



AZIENDA OSPEDALIERA
OSPEDALE INFANTILE
REGINA MARGHERITA
S. ANNA DI TORINO
DOVE NASCE IL FUTURO

Servizio Sanitario Nazionale – Regione Piemonte

**AZIENDA OSPEDALIERA
OSPEDALE INFANTILE REGINA MARGHERITA
S. ANNA DI TORINO**

10126 Torino – Corso Spezia 60 – tel. 011313.4444

www.oirmsantanna.piemonte.it

cod. fisc. e partita IVA 06815430019

DIPARTIMENTO DI DIAGNOSTICA E DEI SERVIZI

S.S. Diagnostica e Consulenza Genetica : Dr. G. Restagno

Citogenetica: tel. 0113134532 – Genetica Molecolare : tel. 0113135580 – 5282

Fax 011.313 5582 - e-mail: gabriella.restagno@oirmsantanna.piemonte.it

Progetto “NGS Core Facility”

Background

L'identificazione di varianti presenti in diverse regioni del nostro genoma è essenziale per una comprensione della etiopatogenesi di numerose malattie complesse umane.

Le caratteristiche della Next Generation Sequencing (NGS) permettono già oggi ai ricercatori di sequenziare regioni genomiche di interesse in maniera rapida e precisa. Senza dubbio, la Next Generation Sequencing rappresenta un nuovo approccio analitico destinato a trovare nei prossimi anni applicazioni in praticamente numerosi ambiti della moderna medicina di laboratorio come la diagnostica delle malattie neurodegenerative quali la Sclerosi Laterale Amiotrofica.

La tecnologia NGS è un tipico sistema di sequenziamento “high-throughput” in quanto è in grado di generare contemporaneamente ed in breve tempo milioni di sequenze geniche. L'approccio tipico prevede quattro fasi: 1) il DNA genomico a doppia elica è prima frammentato in milioni di piccoli segmenti (della lunghezza di circa 150 bp); 2) le estremità di questi frammenti sono “riparate” in modo da generare estremità piatte (blunt ends); 3) alle estremità 5' e 3' di ciascun frammento vengono aggiunti (ligati) adattatori; 4) i frammenti con coniugati gli adattatori sono amplificati simultaneamente per la generazione della “library finale”: in questa fase è possibile incorporare nelle libraries dei codici a barre (barcode) che vengono utilizzati nel sequenziamento multiplex (vedi oltre), processo che consente di sequenziare parallelamente in una singola run più campioni (Fig. 1).

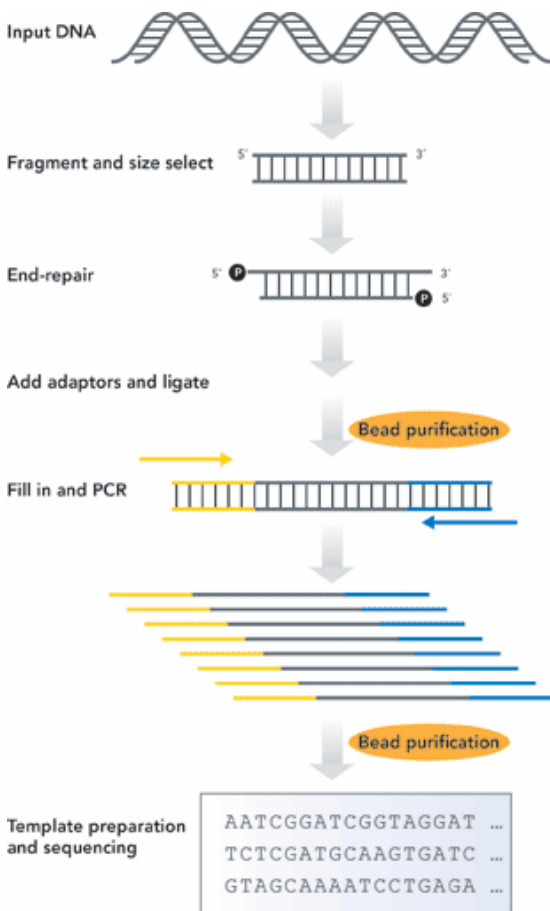


Fig.1: workflow per la generazione di libraries

Le sequenze generate, chiamate “reads”, possono essere a questo punto riassemblate usando un genoma umano di riferimento (“targeted resequencing”) o anche in assenza di un genoma di riferimento (“*de novo* sequencing”). L'intero set di reads, sovrapposte in un processo noto come “alignment”, rivela l'intera sequenza di ciascun cromosoma del campione di DNA genomico.

L'attuale tecnologia consente di analizzare contemporaneamente e in una singola reazione più campioni, con una ottimizzazione dei costi e dei tempi di esecuzione, grazie all'approccio multiplex. A tal fine, a ciascun campione viene assegnato un barcode individuale, che permette la successiva e univoca identificazione del campione.

Rispetto al sequenziamento tradizionale, secondo il metodo di Sanger attualmente utilizzato (elettroforesi capillare) che permette l'analisi di più sequenze in più settimane o addirittura mesi, grazie a questo nuovo approccio di NGS, un numero di gran lunga più elevato di sequenze può essere ora sequenziato in poche ore e analizzato completamente nell'arco della stessa giornata.

Si prevede che i costi delle analisi su ogni singolo paziente con questa tecnologia saranno considerevolmente abbattuti nel corso dei prossimi anni con un conseguente risparmio dei costi di gestione e di mantenimento rispetto ai tradizionali metodi di sequenziamento.

Il sistema NGS permette il sequenziamento di un intero genoma *de novo*, il risequenziamento di tratti genomici già noti o, ancora, lo studio dell'intero trascrittoma in

diverse condizioni sperimentali o patologiche *in vivo*, come ad esempio negli studi di farmaco-genomica/farmaco-trascrittomica.

Ion Torrent (Life Technologies)

Questo strumento si basa su nuove tecnologie che permettono l'analisi di regioni genomiche di interesse nell'arco di una sola giornata (Fig. 2).



Figura 2: Piattaforma tecnologica Ion Torrent

In particolare Ion Torrent sfrutta la tecnologia dei semiconduttori, coniugandola con un meccanismo di sequenziamento basato su processi biochimici già noti. Infatti, nei sistemi biologici, quando un singolo nucleotide è incorporato dall'enzima DNA polimerasi nella catena nascente di DNA a doppia elica, viene rilasciato uno ione idrogeno come sottoprodotto. La tecnologia dell'Ion Torrent è incentrata sull'impiego di un sofisticato array ad alta densità con micropozzetti all'interno dei quali questo processo di sintesi (e conseguente rilascio di ioni idrogeno) viene ripetuto ciclicamente (Fig. 3).



Fig. 3: Chip 316 per Ion Torrent

Ogni micropozzetto del chip racchiude una molecola di template nonché un sensore in grado di registrare anche minime variazioni del pH ambientale: quando uno ione idrogeno è rilasciato, il pH subirà una modificazione, rilevata dal pH-metro presente nel pozzetto. Di conseguenza l'informazione viene convertita da chimica a digitale. Il sistema consente l'aggiunta al chip di un nucleotide noto alla volta: se il nucleotide aggiunto al sistema non viene incorporato nella molecola di DNA neosintetizzata, in quanto non complementare al template contenuto nel micropozzetto, non verrà prodotta nessuna modifica del pH e di conseguenza nessuna modifica del voltaggio. Un ciclo del processo dura pochi secondi poiché non richiede una rilevazione ottica, come accade invece negli altri sistemi di Next Generation Sequencing.

Preventivo di Spesa

La piattaforma Ion Torrent prevede l'associazione al sequenziatore di uno strumento in grado di automatizzare completamente la preparazione del template prima dell'analisi (Ion One Touch System). Questa fase è molto critica e, pertanto, una sua standardizzazione sarebbe fondamentale per ottenere risultati omogenei e più facilmente interpretabili.

Il costo complessivo della piattaforma risulta essere, secondo un preventivo di spesa richiesto alla ditta Life Technologies Italia in data 5 Ottobre 2011, pari a Euro 95.837,00 + IVA .

Nuova “vision” del laboratorio e partnership

E' importante considerare questo nuovo settore del Laboratorio di Genetica Molecolare come una vera e propria “Core Facility” aperta ai pazienti esterni, in grado quindi di intercettare le nuove esigenze tecnologiche del mercato, dando così una risposta specialistica ed appropriata alle nuove domande di salute che sono emerse negli ultimi anni.

L'acquisizione di queste nuove tecnologie darebbe anche un notevole impulso alle ricerche biomediche già in corso da anni in collaborazione con il Laboratorio di Neurogenetica – National Institute of Aging del National Institutes of Health (NIH) di Bethesda (Responsabile: Dr. B. Traynor) riguardanti gli aspetti genetici della Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA), con il Centro SLA del Dipartimento di Neuroscienze dell'Università degli Studi di Torino (Responsabile: Prof. A. Chiò) e con il Consorzio ItalsGen.

Sarebbe un'occasione unica per il nostro territorio, che diventerebbe di riferimento nazionale per quanto concerne le indagini genetiche nell'ambito delle neuroscienze. A tal proposito si segnala che già attualmente si registrano richieste per l'esecuzione di questi test molecolari specialistici da parte di diversi centri SLA italiani, ma che attualmente non possono essere accolte a causa della mancanza di una struttura di diagnostica avanzata in questo campo.