



Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche  
Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF, Sezione di  
Biologia Cellulare), Università di Palermo

# Il sequenziamento massivo del DNA: i suoi vantaggi e le grandi potenzialità

**Fabio Caradonna**



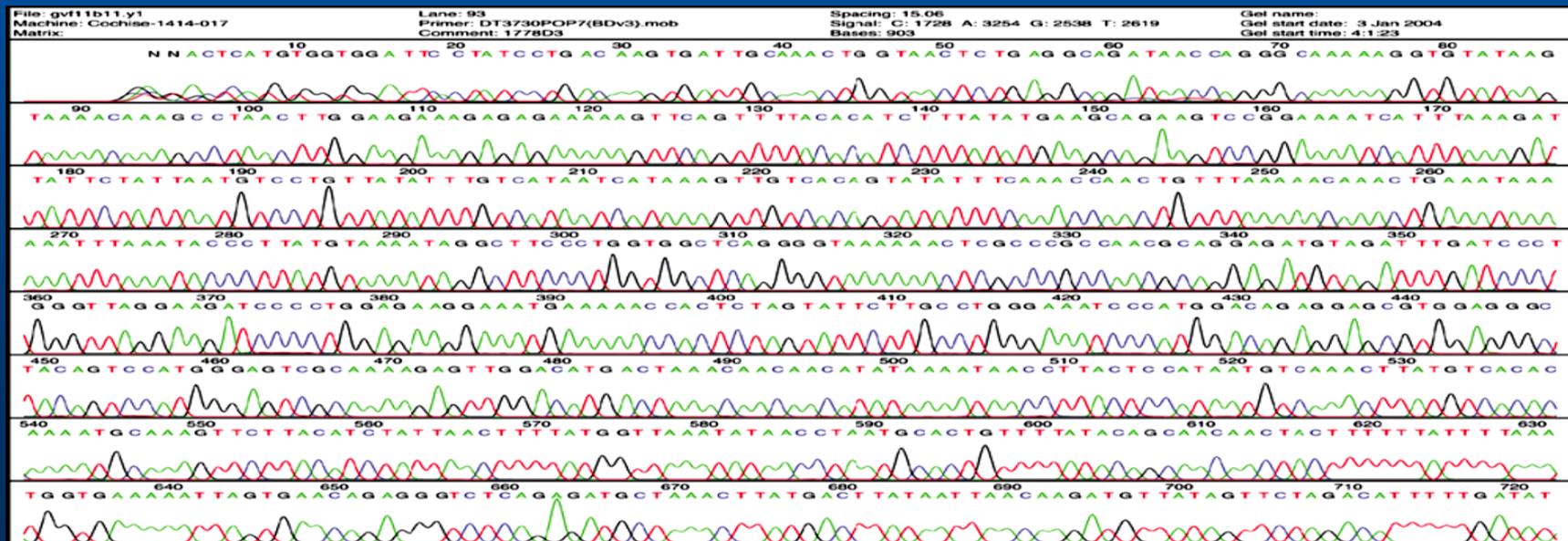
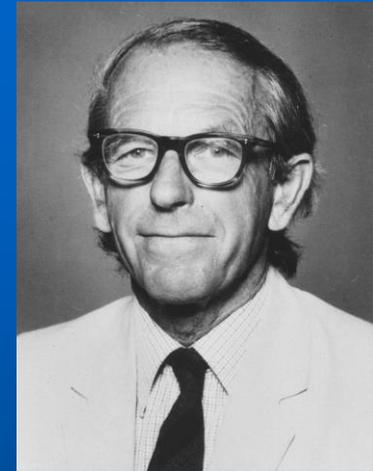
**XVI edizione**

**Hotel S. Lucia Le sabbie d'oro, Cefalù (PA), 25-30 luglio 2022**

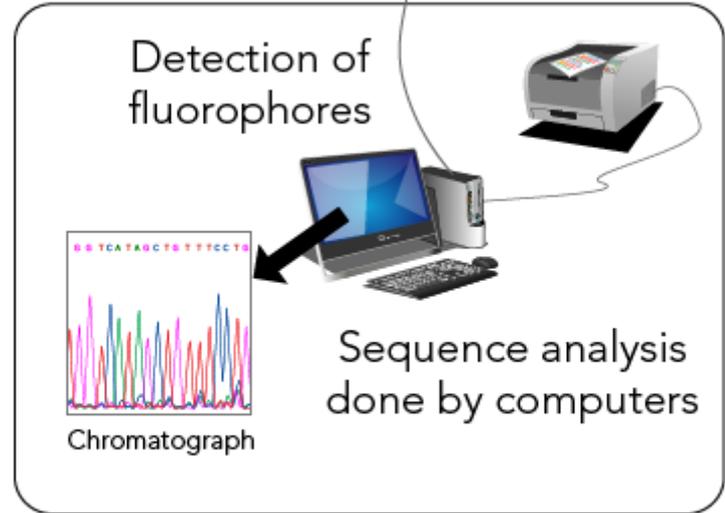
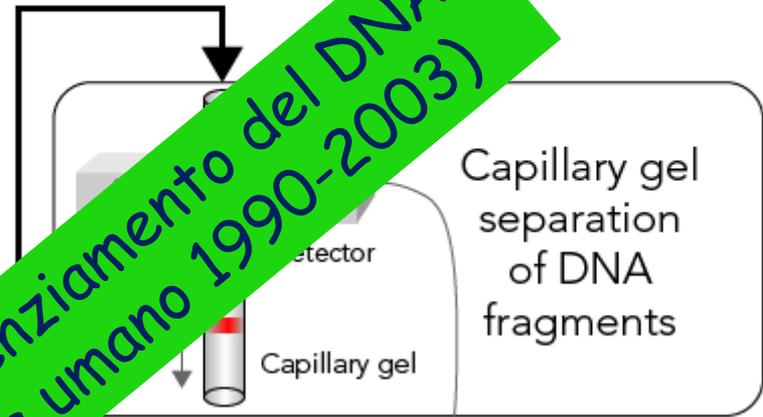
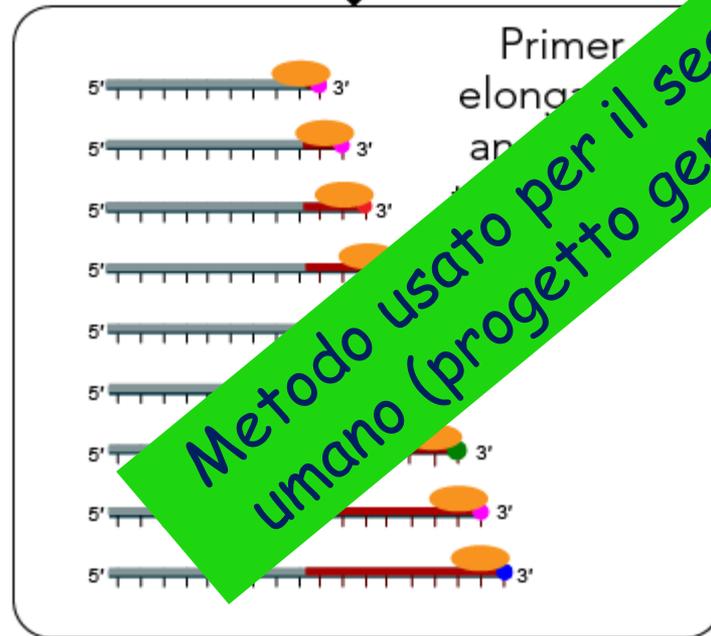
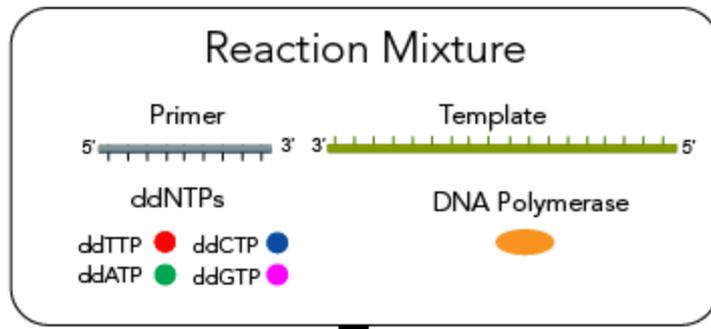
# Il sequenziamento del DNA negli ultimi 50 anni

Più di 40 anni fa, il 24 febbraio del 1977, la rivista «Nature» pubblica un articolo con la prima sequenza genomica del batteriofago  $\Phi$ X174 a firma di Frederick Sanger (premio Nobel per la chimica) basata sull'impiego dei nucleotidi di-deossi, terminatori di catena.

Accoppiata alla **PCR**, ad opera di Kary Mullis negli anni 80, il metodo di Sanger diventò fino ad oltre gli anni 2000, quindi per oltre 20 anni, il metodo di sequenziamento del DNA più diffuso e pratico, maggiormente quando è stato accoppiato all'elettroforesi capillare e sequenziatori automatizzati.



# Il sequenziamento di Sanger: uno schema a blocchi



Metodo usato per il sequenziamento del DNA umano (progetto genoma umano 1990-2003)

.....ma il progetto genoma umano evidenziò la grande «lentezza» del processo di sequenziamento.....

La sinergia tra istituti di ricerca e compagnie biotech ha permesso di inaugurare una nuova generazione di metodi di sequenziamento, chiamata Next Generation Sequencing (NGS).

Questa tecnica necessita di apparecchiature complesse a corredo di potenti hardwares e softwares.

I primi sequenziatori NGS commerciali sono stati introdotti sul mercato nel 2005 ma solo nei tempi odierni la diffusione è capillare per tutti i laboratori di genomica.



# Tradurre (sequenziare) un testo letterario

alla vecchia maniera o in maniera moderna SMART?

*To be, or not to be: that is the question: Whether 'tis nobler in the mind to suffer The slings and arrows of outrageous fortune, Or to take arms against a sea of troubles, And by opposing end them? To die: to sleep.*

## VECCHIA MANIERA:

- 1- TRADUZIONE TOTALE DATA AD UN SINGOLO.
- 2- TEMPO DI TRADUZIONE.
- 3- RACCOLTA DEL RISULTATO FINALE.

## NUOVA MANIERA:

- 1- RIDUZIONE "A PEZZI RANDOM" DEL BRANO.
- 2- PEZZI DATI A TANTI SOGGETTI.
- 3- TEMPO DI TRADUZIONE.
- 4- RACCOLTA DI TUTTE LE TRADUZIONI.
- 5- ALLINEAMENTO DELLE TRADUZIONI A PEZZI FINO A COPERTURA DELL'INTERO BRANO.
- 6-CONFRONTO CON UN BRANO DI RIFERIMENTO
- 7- RACCOLTA DEL RISULTATO FINALE

QUALI DEI DUE METODI SARA' PIU' VELOCE?

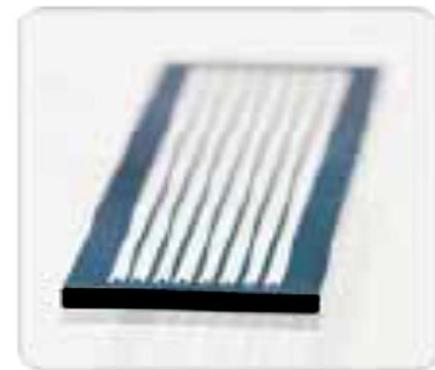
## Metodi e fasi della NGS

Esistono diversi tipi di sequenziatori NGS, spesso identificati con il nome della compagnia che li ha sviluppati. Tutti i metodi sono però accomunati da fasi simili.

L'obiettivo di base delle piattaforme di 2<sup>nd</sup> generazione NGS è:

- Generare un gran numero di "colonies" (polymerase generated colonies) sequenziate simultaneamente
- Queste reazioni parallele nel caso di Illumina avvengono sulla superficie di una "flow cell" che presenta una grande area superficiale e permette di alloggiare molte migliaia di reazioni chimiche parallele

FIGURE 1: ILLUMINA GENOME ANALYZER FLOW CELL



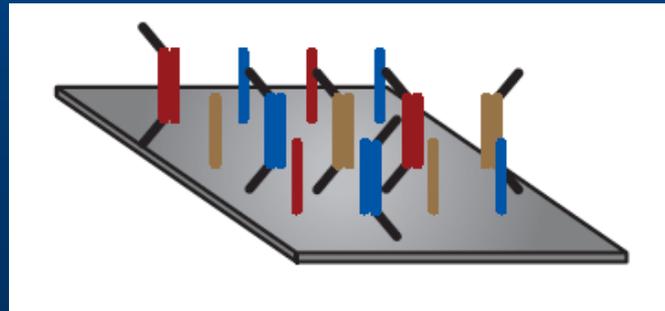
Up to eight samples can be loaded onto the flow cell for simultaneous analysis on the Illumina Genome Analyzer.

## Dettaglio delle 4 fasi di una NGS -tipo

La prima fase prevede la preparazione del DNA da sequenziare: l'acido nucleico viene frammentato e unito a speciali sequenze adattatrici.

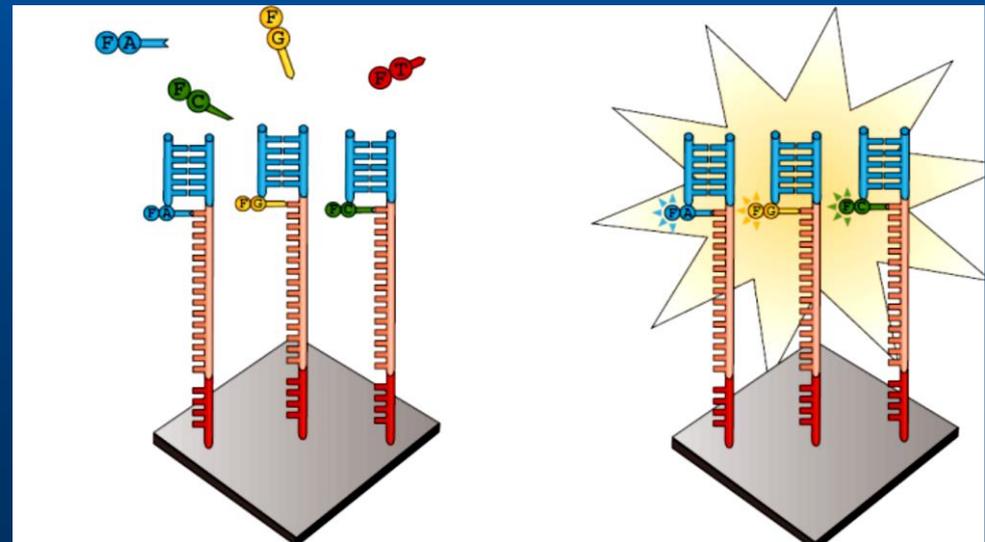
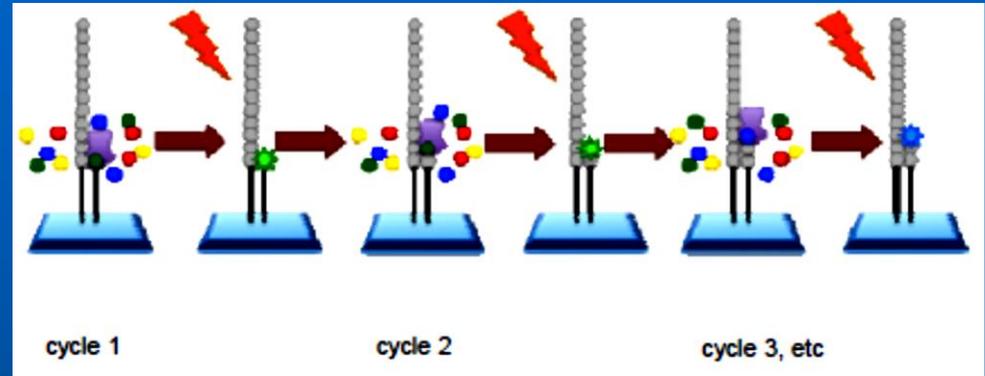


Nella seconda fase si ha la generazione di clusters, in cui i frammenti di DNA sono attaccati a un supporto solido simile a un vetrino e amplificati.

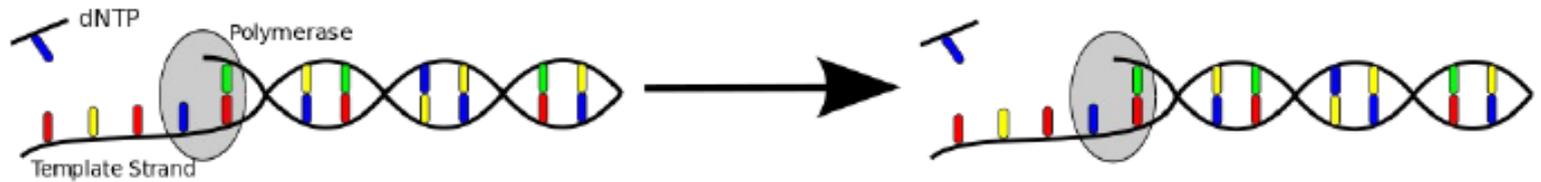


## Dettaglio delle 4 fasi di una NGS -tipo

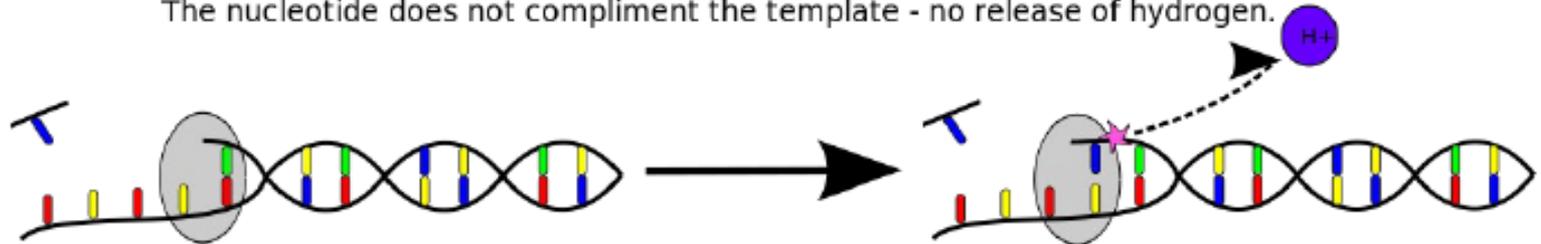
Nella terza fase si ha il vero e proprio sequenziamento, che spesso ricorre all'uso di ddNTP uniti a molecole fluorescenti.



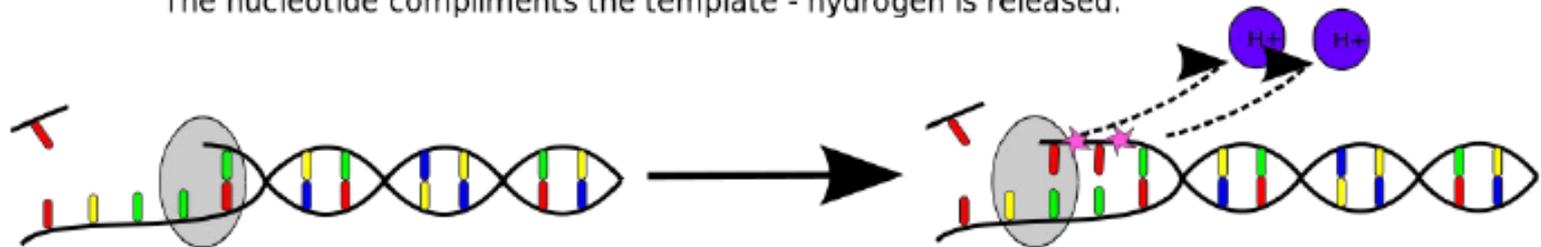
# Principio di rivelazione usato dal sequenziatore NGS «ION torrent»



The nucleotide does not compliment the template - no release of hydrogen.



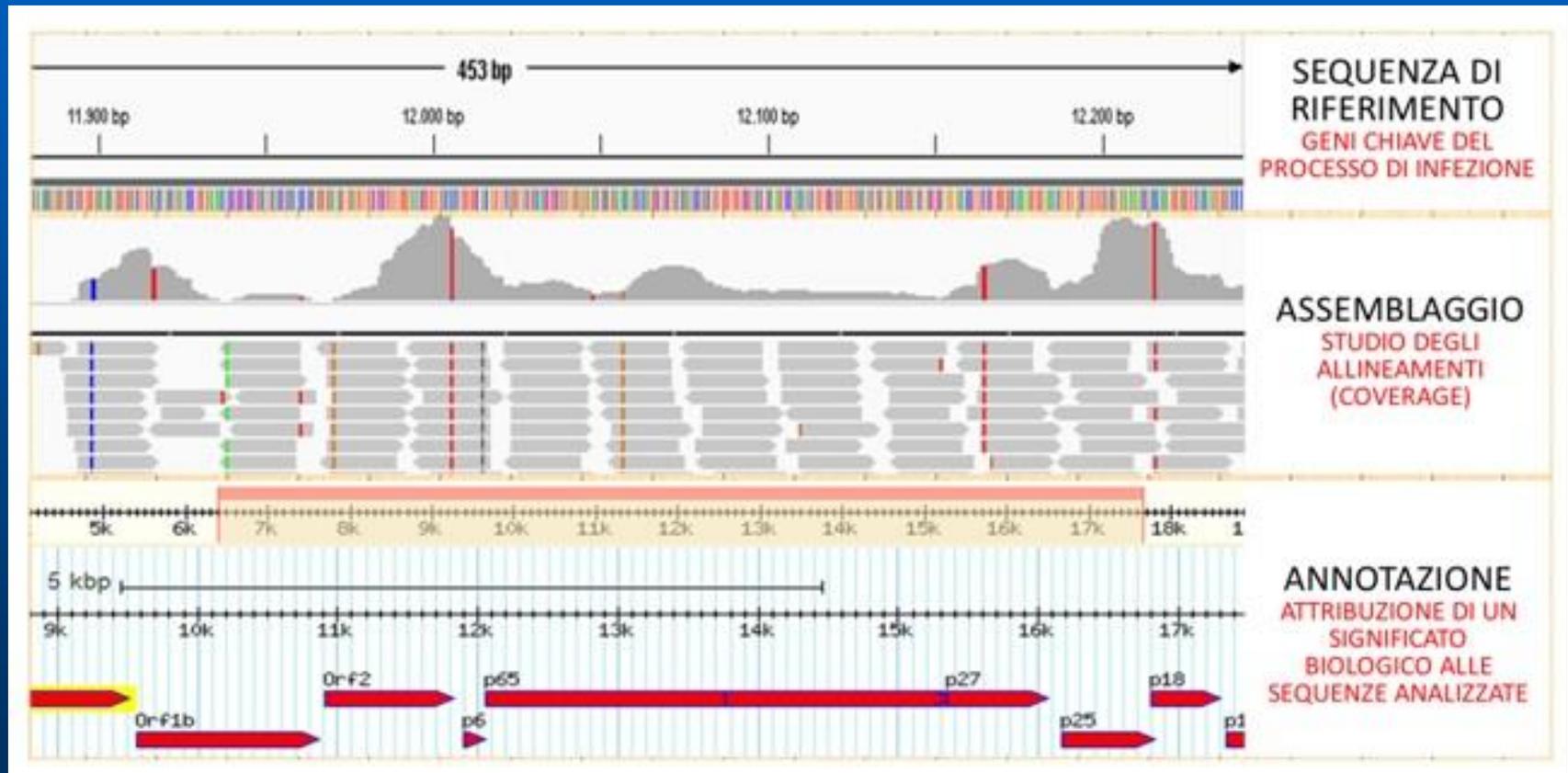
The nucleotide compliments the template - hydrogen is released.



The nucleotide compliments several bases in a row - multiple hydrogen ions are released.

## Dettaglio delle 4 fasi di una NGS -tipo

La quarta fase è quella della analisi bioinformatica, basata sul confronto tra le sequenze ottenute e un DNA di riferimento.



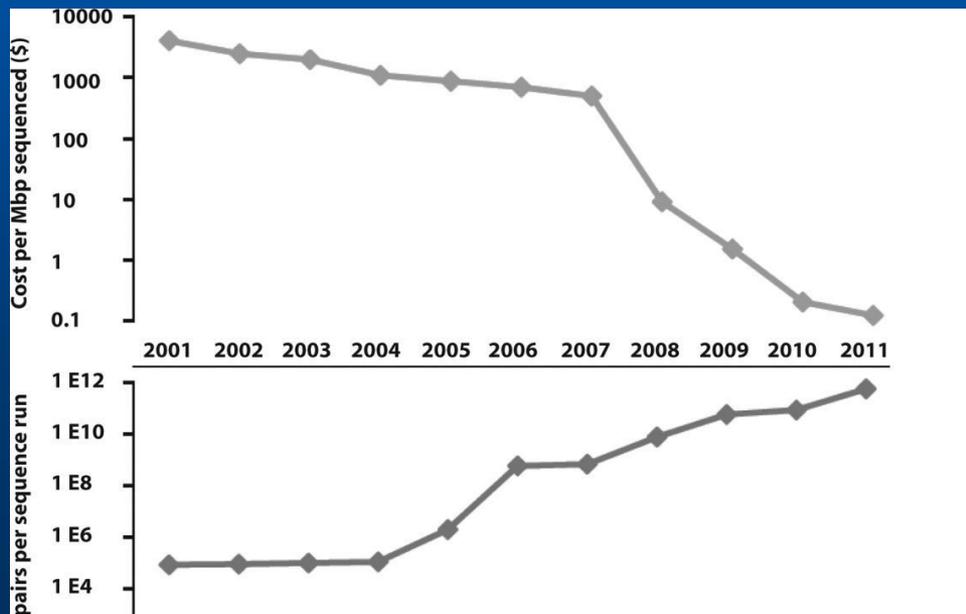
## Vantaggi e limiti rispetto al metodo di Sanger

A differenza del metodo Sanger tradizionale, la NGS permette oggi di analizzare moltissime sequenze in parallelo, abbattendo i tempi di analisi e i costi.

Nella NGS la rivelazione del segnale avviene in contemporanea alla polimerizzazione mentre nel Sanger avveniva in un secondo momento e questo, moltiplicato per un numero enorme di letture accorcia di molto il processo.

Per fare un paragone, ricordiamo che il sequenziamento del progetto genoma umano, basato sul metodo Sanger, ha richiesto un investimento di quasi 100 milioni di dollari e una durata di alcuni anni.

Oggi, tramite la NGS, la sequenza di un genoma umano si può ottenere con appena 1000 euro in 24 ore.



Come quello di Sanger, il sequenziamento con piattaforme massive NGS porta alla perdita di informazioni "accessorie", come per esempio la costellazione di modificazioni epigenetiche che sono importanti per comprendere la funzione di un frammento di genoma.



**HUMAN EXOME**

- 57.7 Mb capture
- 70x minimum coverage
- 150-200 average read length

starting **\$600**

A graphic showing a 3D model of a DNA double helix with different segments highlighted in red, green, and blue.



Single Cell Genomics

A graphic showing several cells, some of which are glowing with a blue light, representing single-cell genomics.

# APPLICAZIONI DELLA NGS



**The 100,000 Genomes Project**

Genomics England & Partners

A graphic featuring a stylized DNA double helix with vertical bars of varying heights representing genetic data.

## La NGS ha permesso il «genome re-sequencing» dando spazio allo studio della variabilità genetica umana

Il progetto 1000 genomi (concluso nel 2015) ha coinvolto 24 popolazioni umane ed ha consentito di avere dati su 15 milioni di polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) e svariati segmenti ripetuti (CNV) alcuni associati a stati patologici.

Poi ha fatto scoprire una gran parte di variabilità genetica neutra fino a qualche tempo fa associata a sequenze di DNA a funzione sconosciuta.



Proprio per le potenzialità e la velocità/efficienza della NGS, si è deciso di aumentare la sensibilità degli studi sulla variabilità genetica umana ed oggi ha preso avvio il progetto 100.000 genomi (umani).

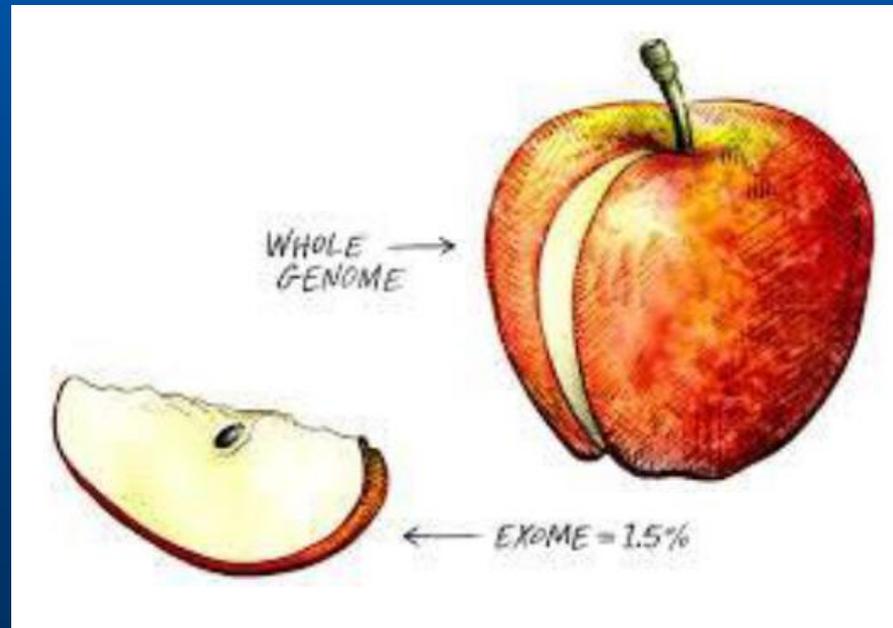
Questo sta restituendo il dato sorprendente ed affascinante che il 70% del genoma umano è trascritto, anche se una piccola parte è poi tradotta.

## IL SEQUENZIAMENTO MASSIVO DELL'ESOMA UMANO

Sappiamo che i geni codificanti negli eucarioti sono «interrotti» cioè formati da esoni ed introni.

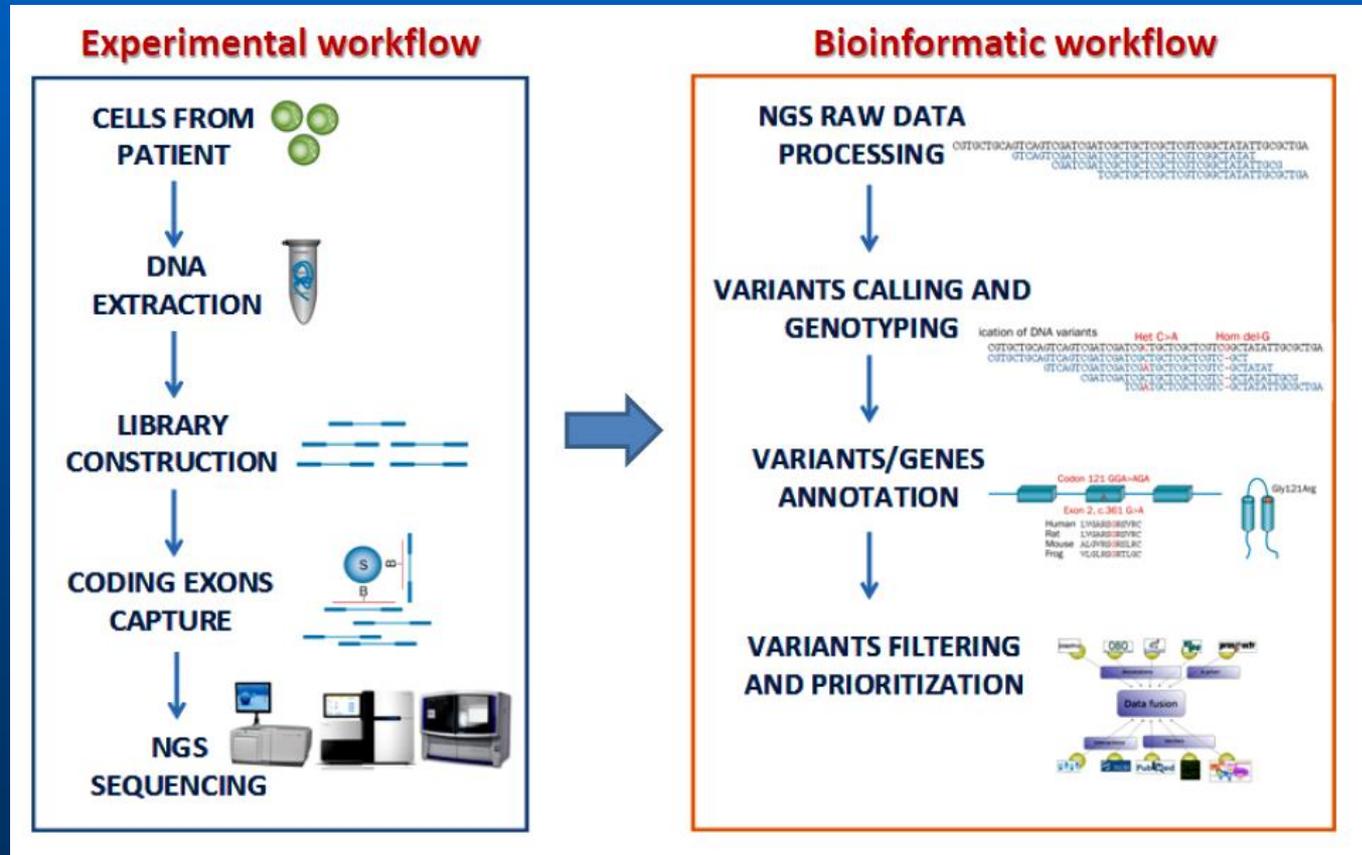
L'insieme degli esoni di un genoma **si chiama esoma**. L'analisi, tramite tecniche di sequenziamento massivo NGS, si chiama «Whole Exome Sequencing (WES).

Le analisi WES danno quindi uno spaccato di una piccola parte del nostro genoma ma estremamente importante perché rappresenta la totalità della sequenza della parte codificante.



## Perché sequenziare l'ESOMA umano?

E' stato già detto che avere informazioni dal WES significa avere informazioni sul 3% del genoma ma anche sull'80% delle sequenze genomiche più legate a patologie in quanto coinvolte nella gestione di parecchi fenotipi.

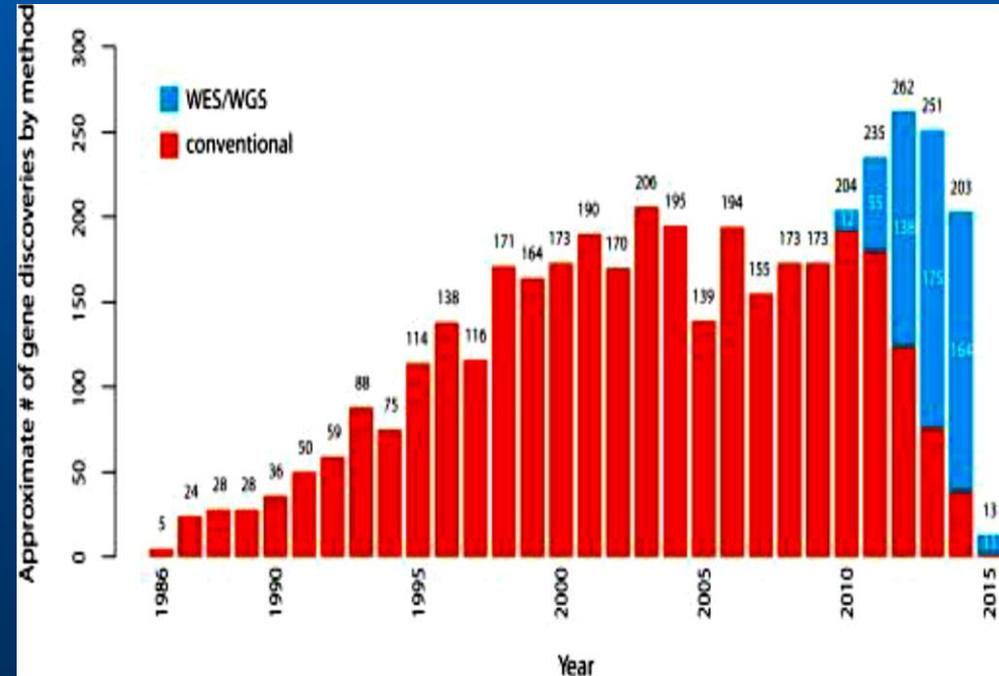
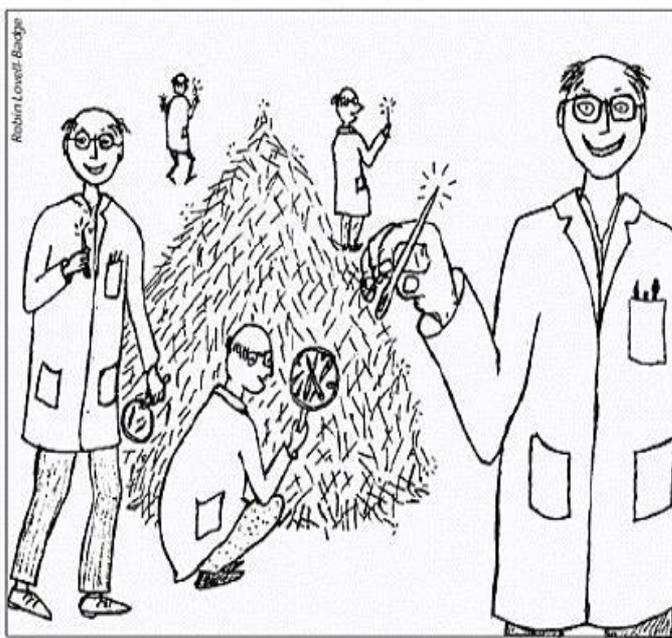


## L'ESOMA umano: una svolta nello studio dei geni-malattia

Nell'esoma potrebbero essere nascosto più dell'80% delle mutazioni patologiche della specie umana.

Quindi cercare queste mutazioni pensando di sequenziare tutto il DNA genomico rispetto a cercarlo avendo la possibilità di sequenziare soltanto la parte esonica significa **RIUSCIRE A TROVARE UN AGO IN UN PAGLIAIO**.

La svolta che la WES ha dato alla diagnostica delle malattie è notevole: moltissimi geni sono stati scoperti negli ultimi anni grazie all'uso di questa tecnica NGS.



## Serve lo strumento ma serve soprattutto un «bravo e buon» operatore

Quando si allineano vari frammenti, passaggio obbligato in tecniche NGS, la determinazione di un singolo nucleotide in una WES è cosa assai delicata: può fare la differenza fra l'esistenza di una mutazione o no.

Per questo motivo esistono dei software a corredo della strumentazione che operano allineamenti di singole sequenze su base statistica: **si stabilisce una soglia** (treshold) o si accetta quella che lo strumento propone e su queste basi viene operato un «filtering» più adeguato restituendo **la sequenza più statisticamente probabile**.

Non è detto che trovare una mutazione con WES corrisponda ad un fenotipo sull'individuo in quanto potrebbe essere che la manifestazione sia ritardata da altre condizioni legate all'età, alle influenze ormonali o altro. **Esempio: analisi su neonati**.

Questo apre nuove enormi problematiche etiche in quanto i referti consegnati, oltre a riferirsi al probando, portano inevitabilmente a conseguenze sociali sui comportamenti dei genitori e le loro scelte future.

IL DIRITTO  
DI NON  
SAPERE



## Whole Exome Sequencing: altri risvolti etici, sociali ed economici

È successo che alcuni WES oggi negativi, se ripetuti in seguito, rivelano alterazioni, probabilmente a causa di diverse espressioni geniche nel tempo. Questo prima non veniva considerato ma oggi si.

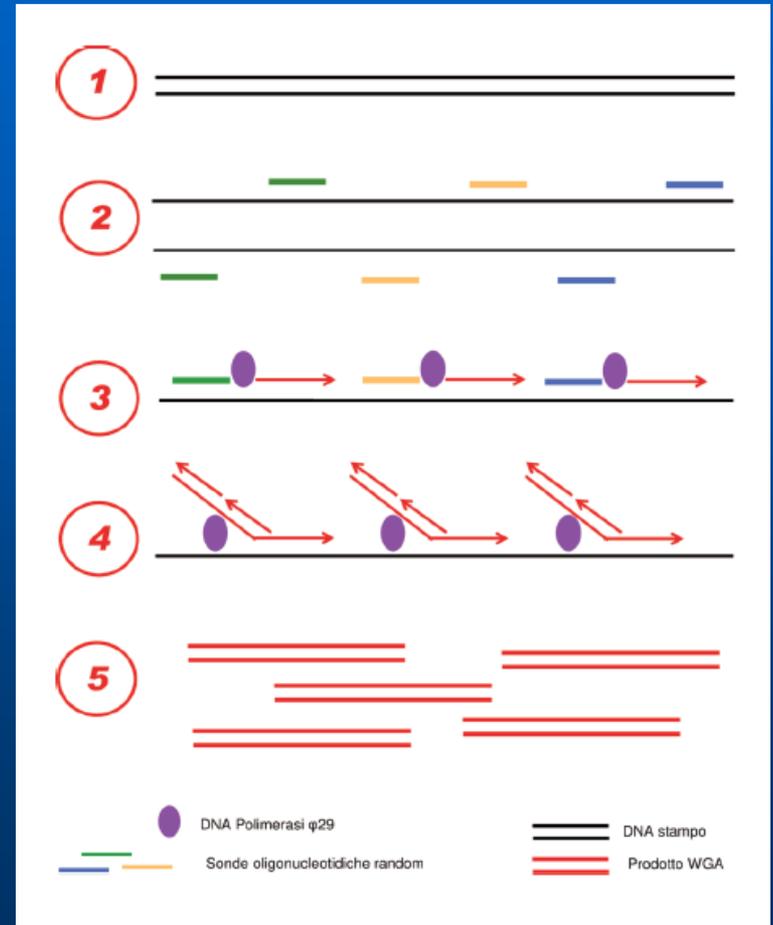
La WES allora è quindi un esame che tipicamente andrebbe ripetuto nel tempo, se non fosse per i suoi costi ancora elevati, almeno per il SSN: come risolvere i casi di negatività in cui non viene ripetuto nel tempo l'analisi? Si può consegnare una sicurezza al soggetto? E' socialmente ed economicamente sostenibile una ripetizione seriale per tutti?

Gilssen et al., 2014 (Nature) hanno dimostrato tramite WES che un 40% di geni sono coinvolti nei disturbi neuropsichiatrici confermando gli studi di genetica diretta condotti in passato che davano la componente genetica come presente in queste patologie.....

..... ma spesso questi disturbi neuropsichiatrici sono multifattoriali e contemplano più concause di insorgenza non tutte egualmente probabili per vari soggetti con la conseguenza che aver trovato una mutazione tramite WES ad un soggetto può non corrispondere mai o per lungo tempo allo sviluppo della patologia

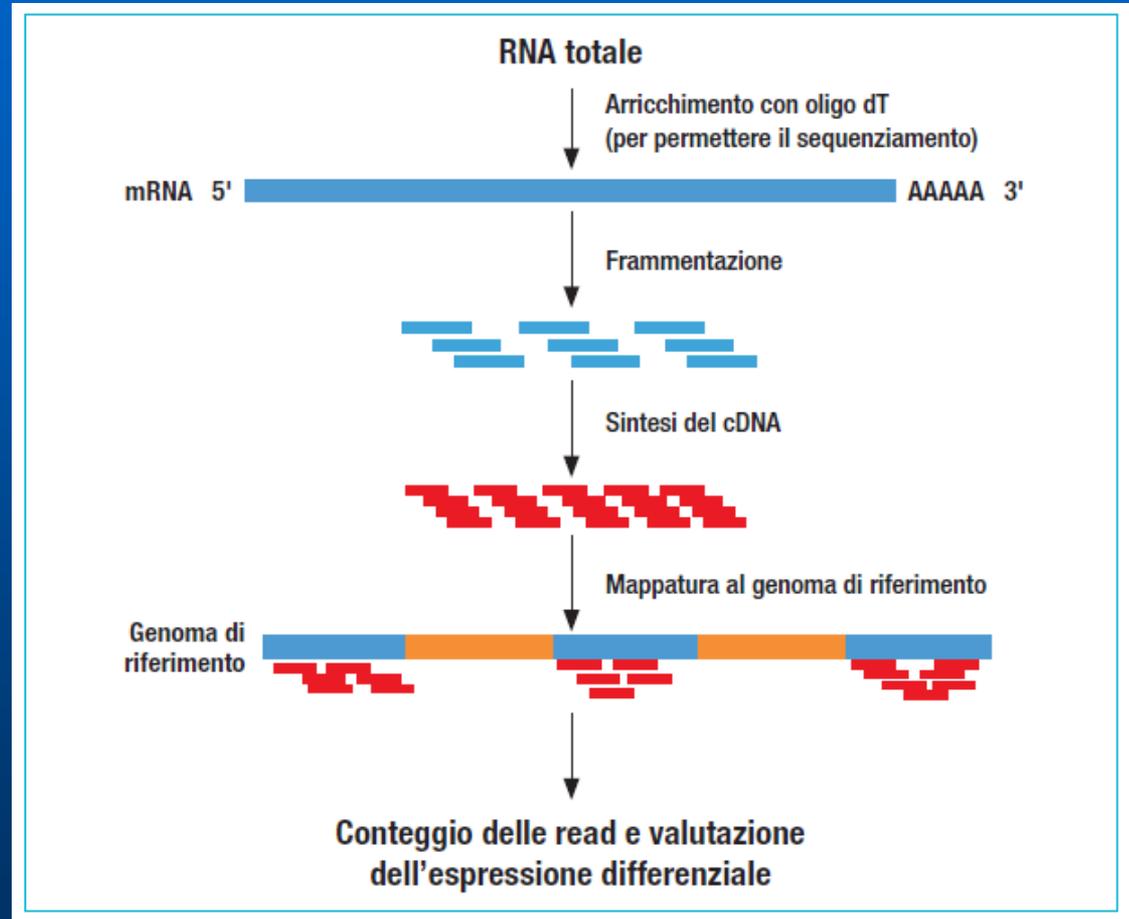
## Altre applicazioni di tecniche di sequenziamento massivo NGS

### WHOLE GENOME SEQUENCING attraverso la Degenerate Oligonucleotide Primed-PCR (DOP-PCR)



## Altre applicazioni di tecniche di sequenziamento massivo NGS

**RNA-Seq**  
attraverso  
amplificazione ed  
allineamento di  
sequenze su un  
genoma di  
riferimento



## Altre applicazioni di tecniche di sequenziamento massivo NGS

### AMBITO FORENSE

- Identificazione personale.
- Rapporto di parentela.
- Origine geografica del soggetto.
- Età teorica del soggetto.
- Indicazioni sul suo fenotipo (colore degli occhi, dei capelli, della pelle, etc).



Tramite l'NGS la genetica forense, oggi, non risponde più alla classica domanda "è lui o non è lui" su una base di una rosa di sospettati. Ma risponde alla domanda "chi potrebbe essere?", anche in assenza di una rosa di sospettati.

Dopo aver effettuato le analisi con WGS ed avere ottenute le sequenze di tracce biologiche si possono consultare dei tools gratuiti in rete dove immettendo una serie di alleli polimorfici ritrovati possono venir fuori tratti descrittivi di uno «statistico proprietario» di quegli alleli.

Inoltre, facendo una WGS su DNA pre-trattato con bisolfito di sodio si può ottenere il livello genomico di metilazione del DNA, che come è noto, varia con l'età arrivando ad ottenere una precisione di circa più o meno 7 anni sulla previsione di età anagrafica del possessore di quel DNA.

## Altre applicazioni di tecniche di sequenziamento massivo NGS

### AMBITO NUTRIZIONALE

- Identificazione del profilo nutrigenetico
- Identificazione del microbioma



La NGS di ultima generazione serve alla metagenomica, per esempio, per sequenziare in seriale nel tempo, intere comunità di microrganismi del microbiota umano per studiare la variabilità intraspecie, le variazioni in base all'età, alle disbiosi ed al ripristino dell'eubiosi.

### AMBITO DIAGNOSI PRENATALE

- Screening per principali cromosomopatie
- Esclusione o inclusione di paternità a scopo terapeutico per madre/figlio-a.

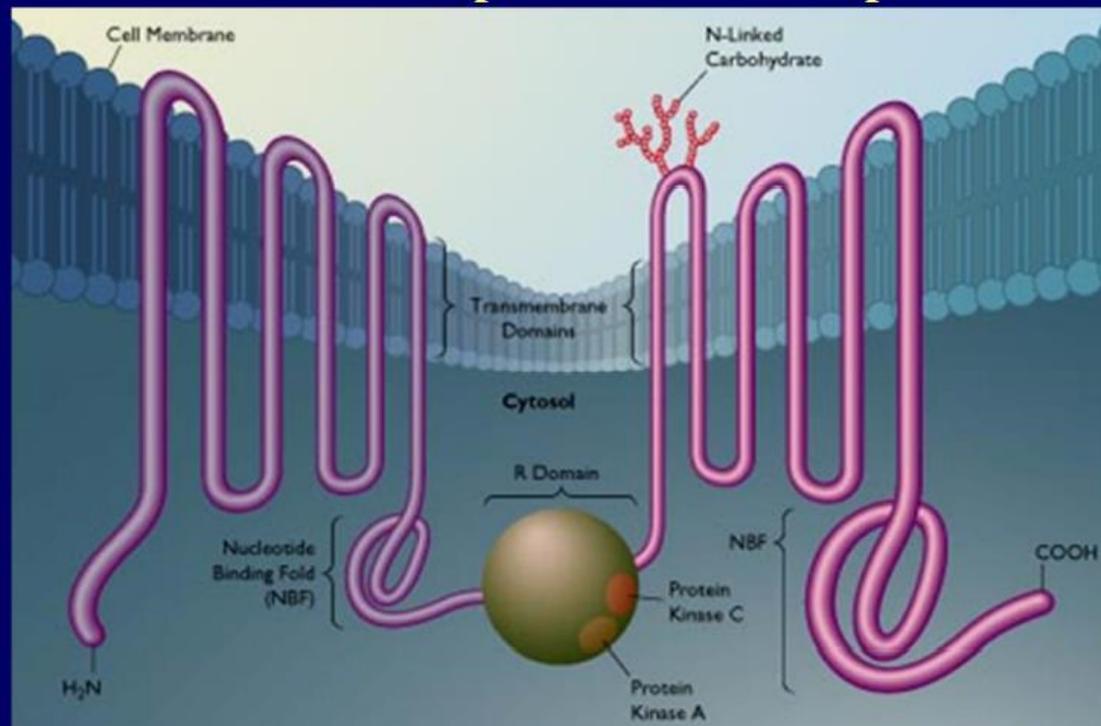


Analisi di DNA fetale nel sangue materno per le cromosomopatie 13, 18, 21, X.  
Analisi di DNA fetale nel sangue materno per polimorfismi genitoriali o parentali.

Le tecniche di sequenziamento massivo NGS hanno cambiato la diagnostica e la cura di una delle patologie genetiche più diffuse: la **Fibrosi Cistica**

## La proteina CFTR (1)

è una proteina transmembrana con funzioni di canale ionico nella membrana apicale delle cellule epiteliali



## Quante varianti nel CFTR?

Nel database CFTR1 sono elencate **2027 varianti**

Nel database CFTR2, **374 varianti** sono classificate dal punto di vista clinico-funzionale:

- 312 CF-causing
- 36 Varying clinical consequences
- 13 Non CF-causing
- 13 Unknown significance

L'NGS ha cambiato la ricerca mutazionale della FC. Adesso è possibile stimare con una buona dose di veridicità che in Italia ci siano 3,3/100 portatori di FC.

Infatti, considerando che il portatore non ha manifestazioni fenotipiche, ma è identificabile solo su base genetica, solo le tecniche di sequenziamento massivo NGS hanno permesso l'ottenimento di questo dato importante per mettere in campo politiche di prevenzione, spostamenti di risorse ed altro.

Nonostante la genetica sia semplice, la FC è complessa: due pazienti con stesse caratteristiche possono avere genotipi diversi e due soggetti con genotipo uguale possono non avere manifestazioni della patologia uguali.



Submit a Manuscript: <http://www.wjmg.com/submit/>

World J Med Genet 2017 February 27; 7(1): 1-9

DOI: 10.5686/wjmg.v7.i1.1

ISSN 2226-3134 (online)

ISSN 1920-8642

## New era of cystic fibrosis: Full mutational analysis and personalized therapy

Marco Lucarelli

Marco Lucarelli, Department of Cellular Biotechnology and Hematology, Sapienza University of Rome, Laboratory affiliated to Istituto Pasteur Italia - Fondazione Cenci Bolognietti, 00161 Rome, Italy

**Author contributions:** Lucarelli M conceived the editorial, revised the literature and wrote the paper.

**Conflict-of-interest statement:** Marco Lucarelli declares no conflict of interest related to the editorial.

**OPEN-ACCESS:** This article is an open-access article which was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non-Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, access, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

**Manuscript source:** Invited manuscript

**Correspondence to:** Marco Lucarelli, Associate Professor, BS Specialist in Clinical Pathology, Department of Cellular Biotechnology and Hematology, Sapienza University of Rome, Laboratory affiliated to Istituto Pasteur Italia - Fondazione Cenci Bolognietti, Viale Regina Elena 304, 00161 Rome, Italy. [marco.lucarelli@uniroma1.it](mailto:marco.lucarelli@uniroma1.it)  
Telephone: +390649970458  
Fax: +390649970458

Received: October 6, 2016  
Peer-review started: October 7, 2016  
First decision: November 31, 2016  
Revised: January 26, 2017  
Accepted: February 20, 2017  
Article in press: February 21, 2017  
Published online: February 27, 2017

### Abstract

Despite its apparently simple genetics, cystic fibrosis

(CF) is a rather complex genetic disease. A lot of variability in the steps of the path from the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (*CFTR*) gene to the clinical manifestations originates as uncertain genotype - phenotype relationship. A major determinant of this uncertainty is the incomplete knowledge of the *CFTR* mutated genotypes, due to the high number of *CFTR* mutations and to the higher number of their combinations in trans and in cis. Also the very limited knowledge of functional effects of *CFTR* mutated alleles severely impairs our diagnostic and prognostic ability. The final phenotypic modulation exerted by *CFTR* modifier genes and interactions further complicates the framework. The next generation sequencing approach is a rapid, low-cost and high-throughput tool that allows a near complete structural characterization of *CFTR* mutated genotypes, as well as of genotypes of several other genes cooperating to the final CF clinical manifestations. This powerful method perfectly complements the new personalized therapeutic approach for CF. Drugs active on specific *CFTR* mutational classes are already available for CF patients or are in phase 3 trials. A complete genetic characterization has been becoming crucial for a correct personalized therapy. However, the need of a functional classification of each *CFTR* mutation potency arises. Future big efforts towards an ever more detailed knowledge of both structural and functional *CFTR* defects, coupled to parallel personalized therapeutic interventions decisive for CF cure can be foreseen.

**Key words:** Genotype - phenotype relationship; *CFTR*; Cystic fibrosis; Next generation sequencing; Functional meaning of mutations; Personalized therapy; Mutation search; Mutation functional classes

© The Author(s) 2017. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Care tip:** Cystic fibrosis (CF) is the most common severe monogenic disease of Caucasian population. Despite its apparently simple genetics, it has a complex genotype



WJMG | [www.wjmg.com](http://www.wjmg.com)

1

February 27, 2017 | Volume 7 | Issue 1 |

Test genetici di nuova generazione



Maggiore conoscenza dell'effetto delle mutazioni



Più numerose e efficaci terapie personalizzate

## NGS evoluto: la terza generazione di sequenziamento: su singola cellula o su singolo DNA/RNA

Per favorire la comprensione dell'eterogeneità trascrizionale che guida i complessi sistemi biologici, le aziende biotecnologiche hanno sviluppato metodi massivi ad elevata processività per generare migliaia di librerie NGS **di singole cellule**. La soluzione è un complesso strumento che usa un sistema di isolamento di singole cellule in base a flusso micronizzato di goccioline, combinati con tecnologie NGS per il sequenziamento dei vari singoli DNA.

Questa soluzione permette di svelare nuovi tipi di informazioni su singole cellule semplificando l'analisi di più campioni in parallelo. Ma soprattutto consente l'interrogazione altamente sensibile e riproducibile di trascrittomi di singole cellule da centinaia a decine di migliaia di singole cellule in un solo esperimento e nell'arco di pochi giorni.



## NGS evoluto: la terza generazione di sequenziamento: su singola cellula o su singolo DNA/RNA

**PRIMA FASE.** L'isolatore incapsula e separa le singole cellule in goccioline di dimensioni inferiori al nanolitro su una cartuccia monouso. Ciascuna cartuccia può contenere più campioni e più cartucce possono essere elaborate in parallelo, per permettere l'isolamento da centinaia a decine di migliaia di cellule al giorno.

**SECONDA FASE.** La lisi cellulare e la marcatura delle cellule si verificano all'interno delle singole goccioline.

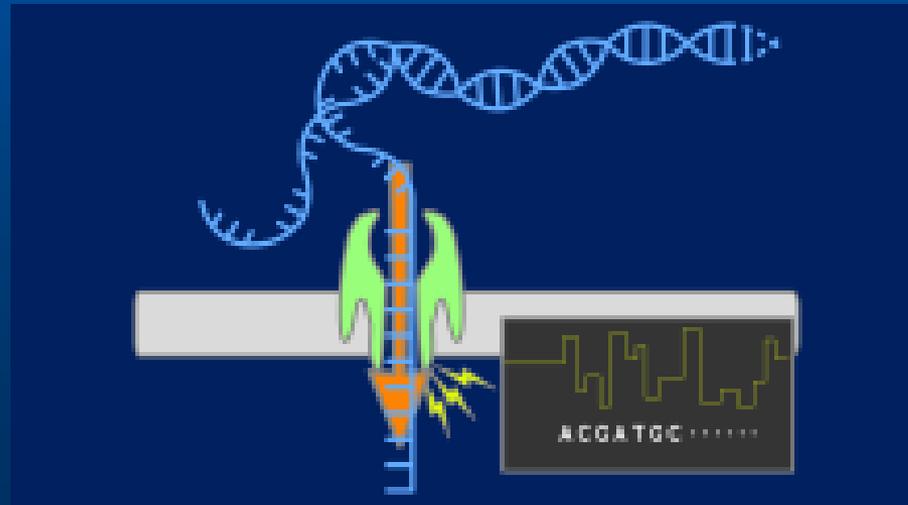
**TERZA FASE.** L'acido nucleico viene avviato al sequenziatore integrato NGS e si ottiene quindi una panoramica approfondita, «single cell-based», del genoma o del trascrittoma.



## NGS evoluto: la quarta generazione di sequenziamento: su singolo DNA mediante NANOPORI

Questa tecnologia deriva da un'osservazione emersa già negli anni '80 del secolo scorso: 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.



STUDI DEL NOSTRO LABORATORIO IN  
CORSO DI PUBBLICAZIONE CON TECNICHE  
NGS APPLICATE ALLA MODULAZIONE  
EPIGENETICA OPERATA DAL  
FITOCHIMICO INDICAXANTINA SU  
CELLULE TUMORALI DI COLON UMANO

# Genetica ed epigenetica nutrizionale



**Nutrigenetica:** valuta come il corredo genico individuale possa influenzare la risposta ai nutrienti, il metabolismo e l'utilizzazione dei nutrienti.

**Nutrigenomica:** scienza che studia i meccanismi di azione di molecole presenti nella dieta che interagiscono con il genoma e che influenzano l'espressione genica.

## I Fitochimici

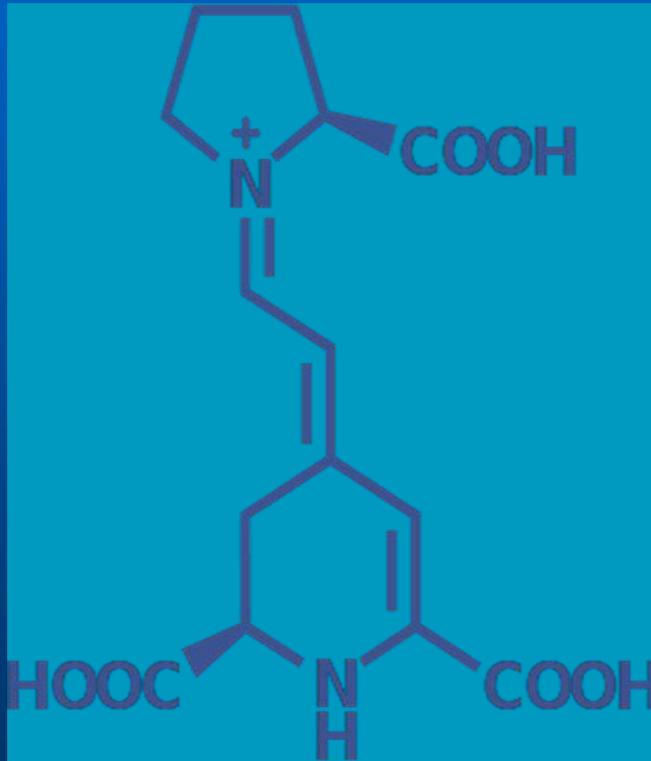
Sono sostanze biologicamente attive presenti negli alimenti di origine vegetale e hanno un'azione protettiva sulla salute umana se assunte a livelli significativi.

FUNZIONI  
BIOLOGICHE

- Attività antiossidante
- Modulazione degli enzimi detossificanti
- Stimolazione del sistema immunitario
- Induzione dell'apoptosi
- Riduzione della proliferazione cellulare

BIOLOGICHE  
FUNZIONI

Nell'estratto di fico d'india arancione *Opuntia ficus indica* è contenuta una grande quantità del fitochimico indicaxantina.



**INDICAXANTINA**

• Antiossidante

• Antinfiammatorio

• Antiproliferativo

• Pro-apoptotico

• Modulatore epigenetico della metilazione del DNA

# In sintesi abbiamo dimostrato che:



- ❖ L'Indicaxantina è in grado di far cambiare la metilazione del DNA di interi genomi



- ❖ L'Indicaxantina è in grado di "accendere" geni oncosoppressori spenti in cellule tumorali attraverso la demetilazione dei loro promotori



- ❖ L'Indicaxantina è un modulatore della metilazione del DNA attraverso l'interazione con le DNMT

Biochemical and Biophysical Research Communications 450 (2014) 652–658

Contents lists available at ScienceDirect

 Biochemical and Biophysical Research Communications  
journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ybbr](http://www.elsevier.com/locate/ybbr)



Anti-proliferative and pro-apoptotic activity of whole extract and isolated indicaxanthin from *Opuntia ficus-indica* associated with re-activation of the onco-suppressor p16<sup>INK4a</sup> gene in human colorectal carcinoma (Caco-2) cells

Flores Naselli<sup>a</sup>, Luisa Tesoriere, Fabio Caradonna, Daniele Bellavia, Alessandro Attanzio, Carla Gentile, Maria A. Livrea<sup>\*</sup>

Dipartimento STEBICEF, Università di Palermo, Palermo, Italy



Journal of  
**Nutrigenetics**  
and  
**Nutrigenomics**

J Nutrigenet Nutrigenomics 2015;8:114–127  
DOI: 10.1159/000439882  
Received: May 21, 2015  
Accepted: August 10, 2015  
Published online: October 7, 2015

© 2015 S. Karger AG, Basel  
1661-5499/15/0083-0114\$39.50/0  
[www.karger.com/jnn](http://www.karger.com/jnn)

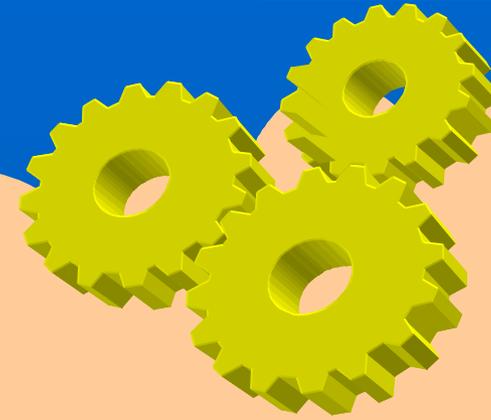
Original Paper

**Phytochemical Indicaxanthin Inhibits Colon Cancer Cell Growth and Affects the DNA Methylation Status by Influencing Epigenetically Modifying Enzyme Expression and Activity**

Flores Naselli<sup>a</sup>, Nigel Junior Belshaw<sup>b</sup>, Carla Gentile<sup>a</sup>, Marco Tutone<sup>a</sup>, Luisa Tesoriere<sup>a</sup>, Maria Antonietta Livrea<sup>a</sup>, Fabio Caradonna<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche Chimiche e Farmaceutiche (STEBICEF), Università di Palermo, Palermo, Italy; <sup>b</sup>Institute of Food Research, Norwich, UK

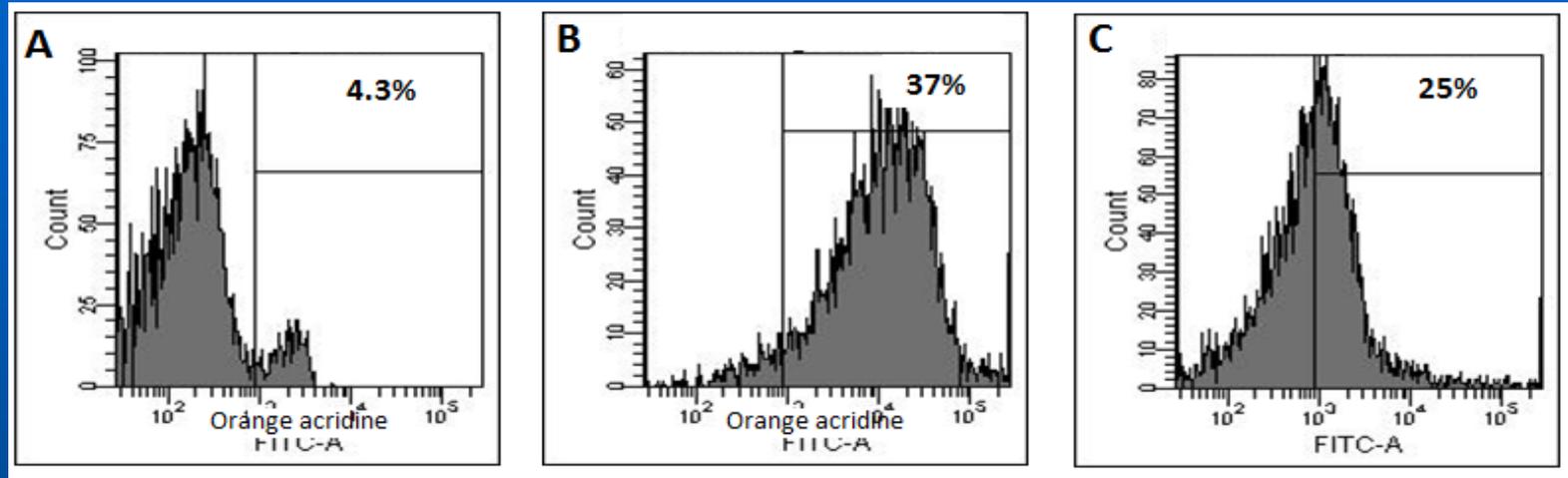




**QUALI CAMBIAMENTI  
«OMICI» CON  
INDICAXANTINA SU  
CELLULE TUMORALI?**



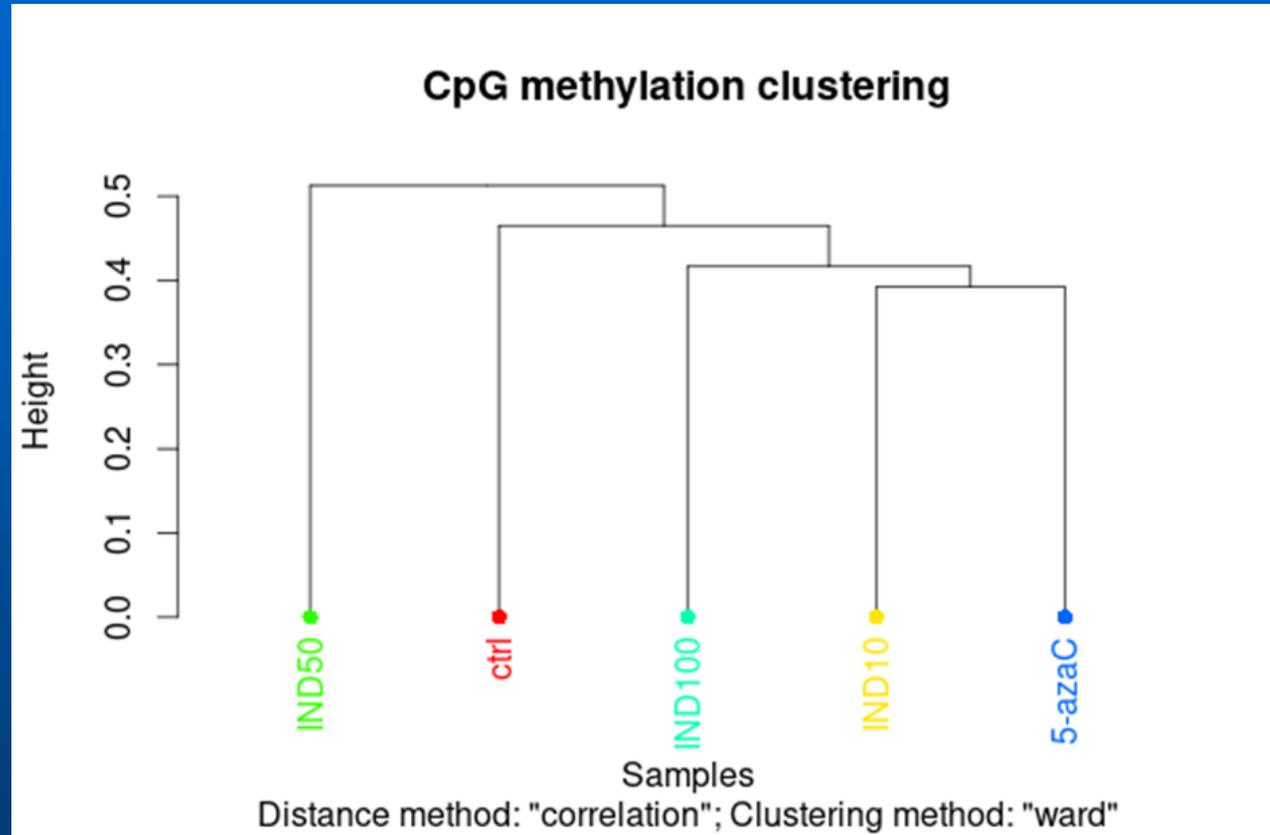
## ASSUNTO INIZIALE: Indicaxantina induce autofagia a cellule tumorali Caco-2



Ma l'autofagia è un fenomeno complesso, interessante ai fini di comprendere la tumorigenesi ed il mantenimento di un tumore. Un approccio «single gene» per quanto da noi effettuato sul gene BECN1 non bastava. Occorreva un approccio OMICO sull'intero genoma o meglio sull'intero EPIGENOMA (metilazione del DNA) indotta da Indicaxantina

Abbiamo quindi progettato, condotto con servizio esterno e interpretato una indagine metilomica (sequenza massiva di DNA convertito con bisolfito di sodio), con tecniche NGS, volta a conoscere come Indicaxantina modula la metilazione di tutti i geni del genoma, in cellule umane Caco-2 inducendo autofagia.

# STUDI DI CLUSTERING METILOMICO



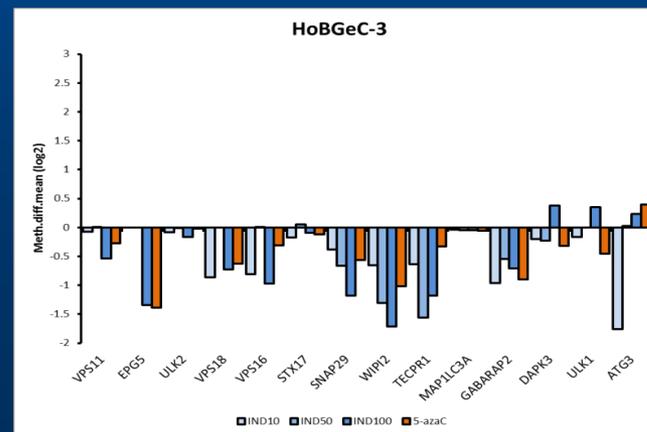
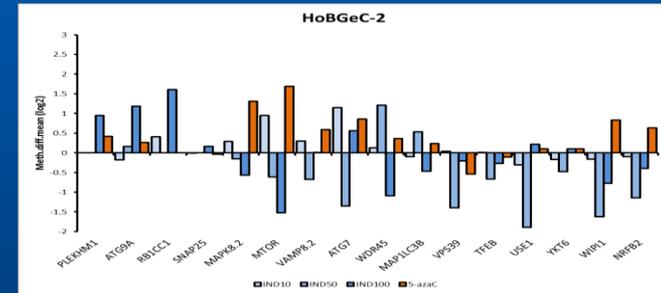
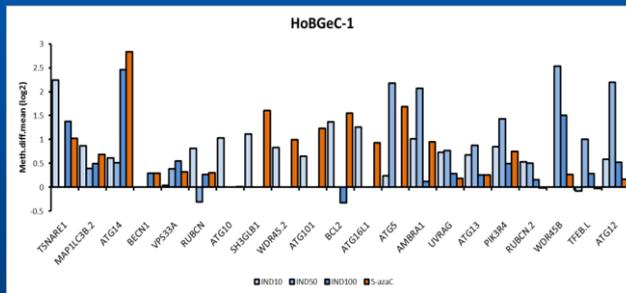
IND, a livello genomico, ha un effetto fondamentalmente metilante le isole CpG secondo un andamento «a campana» **con massimo effetto alla dose 50**, proposta come dose soglia.

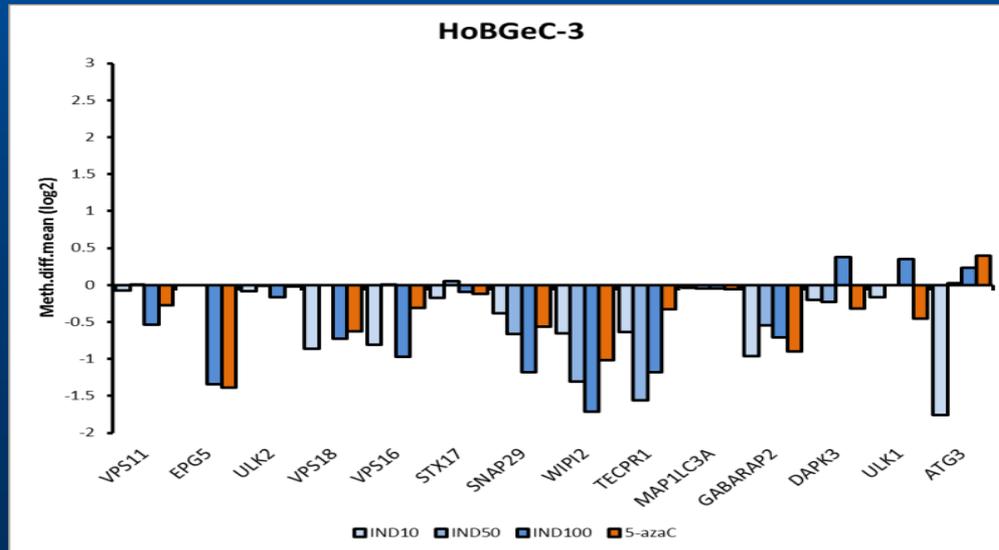
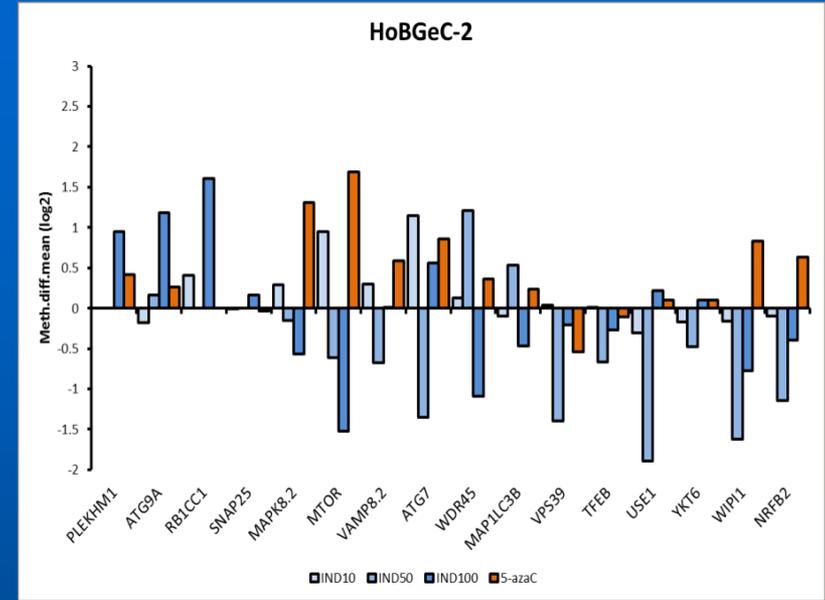
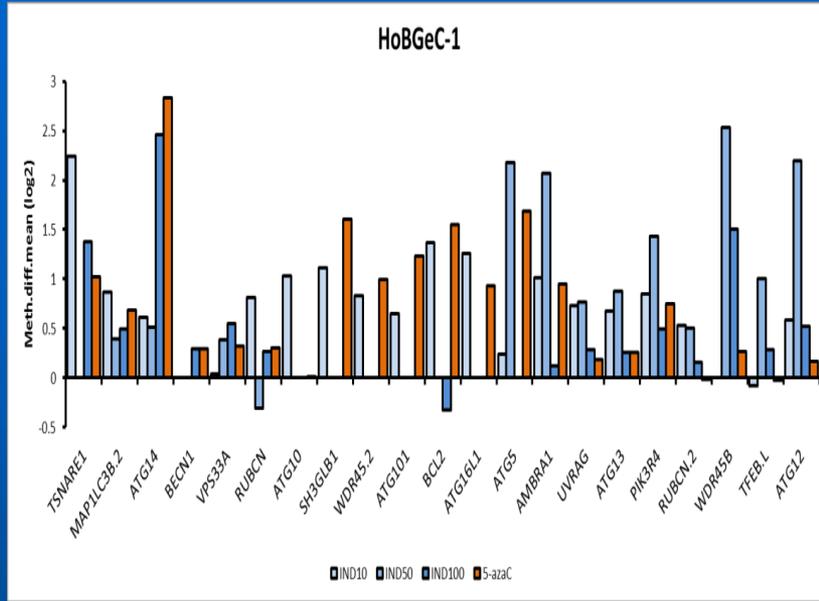
# STUDI METILOMICO A LIVELLO GENICO

Abbiamo indagato una serie di geni «cambiati» nella loro metilazione del promotore da Indicaxantina.

Abbiamo riscontrato che Indicaxantina promuove cambiamenti sensibili della metilazione (e quindi dell'espressione) di un grosso subset di geni (chiamati da noi HoBGeC-1, 2 e 3).

In particolare essa induce la metilazione di geni HoBGeC-1 e la demetilazione di geni (HoBGeC-3) e ciò indica che IND ha più peso nel sostenere l'autofagia piuttosto che promuoverla sin dalle sue fasi iniziali.





## MANOSCRITTO IN PREPARAZIONE

Questo studio, peraltro senza analoghi precedenti in letteratura, sarà utile per definire le proprietà nutrigenomiche del fitochimico Indicaxantina e, **poiché l'autofagia è considerata una valida alternativa di morte cellulare in cellule tumorali in cui l'apoptosi è inibita**, esso potrebbe anche fornire dati sull'utilizzo futuro di questa molecola come "epi-compound" in campo oncologico.

## CONCLUSIONI

I risultati ottenuti dal sequenziamento massivo con tecniche NGS del genoma umano hanno evidenziato un concetto fondamentale: non si può pensare che la sola sequenza nucleotidica possa essere sufficiente a spiegare le funzioni biologiche dell'organismo e le differenze tra organismi di complessità diversa. **Ciò che genera la diversità tra gli organismi sono i meccanismi post-trascrizionali e post-traduzionali.**

La presa di coscienza di questa nuova visione del patrimonio genetico idealmente chiude quindi quella che venne definita l'era genomica per lasciare spazio all'era **post- genomica**, maggiormente indirizzata allo del trascrittoma, ovvero la porzione di DNA che viene realmente trascritta e diventa RNA funzionale e del proteoma cioè la parte di RNA che viene tradotta in proteine.

Quando fu lanciato il progetto per sequenziare il genoma umano, si conoscevano meno di 100 geni legati alle malattie; **attualmente sono stati definiti più di 2850 geni relativi a malattie di tipo mendeliano.**

Avere la possibilità di leggere un intero genoma **diventa sempre più fondamentale anche per la pratica clinica**: per identificare le cause genetiche di malattie rare particolarmente difficili da diagnosticare, molti medici iniziano a scegliere la strada del sequenziamento genomico massivo NGS per la diagnosi molecolare.

## L'immaginario collettivo.....

### PRINCIPALI RECENSIONI

*Lo si può definire il manifesto dell'«Icaro tecnologico».*

*Si parla di una società "Biopunk " di un mondo di umani che viene emarginato dalla società solo per il fatto di non aver beneficiato dei miglioramenti offerti dalla manipolazione genetica.*

*Ma emerge un carattere battagliero che non accetta di essere fagocitato dalla tecnologia e che si aggrappa ad un valore non manipolabile " la capacità di sognare", «la capacità di ribaltare il proprio destino.*

*E' quello che ha fatto l'uomo fino ad ora: artefice di sfacelo e contemporaneamente seme di speranza per un futuro migliore.*

**Come bilanciare queste 2 forze?**



# Grazie a colleghe, colleghi, collaboratrici e collaboratori



- Flores Naselli
- Maurizio Mauro
- Ilenia Cruciata
- Chiara La Rosa
- Carla Gentile
- Antonino Lauria
- Tiziana Ferrara
- Nigel Belshaw

*Grazie a tutti voi*

**«...Vincent ha un destino già scritto nella mappa genetica ma non lo accetta e, esattamente come un genetista in laboratorio, riscrive il suo futuro mostrando la sua validità ad una società che voleva relegarlo ai margini.»**

**Dal Film «GATTACA» di Andrew Niccol, 1997**

