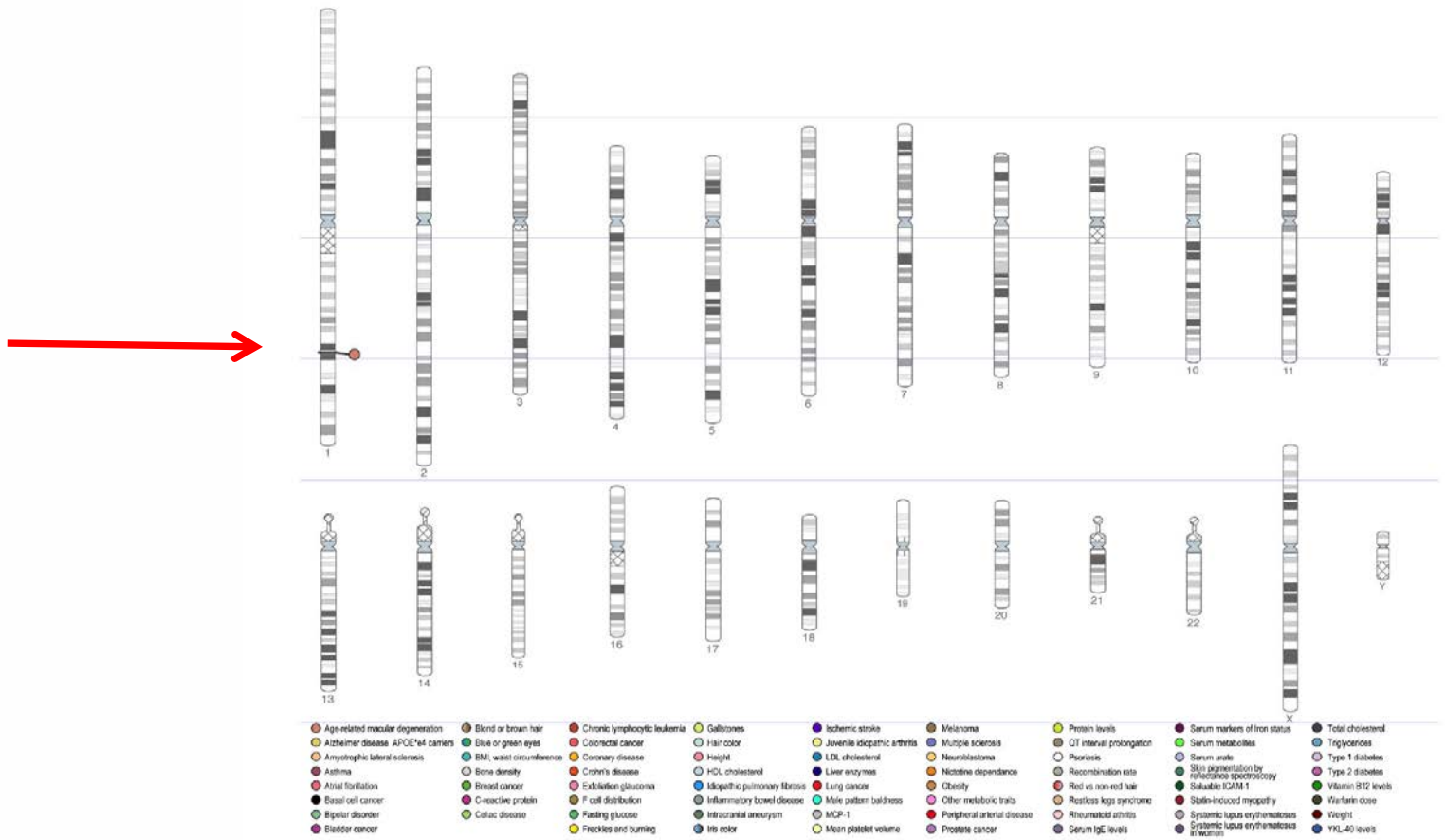
Genome wide association studies

- Analisi su larga scala di genomi di individui diversi alla ricerca di **varianti geniche associate allo sviluppo di una certa patologia** (GWAS)

- **Consorzio HapMap** identifica una variante genica che predispone a un tipo di degenerazione maculare (2005)



Genome wide association studies (2005)

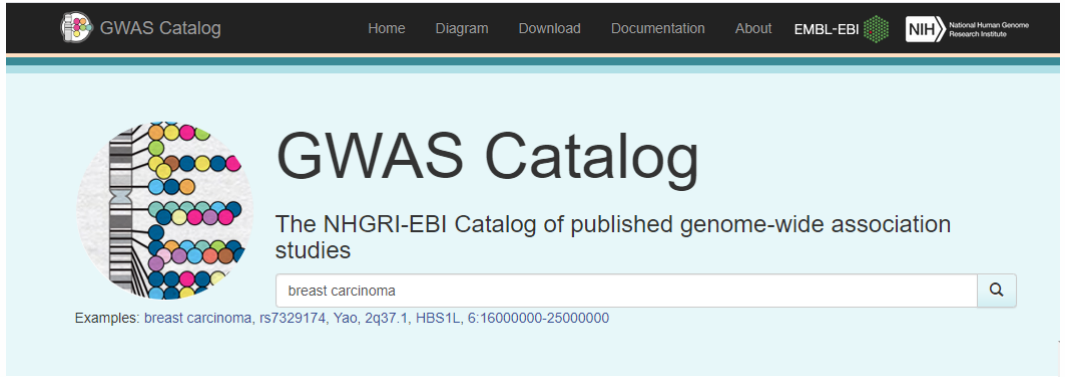


Credit: genome.gov

Genome wide association studies (2012)

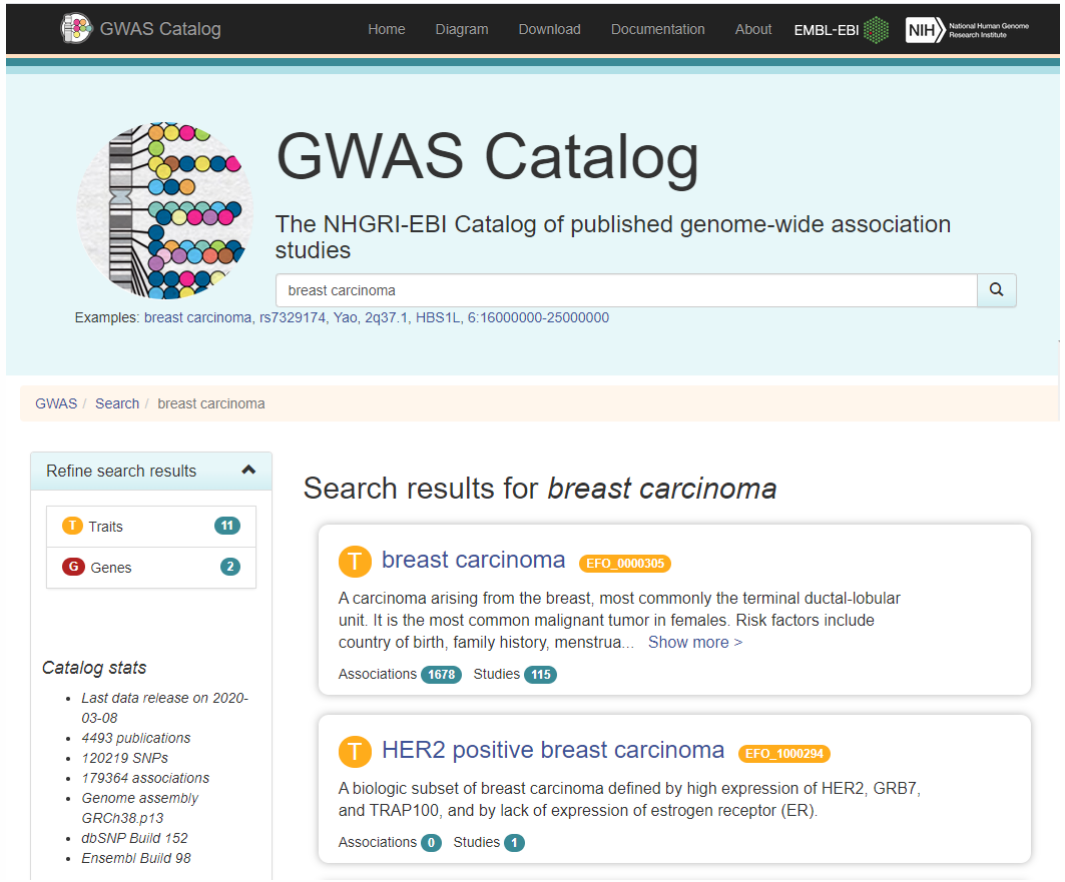
Credit: https://www.ebi.ac.uk/gwas/diagram

Un catalogo sempre aggiornato



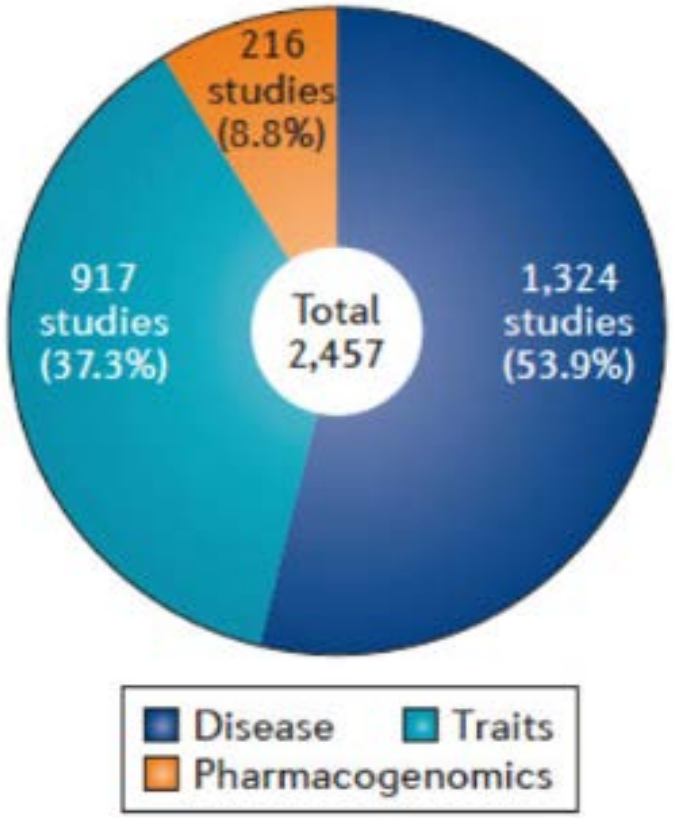
https://www.ebi.ac.uk/gwas/

Un catalogo sempre aggiornato



https://www.ebi.ac.uk/gwas/search?query=breast%20carcinoma/

FONDAZIONE DiaSorin



La maggior parte degli studi Genome-wide in 3 categorie

From: Giacomini et al., Nat Rev Drug Discov. 2016 16(1): 1

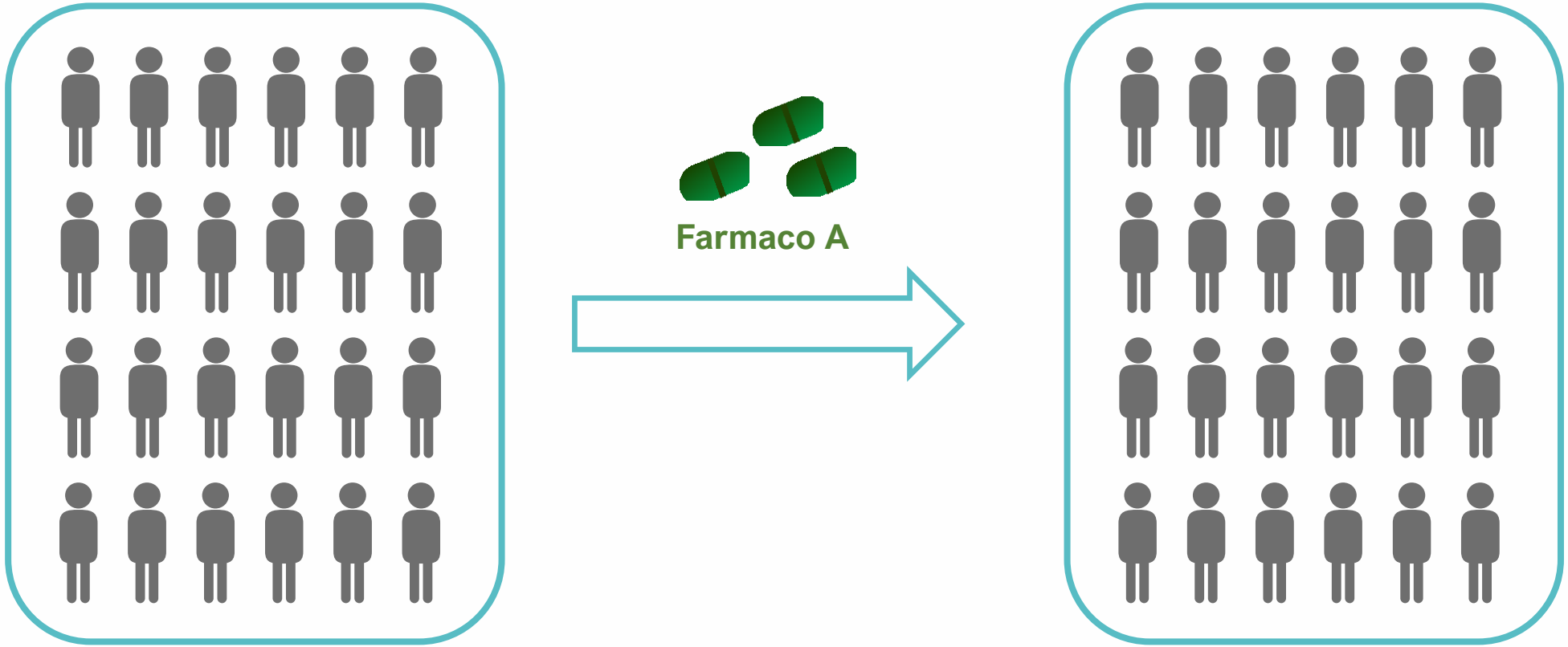
Medicina Personalizzata

FONDAZIONE DiaSorin

Un cambio di paradigma

- Passaggio dal “**one size fits all**” (lo stesso trattamento per tutti) a “**personalized medicine**”
- La genomica consente di operare classificazioni molecolari e di scegliere il trattamento più efficace alla dose terapeutica più indicata per quello specifico paziente, per una specifica malattia caratterizzata dal punto di vista molecolare

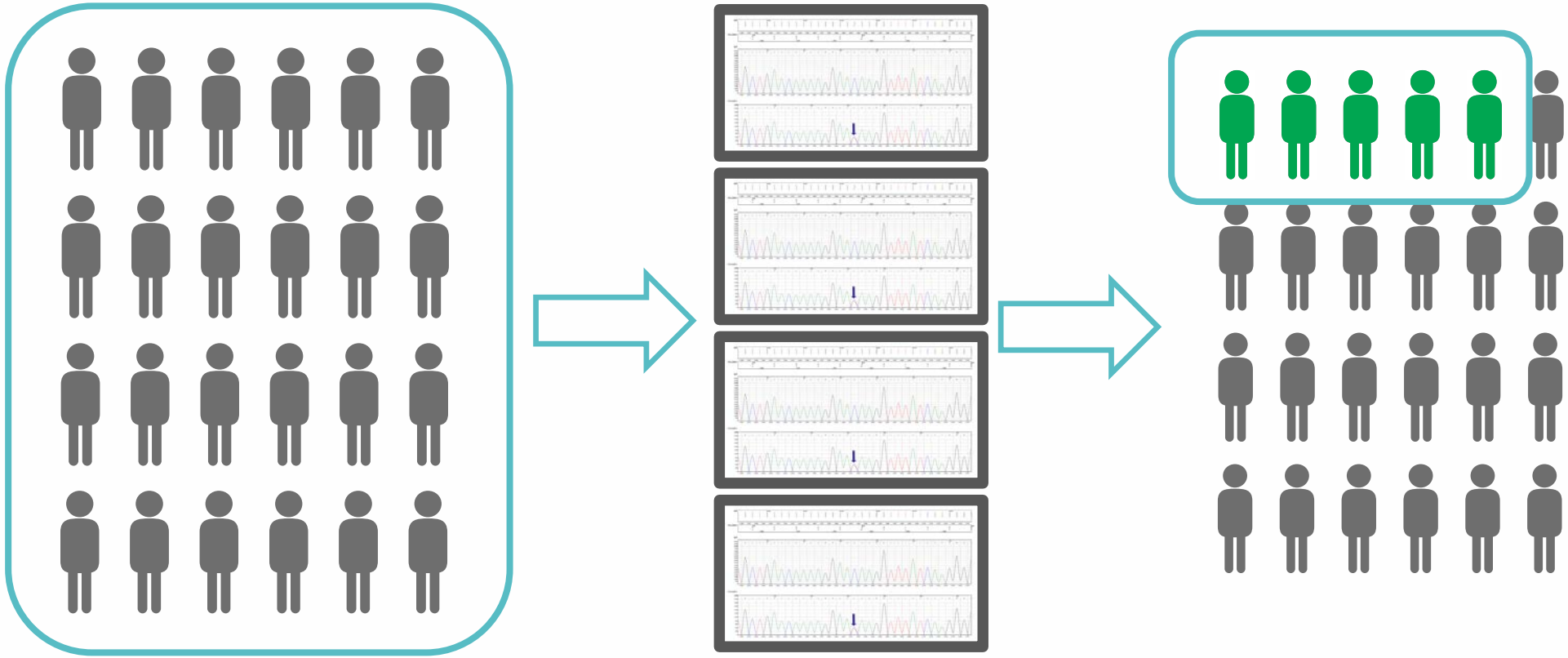
Lo stesso farmaco per tutti



Farmaco A efficace nel 20% della popolazione

80% dei pazienti non avrà beneficio dal trattamento

Scoprire il profilo molecolare dei pazienti



Somministrare il Farmaco A solo ai pazienti che hanno il profilo molecolare adeguato e che risponderanno alla terapia

Un farmaco per ognuno

Trattamento sulla base del profilo molecolare del paziente

Un esempio: HER-2 e tumore al seno

1987

ARTICLES

Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene

DJ Slamon, GM Clark, SG Wong, WJ Levin, A Ullrich, WL McGuire

+ See all authors and affiliations

Science 09 Jan 1987:
Vol. 235, Issue 4785, pp. 177-182
DOI: 10.1126/science.3798106

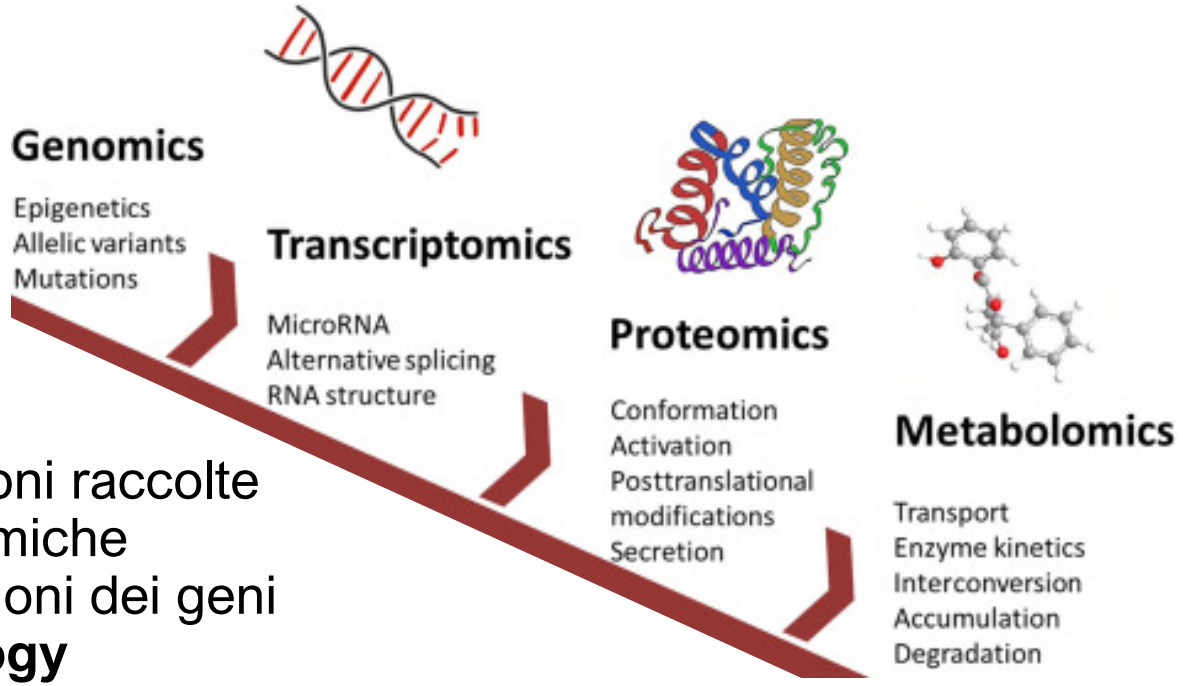
2006

Food and Drug Administration approva il primo farmaco molecolare anticorpo monoclonale contro HER-2

L’ impatto

- Miglioramento dei tassi di sopravvivenza di **oltre il 30%** (tumori stadio 1-3)
- Test per positività a HER-2 entrato **di routine nella diagnosi molecolare** dei tumori alla mammella
- Il farmaco molecolare utilizzato anche **in altri tipi di cancro** (quelli con over-espressione di HER-2)

La sfida che ci attende



Integrare le informazioni raccolte
dalle scienze -omiche
per identificare le funzioni dei geni
System Biology

consulta tutte le risorse didattiche su
www.fondazionediasorin.it

FONDAZIONE
DiaSorin