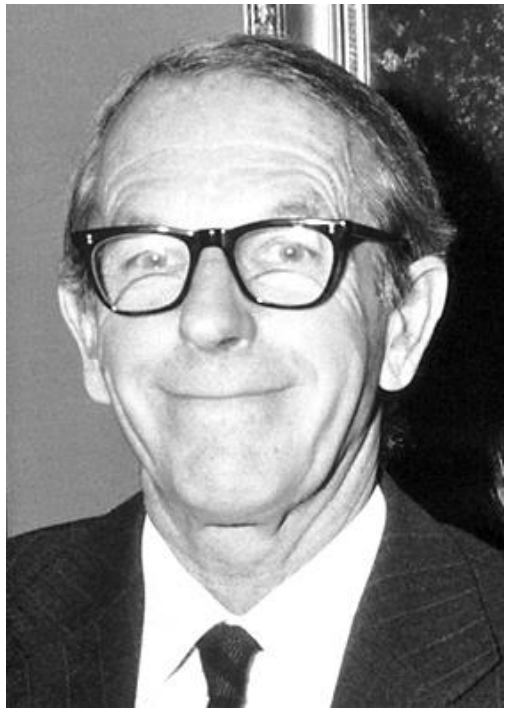
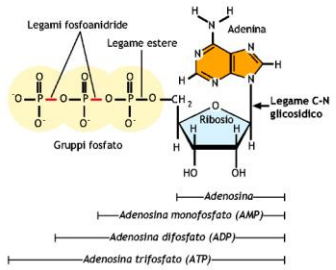
SEQUENZIAMENTO DNA

Sequenziamento del DNA



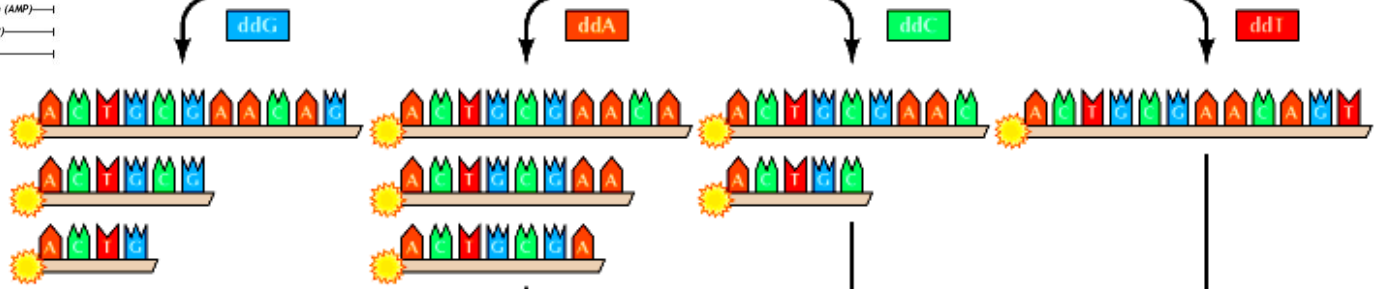
The Nobel Prize in Chemistry
1980
Paul Berg, Walter Gilbert, Frederick Sanger

Il sequenziamento secondo Sanger



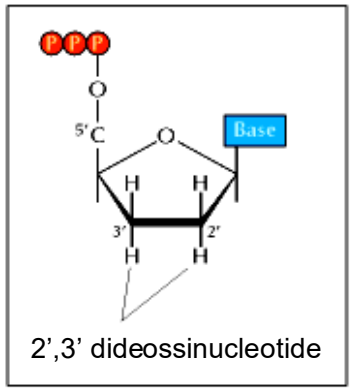
primer radioattivo

sintesi di DNA in presenza di dideossinucleotidi che terminano la catena

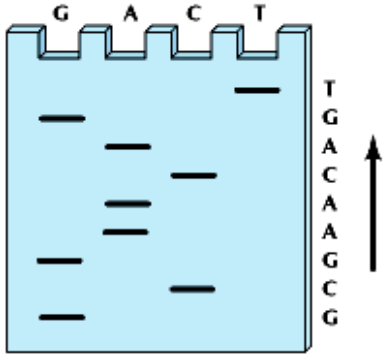


Elettroforesi autoradiografia

NB.
I dideossinucleotidi sono presenti **in basse concentrazioni**

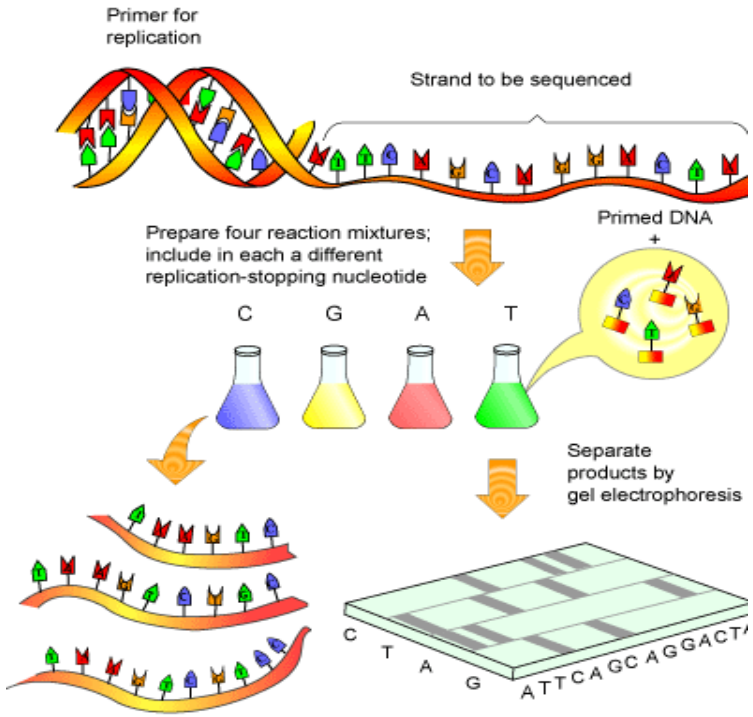


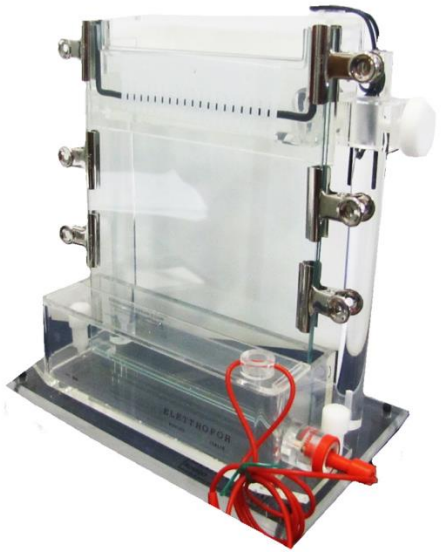
Migrazione dei frammenti

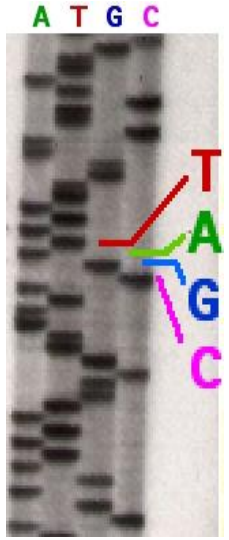


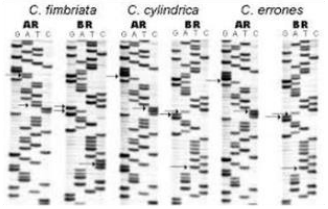
Sequenza del filamento complementare

Elettroforesi su gel di acrilammide per leggere la sequenza del DNA

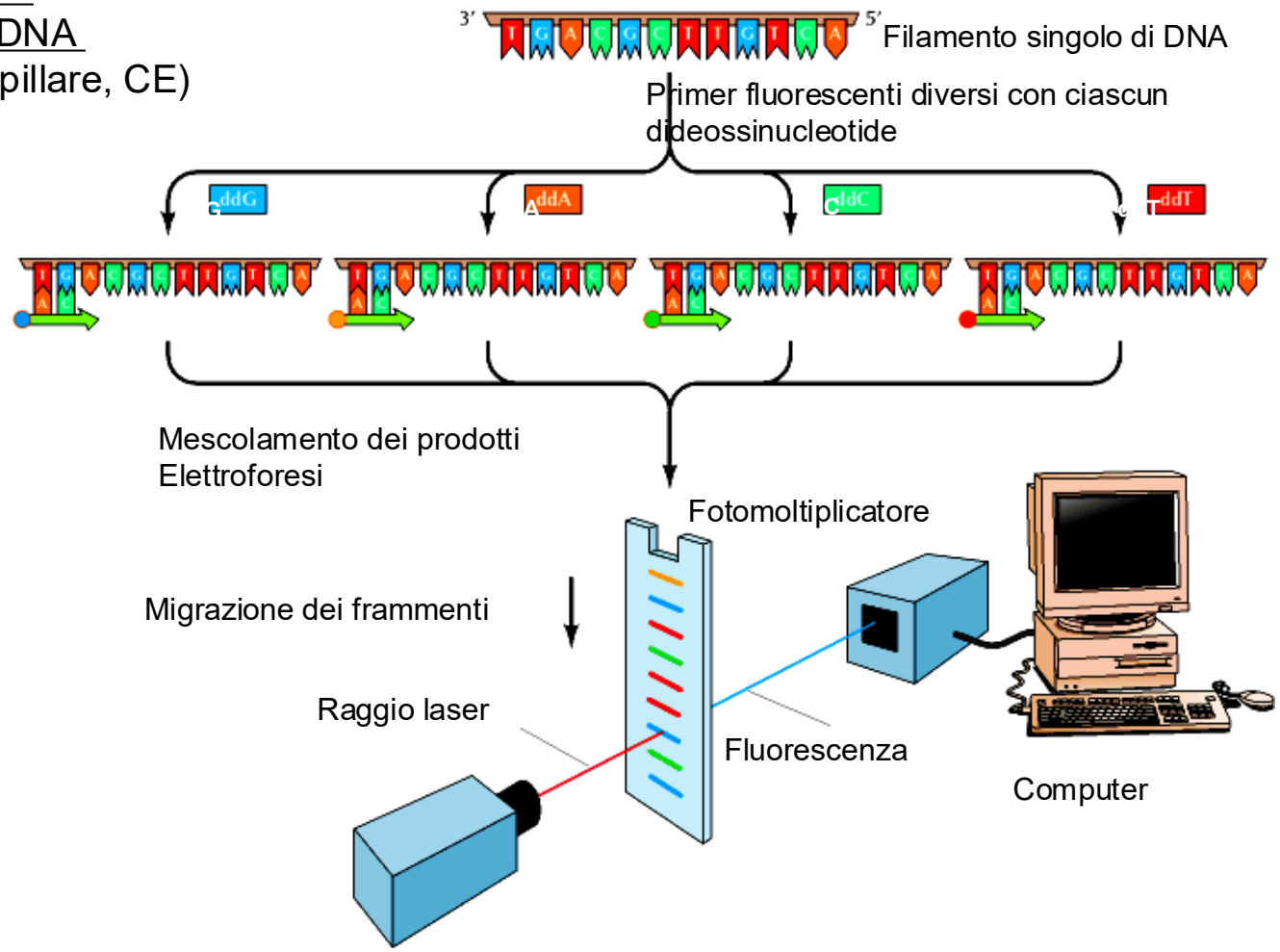




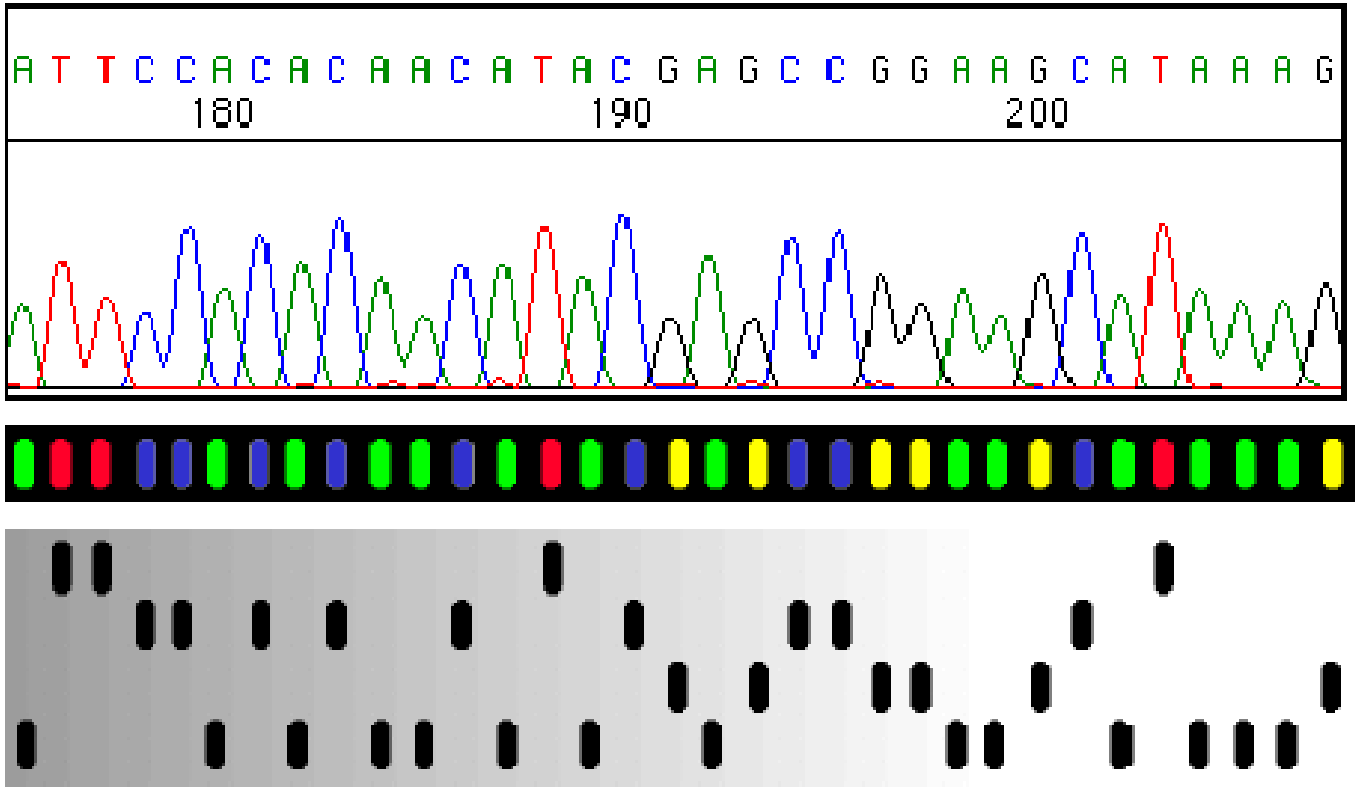




Sequenziamento automatico del DNA (elettroforesi capillare, CE)



Il sequenziamento automatico del DNA

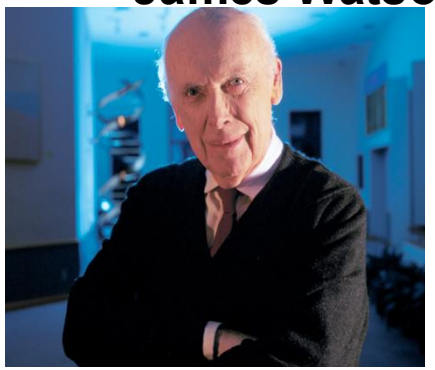


Human Genome Project

Il **Progetto Genoma Umano (HGP)** si riferisce allo sforzo internazionale, iniziato ufficialmente nell'**ottobre 1990** e completato nel **2003**, con gli obiettivi di:

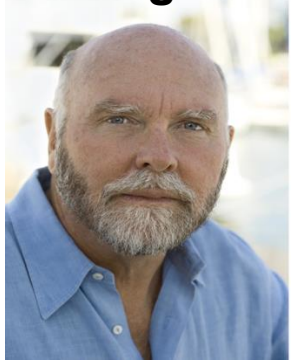
- determinare la **sequenza completa del genoma umano**
- individuare tutti i **circa 20.000–25.000 geni umani stimati**
- **rendere disponibili** queste informazioni per ulteriori studi biologici

James Watson



Francis Collins (NIH)

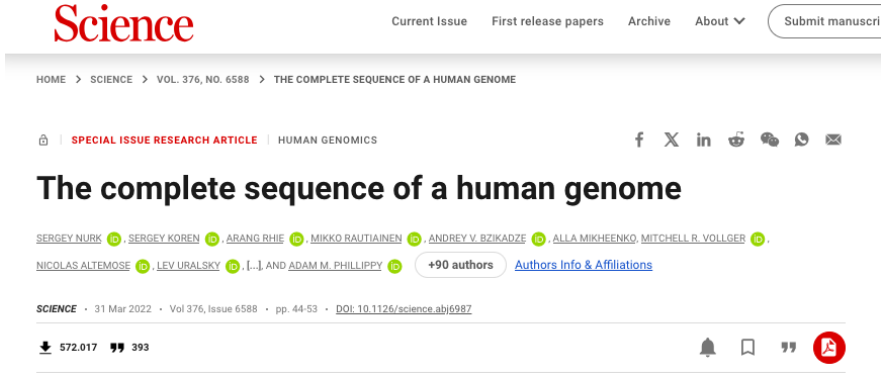
John Craig Venter (Celera)



NEXT GENERATION SEQUENCING:

Come sequenziare centinaia di milioni di brevi sequenze (35–100 bp) in un'unica corsa

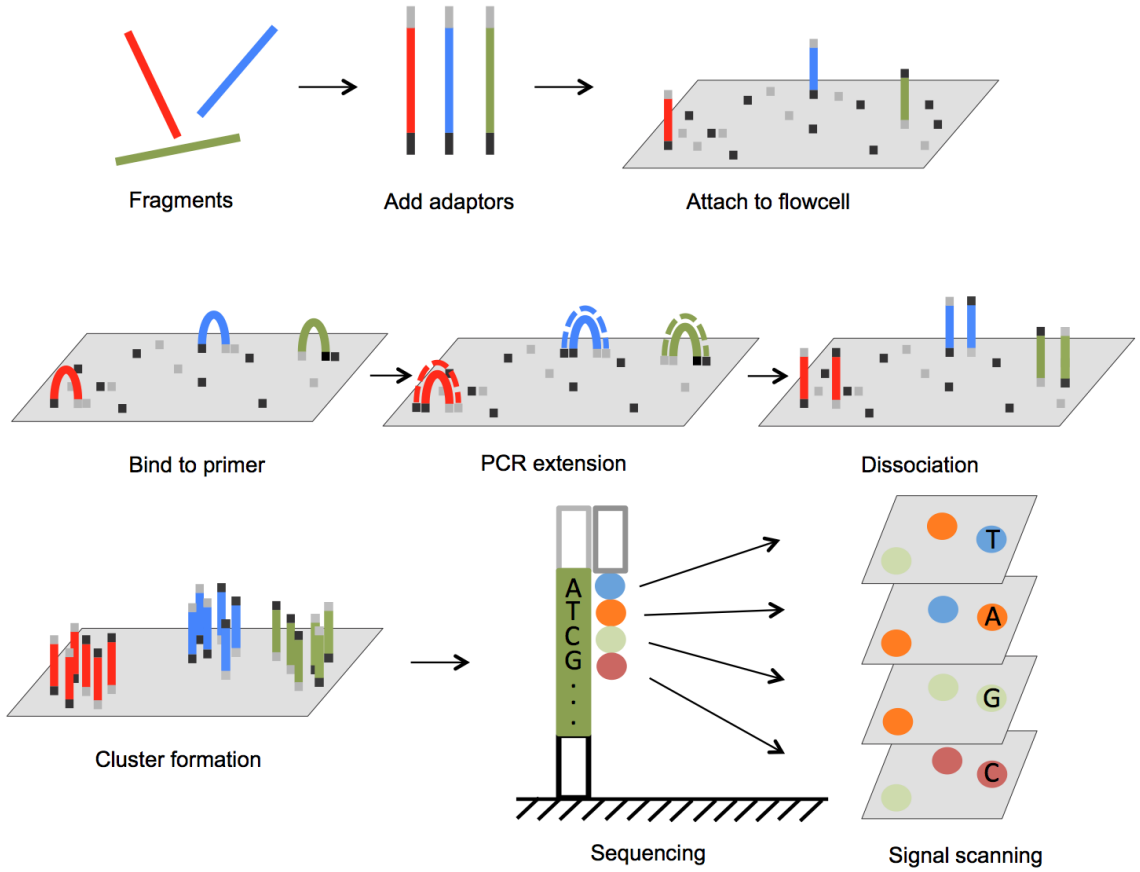
- **Progetto Genoma Umano – 2003:** ha richiesto 13 anni e 3 miliardi di dollari (CE)
- **Sequenziamento del genoma di Watson tramite tecnologia 454 (NGS) nel 2007 realizzato in circa 2 mesi:** 2 milioni di dollari
- **Il sequenziamento di un genoma oggi richiede da poche ore a giorni e costa circa 300-1000 euro**



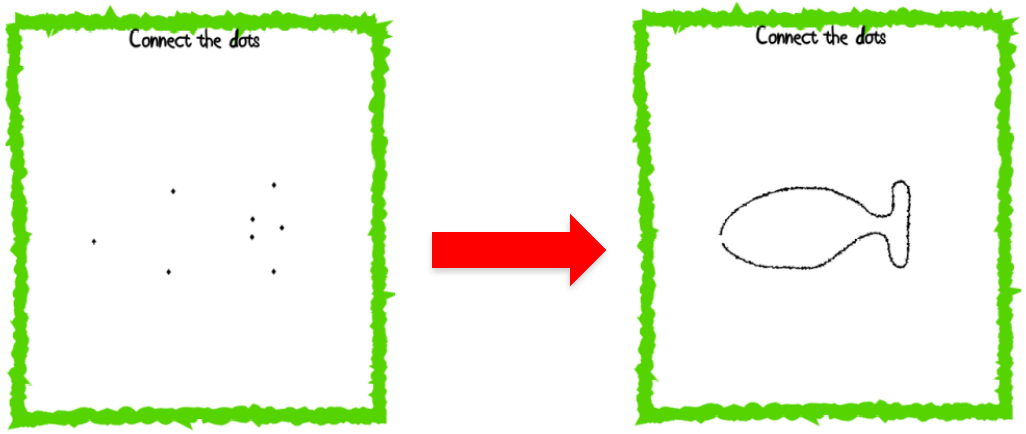
Addressing the remaining 8% of the genome, the Telomere-to-Telomere (T2T) Consortium presents a complete 3.055 billion–base pair sequence of a human genome, T2T-CHM13

01.04.2022

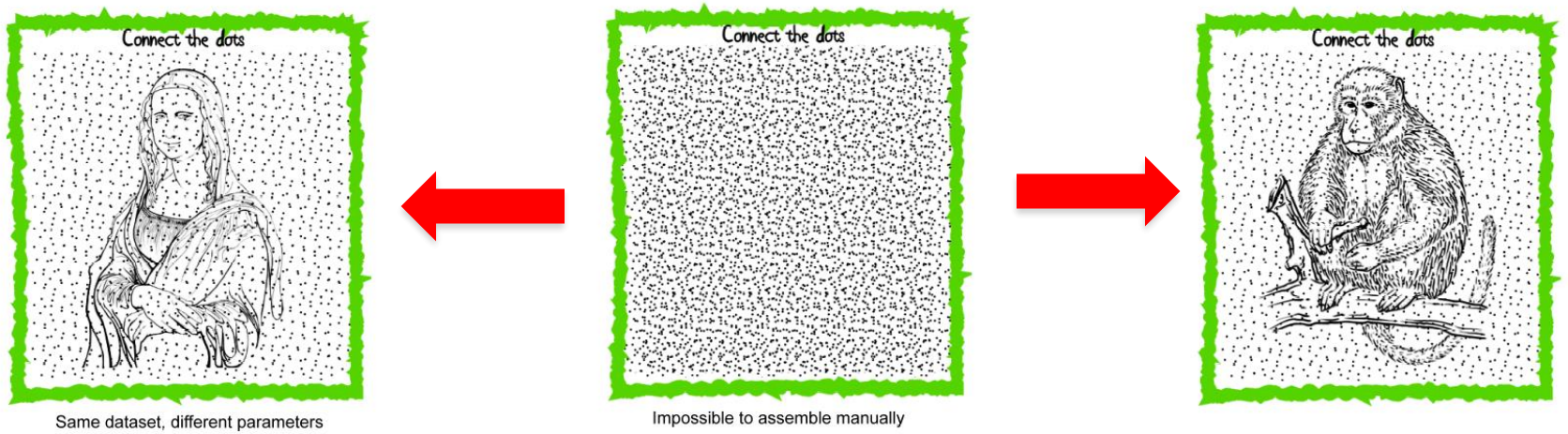
Schema del funzionamento di NGS



CE sequencing



NGS sequencing



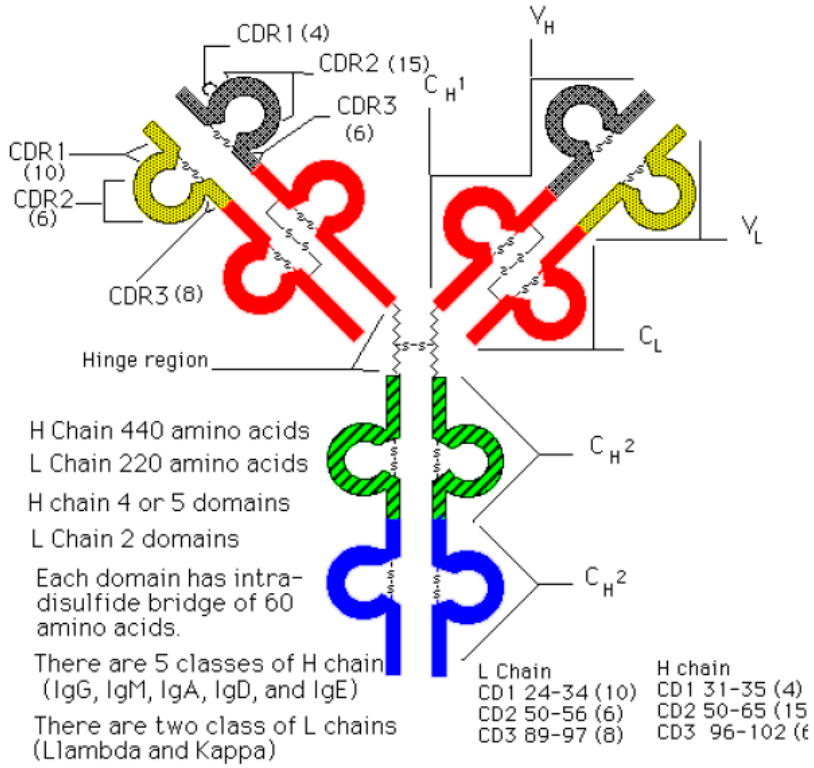
Same dataset, different parameters

Impossible to assemble manually

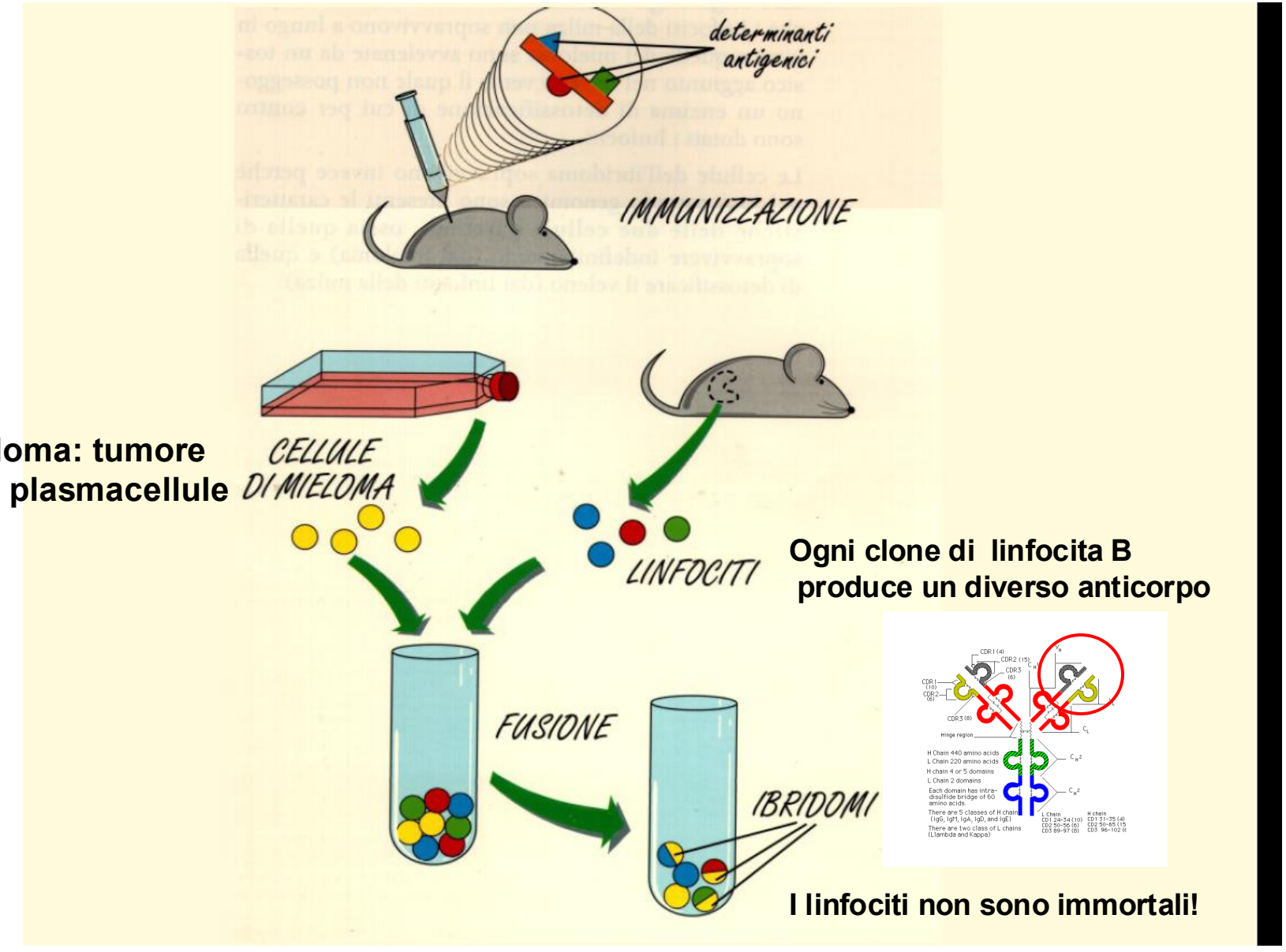
ANTICORPI MONOCLONALI

Struttura delle immunoglobuline

- **Gli anticorpi (Immunoglobuline) sono glicoproteine prodotte dai linfociti B.**
- **Sono in grado di riconoscere e legarsi ad "antigeni" (proteine, polisaccaridi, lipidi).**
- **La funzione degli anticorpi è quella di riconoscere e neutralizzare agenti estranei e/o patogeni, come, ad esempio, virus, batteri o tossine.**



Gli anticorpi monoclonali sono anticorpi specifici per un solo antigene



Mieloma: tumore delle plasmacellule

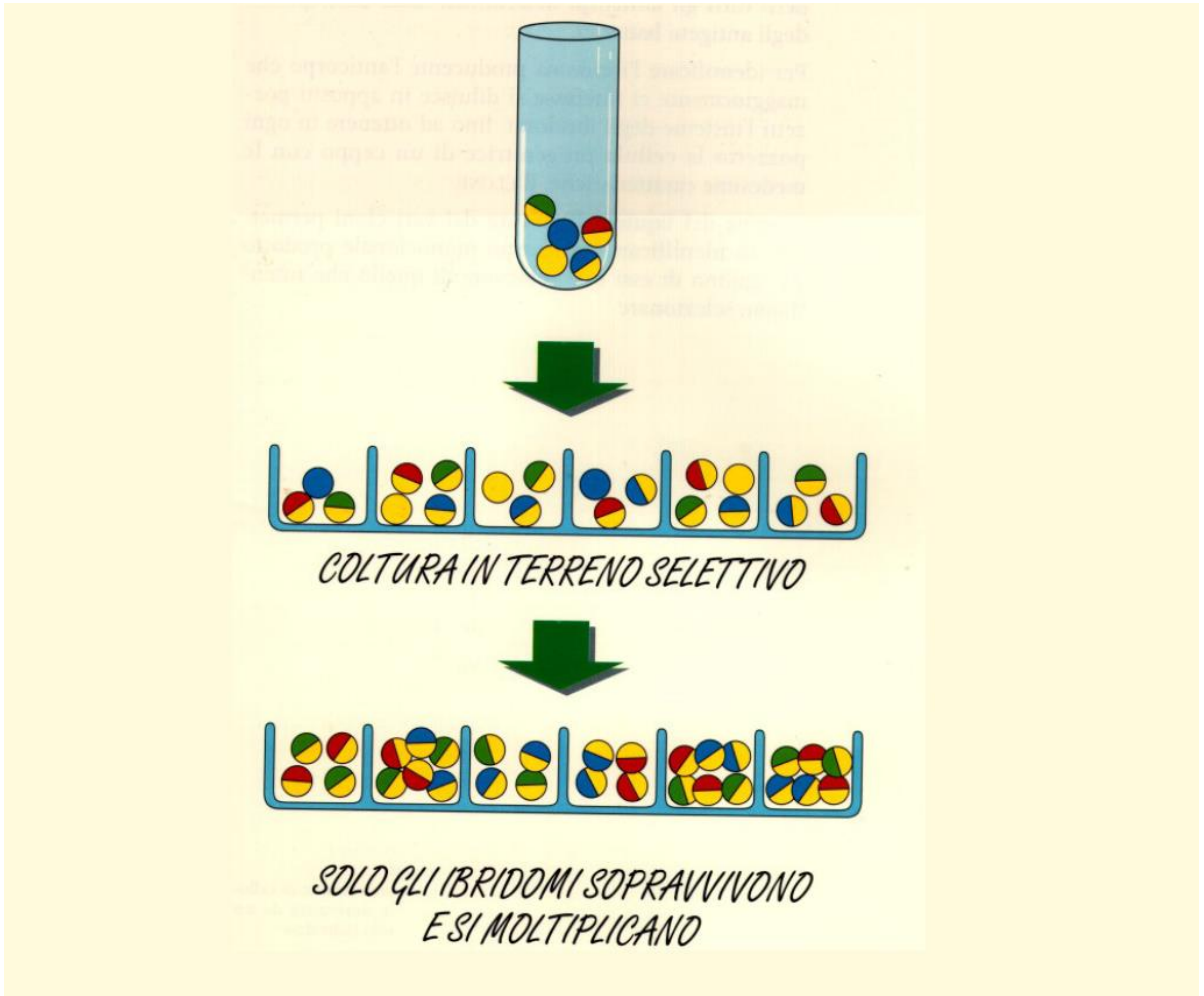
Ogni clone di linfocita B produce un diverso anticorpo

I linfociti non sono immortali!

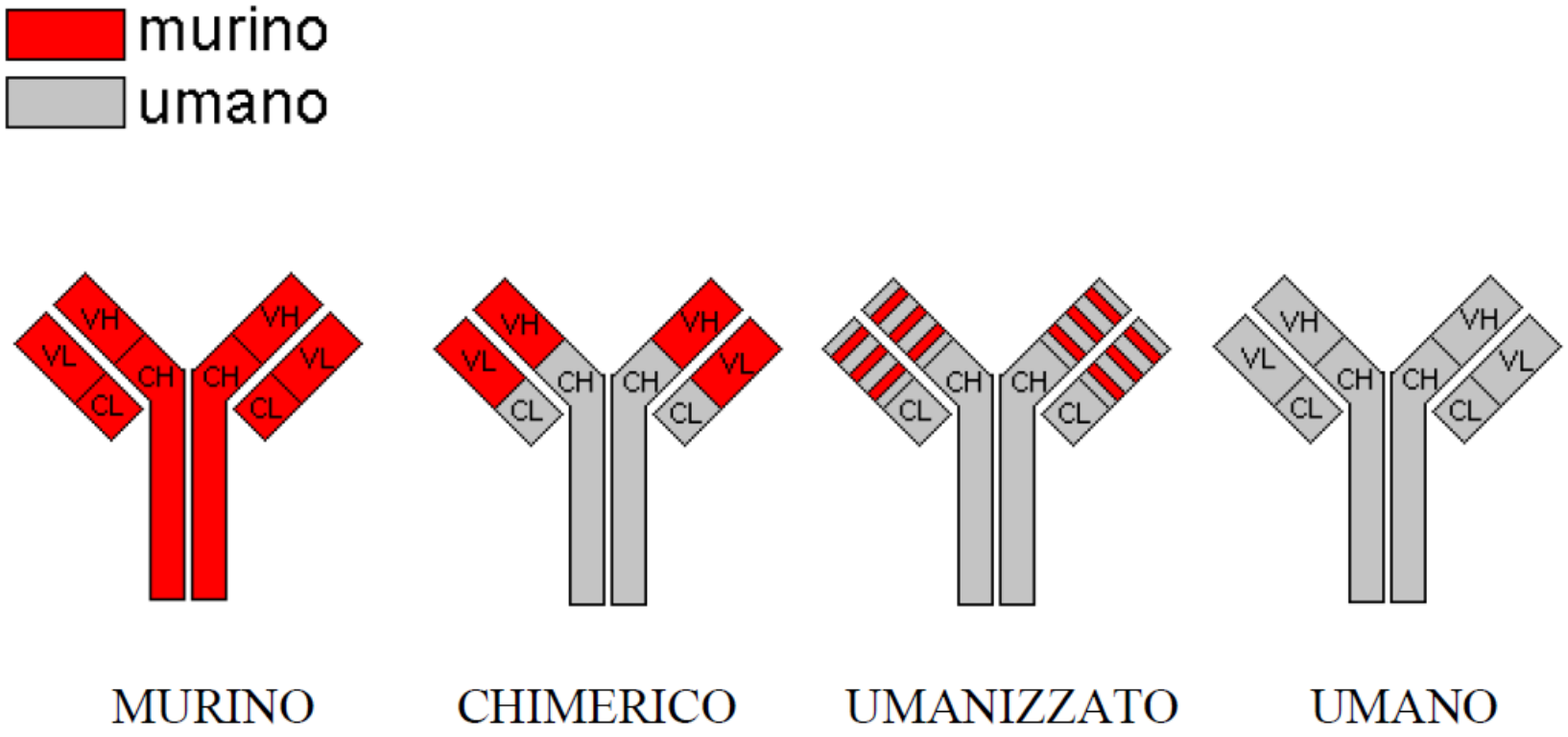
Le cellule di mieloma:

1) non secernono anticorpi

2)non hanno il gene HGPRT (hypoxanthin-guanina fosforibosiltransferasi gene) per cui sono sensibili al terreno di coltura HAT (terreno contenente ipoxantina-amminopterina-timidina)



Anticorpi monoclonali possono essere utilizzati a scopo terapeutico (umanizzati attraverso l'ingegneria genetica)



Common Origin Antibody	INN Representative Substem Examples
Chimeric -xi- Abcixi**mab**, Rituxi**mab**, Inflixi**mab**, Cetuxi**mab**	
Humanized -zu- Palivizu**mab**, Trastuzu**mab**, Bevacizu**mab**, Natalizu**mab**	
Human -u- Adalimu**mab**, Panitumu**mab** Golimu**mab**, Ipilimu**mab**	

CRISPR-Cas9

CRISPR-Cas9: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) e Cas9 (CRISPR-associated protein 9)

- Il sistema CRISPR-Cas9 è stato scoperto nei **batteri** (1993)

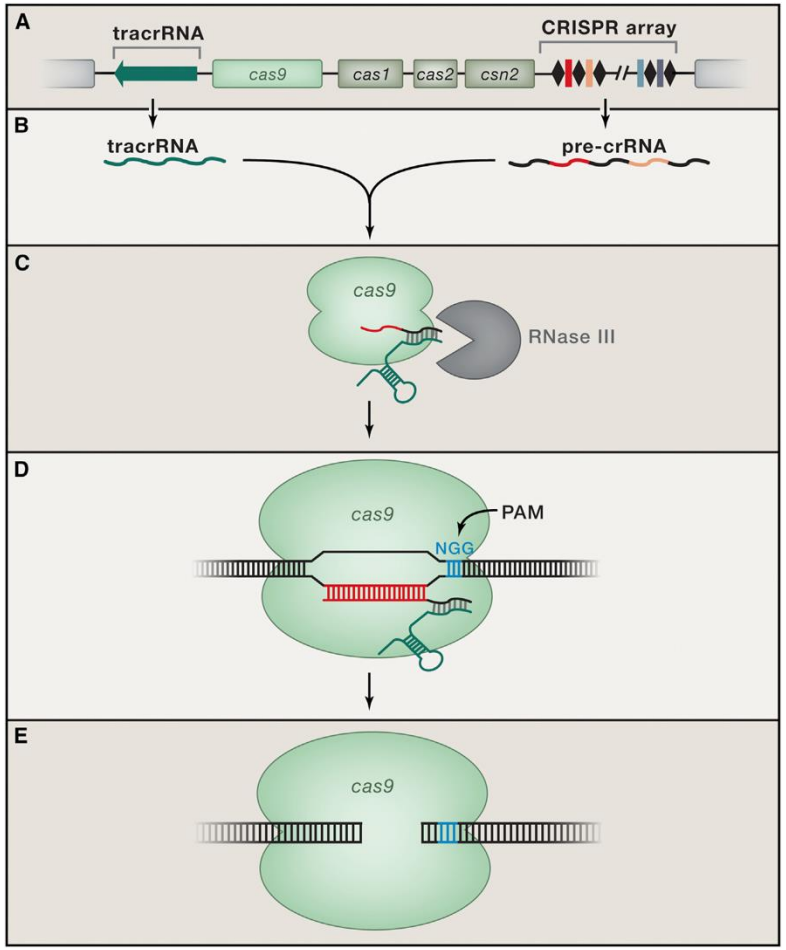
- **Sistema di difesa contro i virus** che presentano le sequenze presenti nel CRISPR-array prevengono successive infezioni da parte dello stesso virus

- Costituito da:

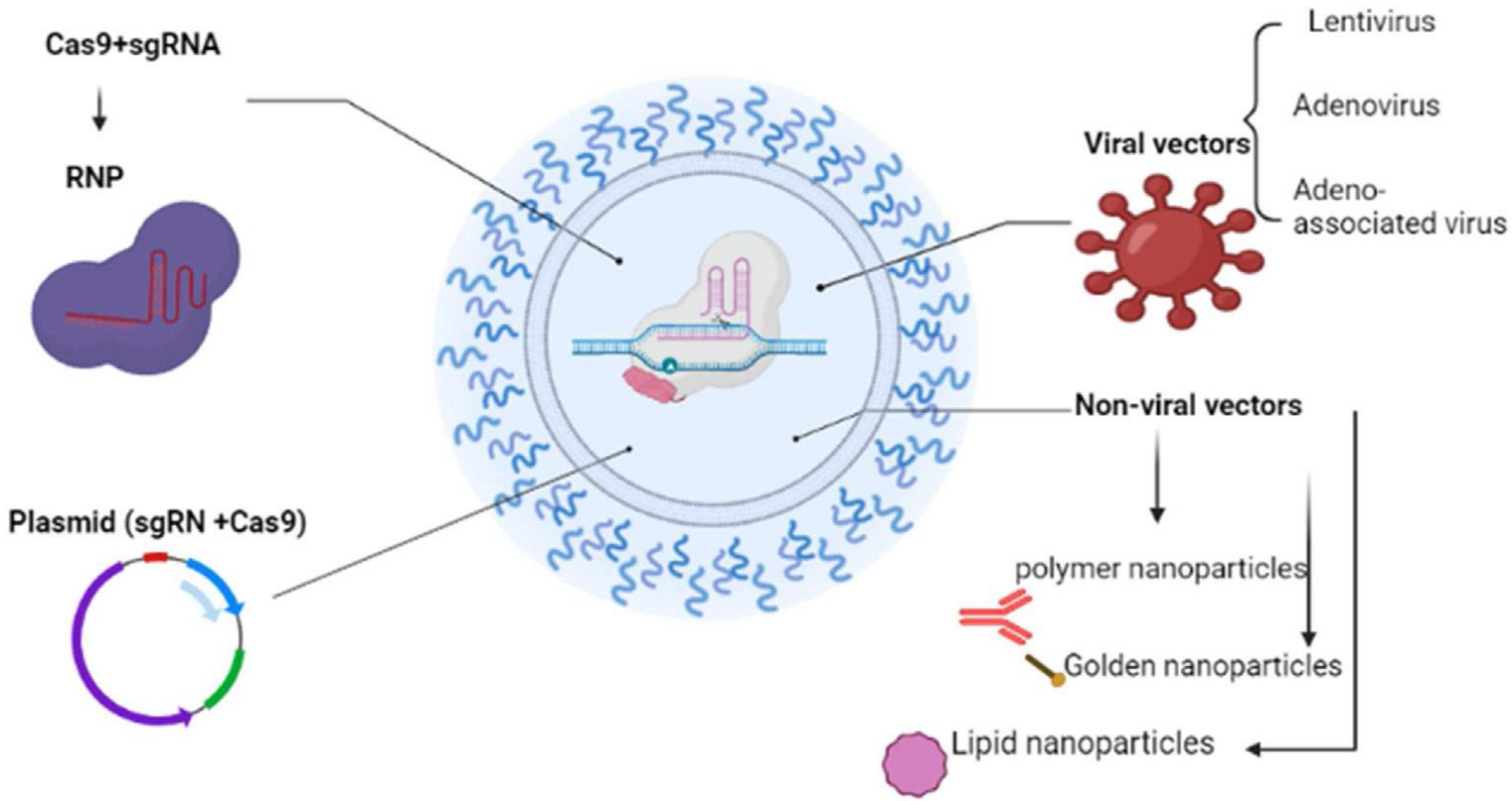
✓ **Componente CRISPR: Serie di sequenze di DNA ripetute** (codificano per pre-crRNA (CRISPR-associated RNA);

✓ **Componente Cas9**: Proteina che agisce come "forbice molecolare" per tagliare il DNA;

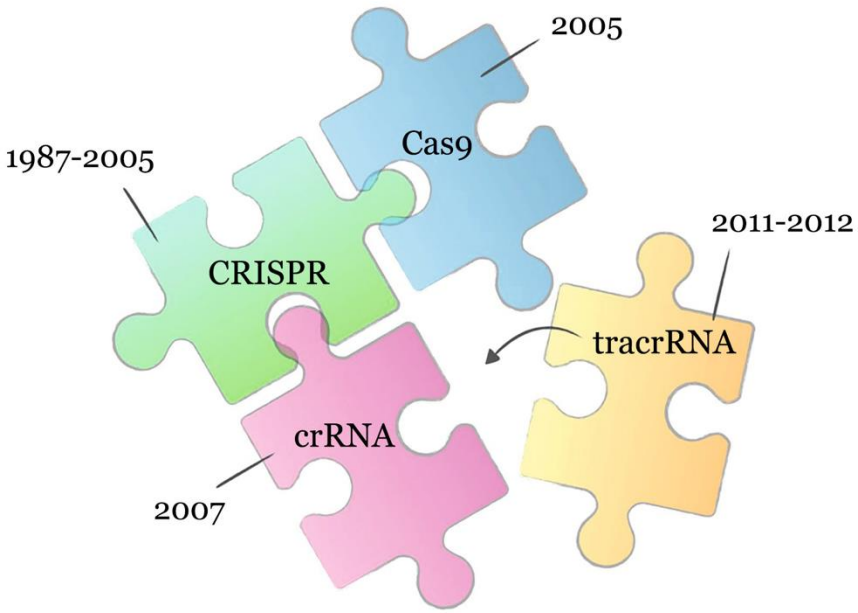
✓ **Guida RNA** (gRNA/tracr (transactivating) RNA): molecola che guida Cas9 verso il sito specifico del DNA da modificare.



CRISPR/Cas9 delivery platform



CRISPR/Cas, l'ultima frontiera dell'ingegneria genetica

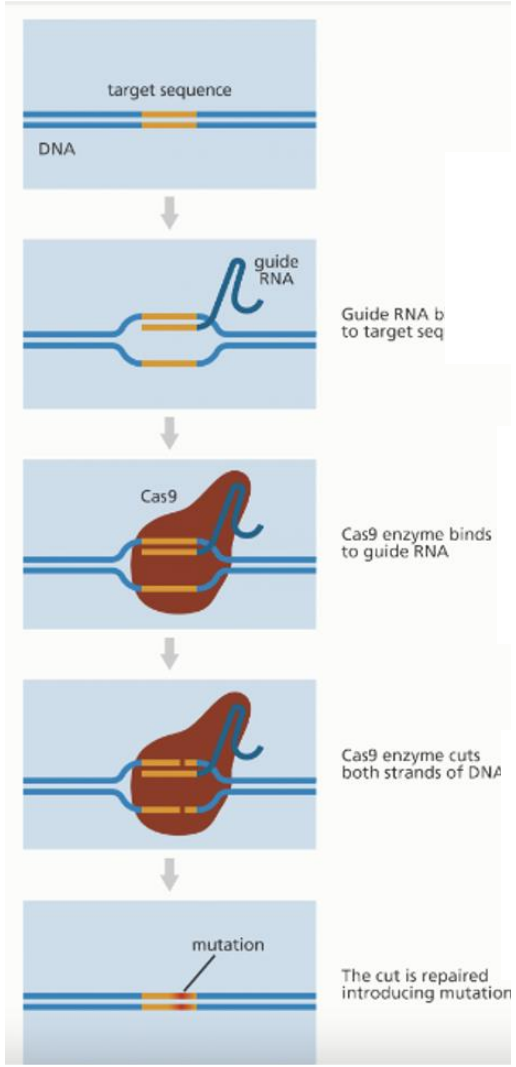


Nel 2012, **Jennifer Doudna e Emmanuelle Charpentier** hanno scoperto che progettando l'RNA guida per colpire una regione specifica nel genoma, **il sistema CRISPR-Cas9**

Il lavoro vincitore del Premio Nobel, in cui tutti i componenti sono stati assemblati in vitro e due molecole di RNA combinate in un unico filamento per la facilità d'uso del sistema, è stato pubblicato nel 2012 (Jinek et al 2012 Science)

Premio Nobel per la Chimica 2020

Evoluzione di CRISPR



RNA editing with CRISPR-Cas13

DAVID B. T. COX, JONATHAN S. GOOTENBERG, OMAR O. ABUDAYYEH, BRIAN FRANKLIN, MAX J. KELLNER, JULIA JOUNG, AND FENG ZHANG

Authors Info & Affiliations

SCIENCE · 25 Oct 2017 · Vol 358, Issue 6366 · pp. 1019-1027 · DOI: 10.1126/science.aaq0180

Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage

Nicole M. Gaudelli, Alexis C. Komor, Holly A. Rees, Michael S. Packer, Ahmed H. Badran, David I. Bryson & David R. Liu

Nature **551**, 464–471 (2017) | Cite this article

Article | Published: 21 October 2019

Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA

Andrew V. Anzalone, Peyton B. Randolph, Jessie R. Davis, Alexander A. Sousa, Luke W. Koblan, Jonathan M. Levy, Peter J. Chen, Christopher Wilson, Gregory A. Newby, Aditya Raguram & David R. Liu

Nature **576**, 149–157 (2019) | Cite this article