



Tecnologie  
Diagnostiche  
Avanzate

---

Biotechnologie Avanzate

2022

# Programma Tecnologie diagnostiche avanzate parte diagnostica molecolare

Diagnostica molecolare,  
ruolo e finalità

I marcatori e le tecniche  
di diagnostica molecolare  
(PCR, SNPs, SAGE,  
MICROARRAY, Southern e  
western blot, ELISA, CGH,  
FISH)

Esami di laboratorio

Test genetici

Diagnostica molecolare  
nella microbiologia  
clinica

COVID-19

# Ruolo e finalità della diagnostica molecolare

**Diagnostica classica:** insieme di tecniche atte a determinare la natura e la sede di una malattia sulla base dello studio dei sintomi

**Diagnostica molecolare** quando le modifiche riguardano segnali molecolari ed alterazioni proteiche.

Tecniche molecolari impiegate come strumenti affidabili per l'identificazione, la ricerca e la caratterizzazione di:

- agenti patogeni
- marcatori tumorali
- mutazioni genetiche

# Diagnostica molecolare

- Diagnostica molecolare classica
- Diagnostica molecolare avanzata presintomatica e predittiva

# I marcatori

Molecole segnale di svariata natura biochimica la cui presenza nei fluidi extracellulari e/o in cellule e/o in tessuti indica l'alterazione funzionale e/o patologia d'organo o sistemica

**ESOGENI**

**ENDOGENI**

di funzione  
di lesione

# Requisiti di un marcatore molecolare ideale

- Essere presente in quantità ed in forma chimica stabile nel campione biologico per essere rilevabile
- Dosabile
- Adeguata sensibilità e specificità diagnostica da stabilire un cut-off idoneo
- Precocemente rilevabile per avere idonea finestra diagnostica
- Sensibile ai trattamenti così da essere monitorabile
- Significato predittivo
- Metodiche minimamente invasive per il suo monitoraggio

# Le indagini di laboratorio molecolare nella gestione del paziente

- Prevenire malattie genetiche e non
- Evitare diffusione di infezioni
- Evitare trasmissione di patologie ereditarie
- Ottimizzare terapie e dosaggi
- Evitare effetti collaterali e complicanze delle terapie farmacologiche

# Laboratorio diagnostico

Il laboratorio diagnostico è da considerarsi una realtà produttiva complessa in cui oltre alla fase di analisi si esigono quelle di campionamento, accettazione, refertazione e stoccaggio.

I controlli sono da effettuare non solo in fase analitica ma anche nella fase a monte (fase pre-analitica) ed a valle (fase post-analitica) e sono finalizzati a ridurre al minimo l'errore analitico.

# Laboratorio diagnostico caratteristiche

- Accreditation da parte di un ente riconosciuto che attesti formalmente la competenza dell'organismo a svolgere specifiche analisi tecniche, con procedure di controllo in fase pre- e post-analitica.
- Certificazione da parte di ente terzo volta ad assicurare che il prodotto/analisi sia conforme a norme ISO Vision 2000 per CEE

# Laboratorio di diagnostica molecolare

- Diagnosi rapida e sensibile
- Saggi molecolari standardizzati ed automatizzati
- Analisi multiplex
- Sensibilità e specificità
- Tempi di analisi ridotti
  
- Costi
- Personale qualificato

# Tecniche di diagnostica molecolare

Includono tecniche di 'biologia molecolare' (molecole purificate) e di 'morfologia molecolare'.

PCR, SNPs, SAGE, MICROARRAY, Southern e western blot, CGH, FISH  
Analisi di DNA, RNA o cromosomi per individuare alterazioni dovute ad una patologia genetica ereditabile o meno

# Test genetici

Test clinico ha lo scopo di offrire al paziente un inquadramento diagnostico utile alla prevenzione o al trattamento terapeutico;

Test diagnostici (genetici) , servono a confermare o escludere una malattia genetica nota o sospetta in un individuo sintomatico

Test predittivi (genetici), offerti a individui asintomatici in una famiglia con una storia di patologia genetica. Sono indicate se diagnosi precoce consente un intervento di riduzione della morbidity o della mortalità (BRCA1). Da valutare aspetto psicologico

- Presintomatico es. corea di Huntington
- Predisponenti es. mutazioni BRCA1

# Test genetici

Test di portatore, per identificare individui con mutazione genetica a trasmissione recessiva. Offerto ad individui con storia familiare o gruppi etnici con elevato grado di portatore allele patologico

# Test genetici

Test prenatali, effettuati in gravidanza per verificare lo stato di salute del feto. Si effettuano su prodotti dell'amniocentesi e dei villi coriali (CVS) tecniche più specifiche includono biopsia placentare, biopsia cutanea fetale o cordocentesi.

Prelievo tra 15ma e 18ma settimana di gestazione sotto controllo ecografico del liquido amniotico dove si trovano cellule fetali (da vie urinarie e respiratorie del feto) tale analisi si consiglia a gestanti superiori a 35 anni, precedenti casi di anomalie cromosomiche ed in seguito test sierologici delle gestanti anomalia.

# Diagnostica molecolare nella patologia neoplastica

malattia neoplastica è un insieme eterogeneo di malattie caratterizzate da meccanismi patogenici comuni (trasformazione, infiammazione, migrazione) dovuti a fattori genetici e ambientali.

Le alterazioni genetiche (iniziazione delle neoplasie) possono essere ereditarie o acquisite, cioè conseguenti all'azione cancerogena di sostanze chimiche, biologiche o fisiche.

# Diagnostica molecolare nella patologia neoplastica

## Fattori prognostici molecolare

- Contenuto di DNA
- Ploidia
- Alterazione oncogeni
- Attività della telomerasi
- Fattori di crescita
- Espressione di recettori per fattori di crescita

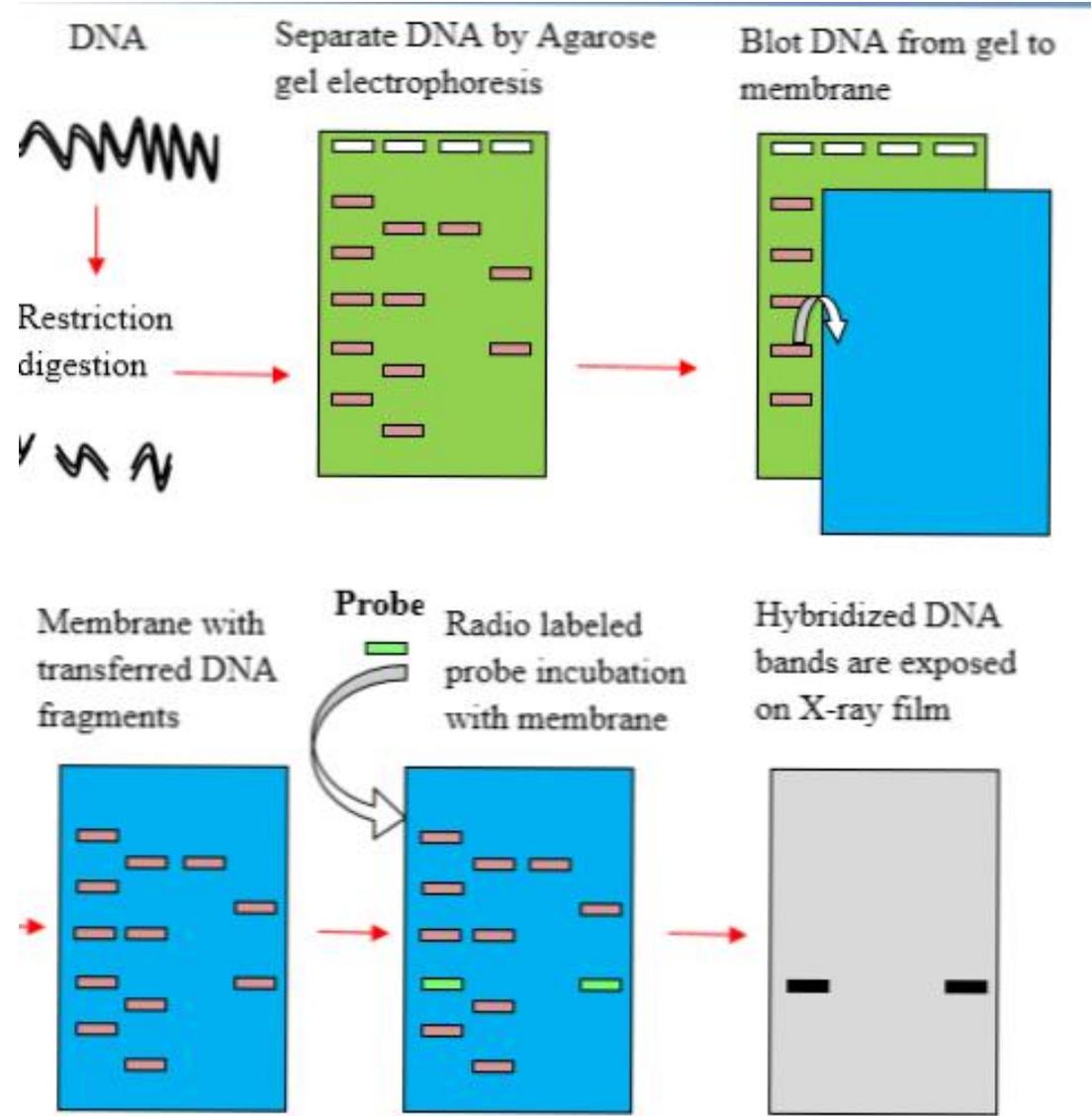
# Tecniche di diagnostica molecolare



# Le tecniche

- Southern Blot
- PCR
- FISH
- Immunodosaggi
- Western Blot
- CARIOTIPO
- CGH
- Sequenziamento

# Southern Blot

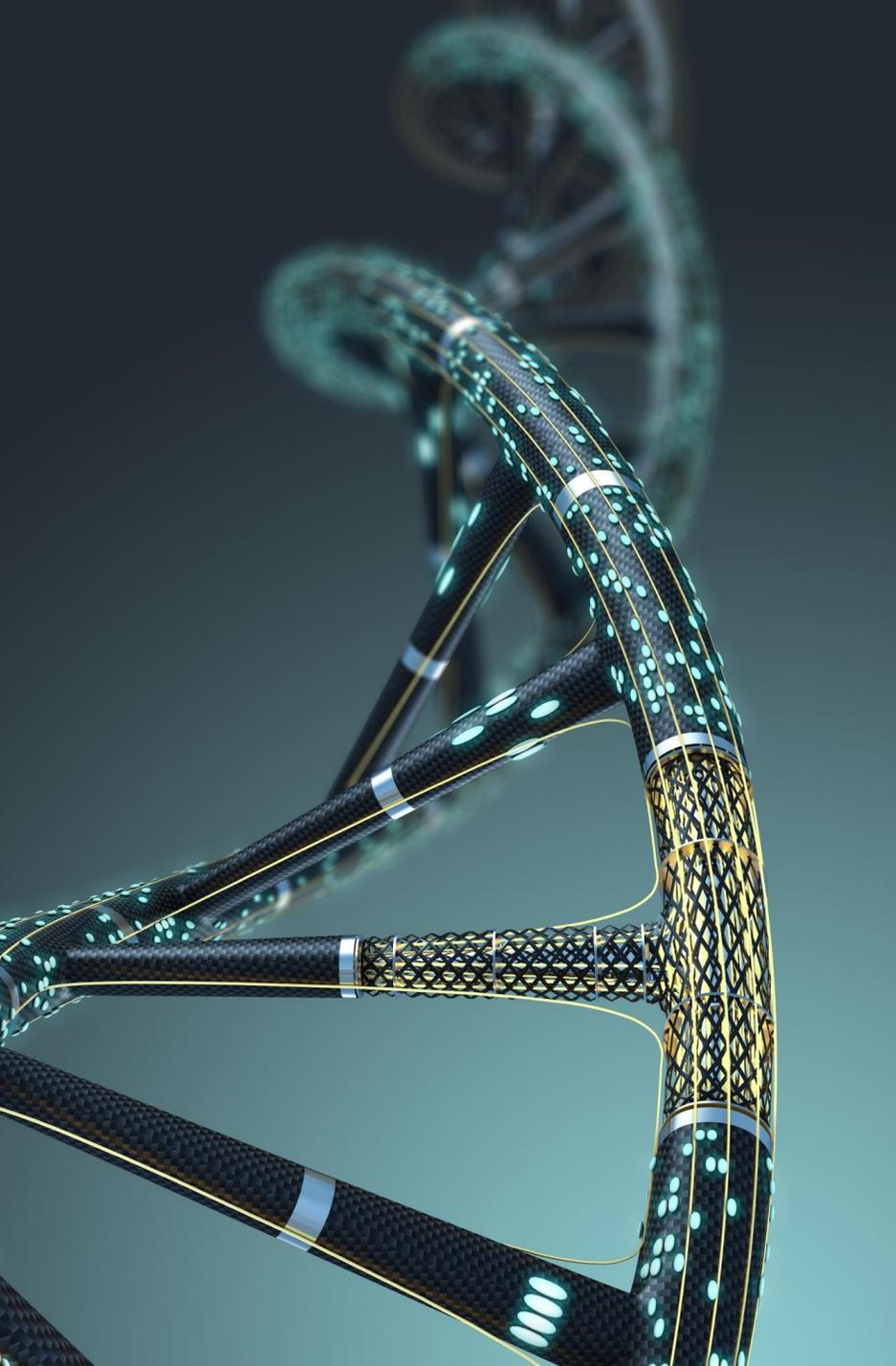


# Southern Blot

1. Estrazione e purificazione del DNA
2. Digestione del DNA con enzimi di restrizione
3. Separazione dei frammenti di DNA in elettroforesi di agarosio
4. Denaturazione del DNA
5. Trasferimento su membrana (blotting)
6. Ibridazione con una sonda «marcata» specifica per un gene d'interesse
7. Lavaggio della membrana per eliminare la sonda in eccesso

# Southern Blot

- Identificare presenza/assenza di frammenti genici specifici
- Studiare l'organizzazione di un gene



# Enzimi di restrizione

Sono endonucleasi di origine batterica che scindono la doppia elica di DNA in corrispondenza di siti specifici, ovvero sequenze nucleotidiche chiamate siti di restrizione, producendo frammenti di dimensioni caratteristiche.

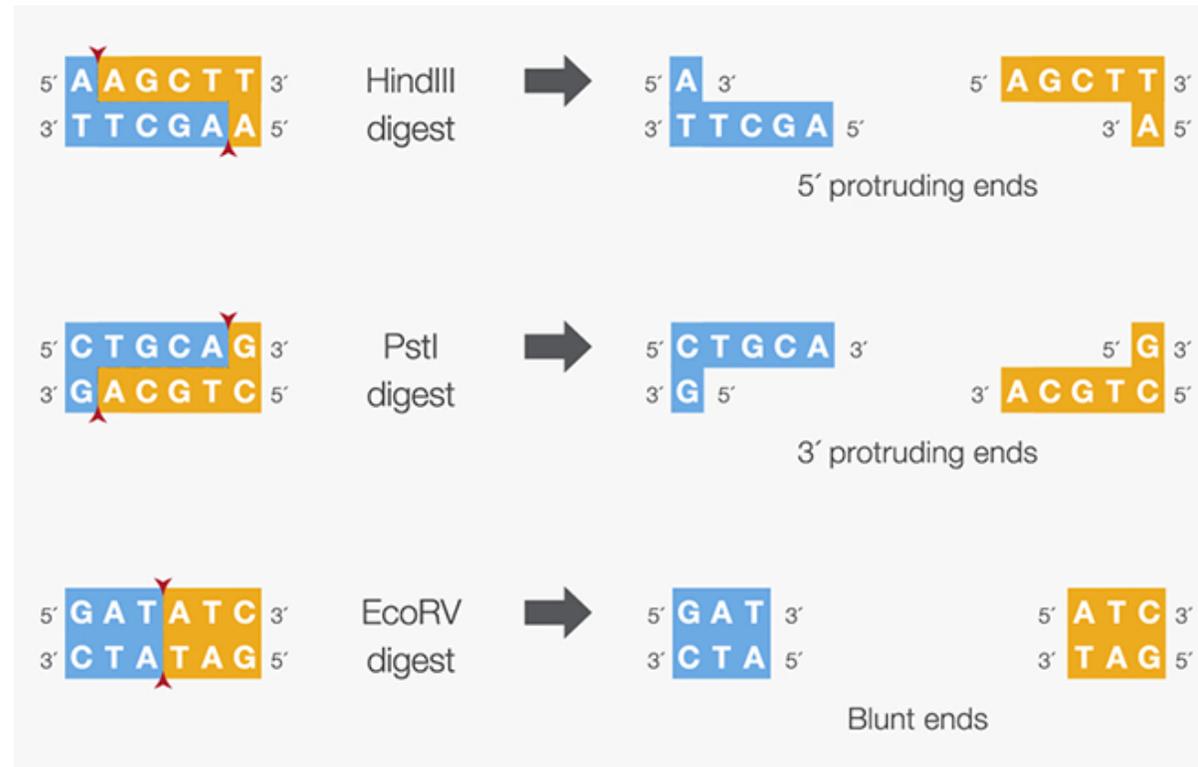
- sequenze nucleotidiche di riconoscimento specifiche → identificare il gene
- frammenti di dimensioni caratteristiche → analizzare il gene

# Southern Blot

## Enzimi di restrizione

I siti di restrizione sono generalmente **sequenze palindromiche di 4-6 basi**.

Alcuni enzimi di restrizione sono meno specifici e riconoscono sequenze con **una o più basi** del sito di restrizione sostituibili.



# Southern Blot elettroforesi

I frammenti di acidi nucleici prodotti dagli enzimi di restrizione possono essere separati mediante elettroforesi su gel di agarosio

- Analitica, mirata alla visualizzazione dei risultati
- Preparativa, dedicata alla purificazione delle molecole ottenute

La fase successiva consiste nel trasferimento del DNA su una membrana di nitrocellulosa o nylon e nella successiva ibridizzazione con una sonda marcata

# Applicazioni diagnostiche Southern Blot

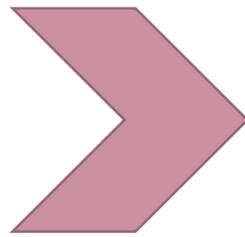
- Diagnosi di malattie con variabilità genetica, Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP)
- Identificazione di mutazioni puntiformi
- Riarrangiamenti dei geni nelle immunoglobuline e delle T-cell receptor nei linfomi
- Amplificazioni oncogeni in tumore es. N-myc in neuroblastoma
- Individuazione agenti patogeni nelle infezioni
- Mappatura del genoma
- Analisi filogenetiche

# Applicazioni diagnostiche Southern Blot

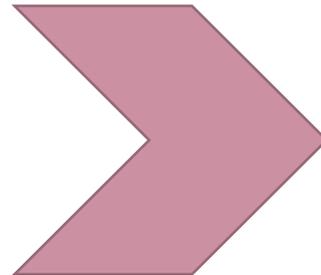
- Metodologia con tempi lunghi
- Bassa sensibilità, richiede grandi quantità di DNA da analizzare da cellule o tessuto fresco (5-10  $\mu\text{g}$ )

# Applicazioni diagnostiche Southern Blot

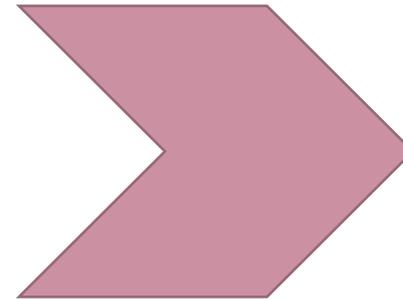
**In situ hybridization  
Southern Blot**



**Direct  
probes**



**PCR**



**Target  
Amplification**



# Polymerase Chain Reaction

Tecnica automatizzata che consente l'amplificazione di specifici frammenti di DNA a sequenza nota, compresi tra le estremità 5'-di due primers disegnati dall'operatore, attraverso la reiterazione di n cicli, ciascuno dei quali include uno step di:

- denaturazione,
- appaiamento
- estensione.

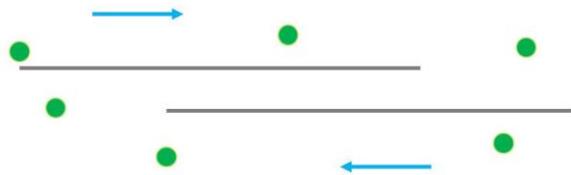
# Polymerase Chain Reaction

- DNA genomico o cDNA (RT-PCR)
- Polimerasi temostabile
- Primers
- Desossiribonucleotidi
- Sonda fluorescente o fluorofori intercalanti la doppia elica

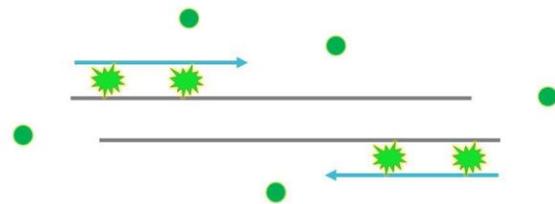
# PCR in diagnostica molecolare

## SYBR

Denature



Polymerization

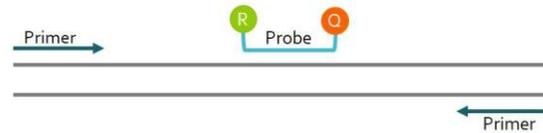


Signal detection (Polymerization completed)

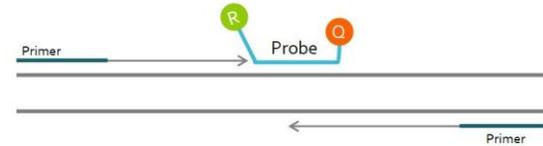


## TaqMan

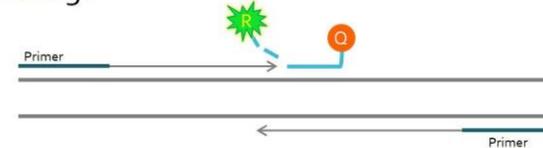
Annealing



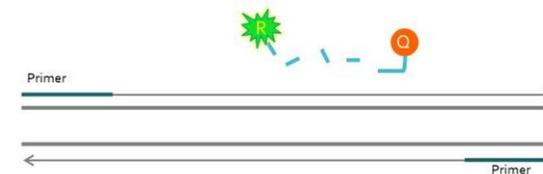
Polymerization & strand displacement



Cleavage



Signal detection (Polymerization completed)



# PCR in diagnostica molecolare

- Presenza/assenza sequenze di DNA microrganismi
- Traslocazioni cromosomiche
- Hotspot mutazionali
- Espressione genica (RT-PCR)
- Multiplex

# PCR Multiplex

- SNP genotyping
- Pathogen detection
- GMO (genetically modified organism) detection
- Forensic studies
- Food analysis
- Mutation and polymorphism analysis
- Gene deletion analysis
- Template quantitation
- Linkage analysis
- RNA detection

# PCR in situ

Consente di amplificare sequenze nucleotidiche all'interno di tessuti e cellule fissati, conservando informazione morfologica

E' un metodo molto sensibile per la diagnosi di virus (HPV) ed agenti infettivi, caratterizzazione di cellule cancerogene (carcinoma della mammella), mutazioni genetiche ereditarie, studi di espressione di geni specifici

# PCR in situ

## Preparazione campione

Vetrini

Proteinasi K

Dnase per RT-PCR

## In situ PCR

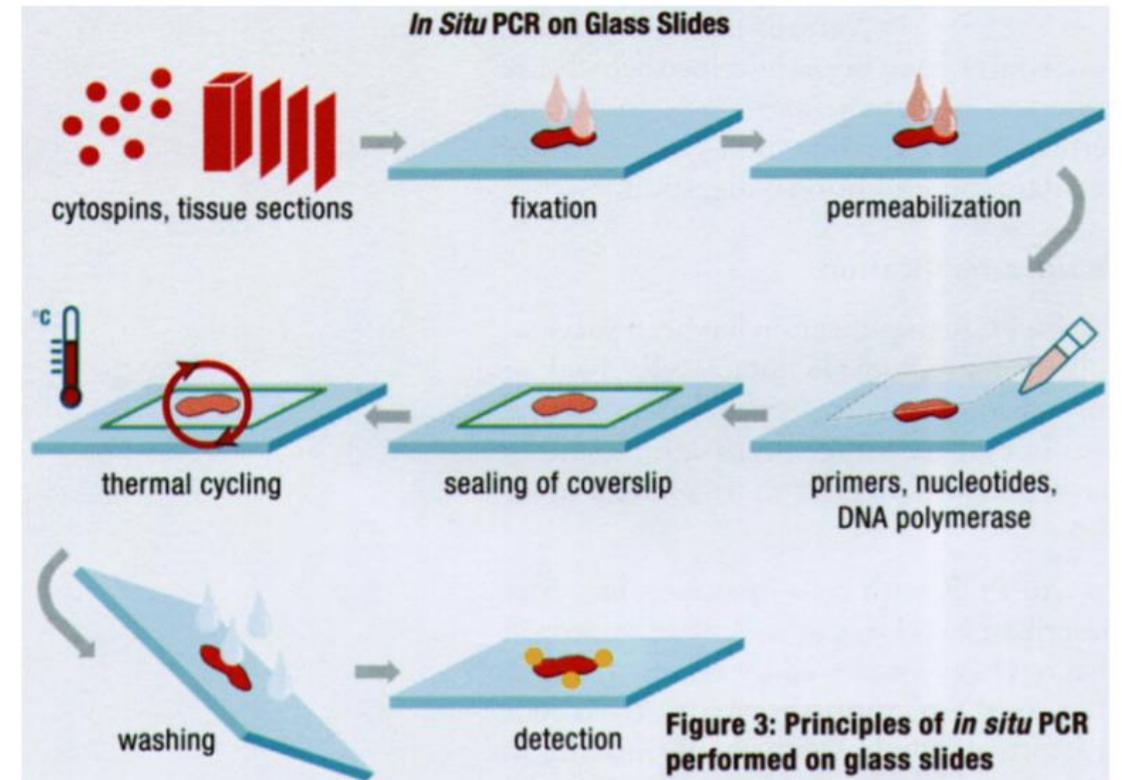
Primers

dNTP label (Gold, DIG) /sonde fluorescenti

## Rilevazione segnale

Anticorpi anti-dNTP marcati (gold o fosfatasi )

Tecniche rilevazione fluorescenza



# PCR in situ

## Targets

- DNA
- mRNA

## Campione

- congelato
- Fissato in paraffina

- Espressione citoplasmatica/nucleare
- % cellule infette
- % cellule espressione oncogeni durante terapia

Preservare  
Espressione sito-specifica acidi nucleici

Tempo  
digestione  
tessuti/cellule

# PCR in situ DNA virale

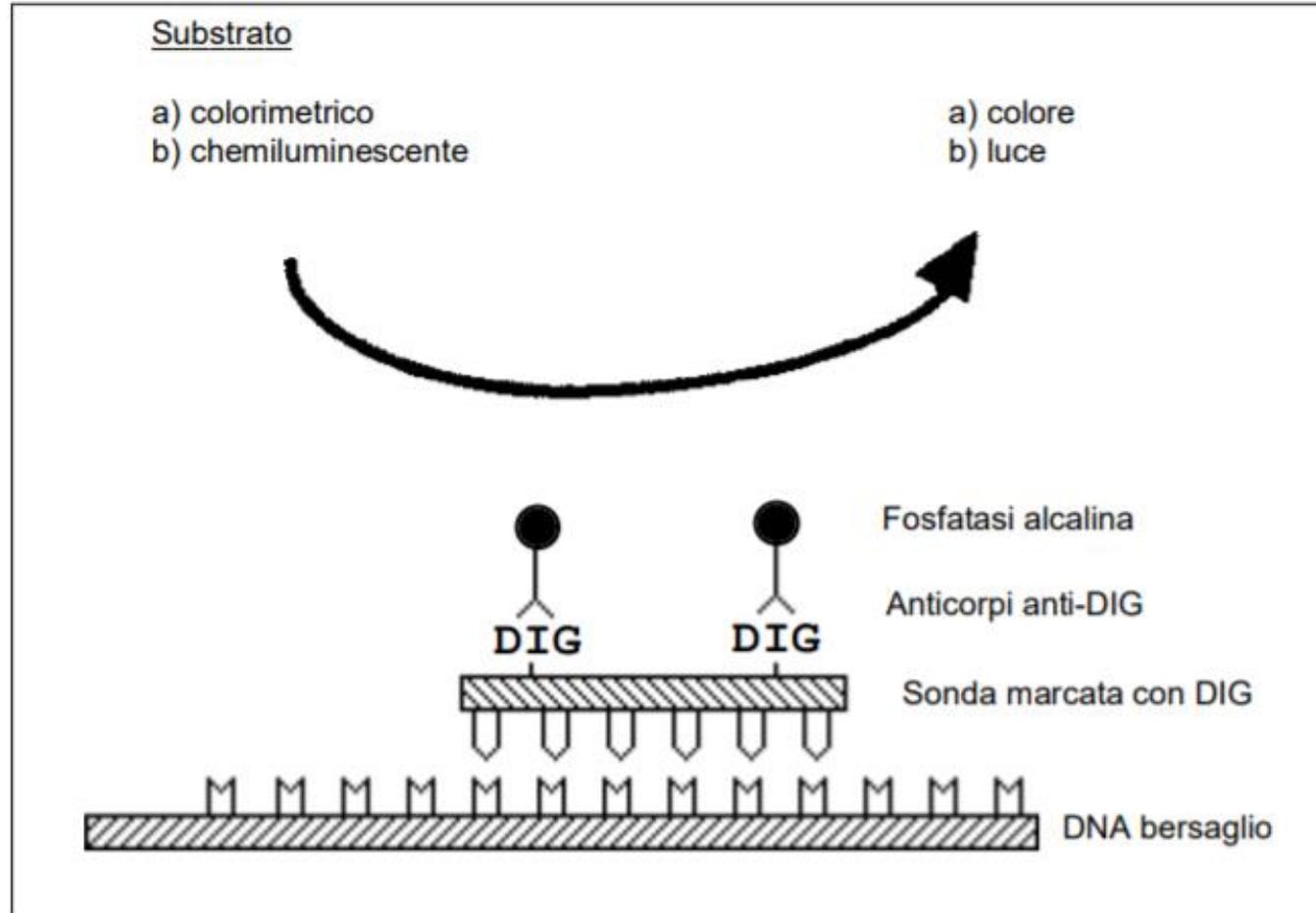
PCR in situ in cellule di spermatozoo infette da human herpesvirus type 8 (HHV8)

virioni in testa spermatozoo rilevati con sonde coniugate con perossidasi



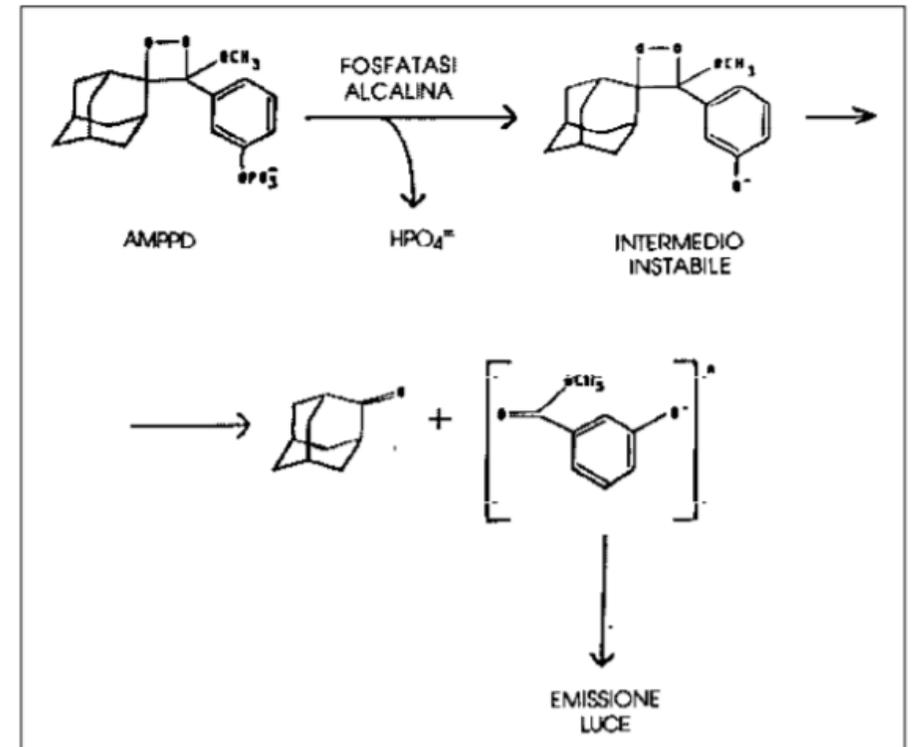
# Metodi rilevazione PCR in situ

**digossigenina**



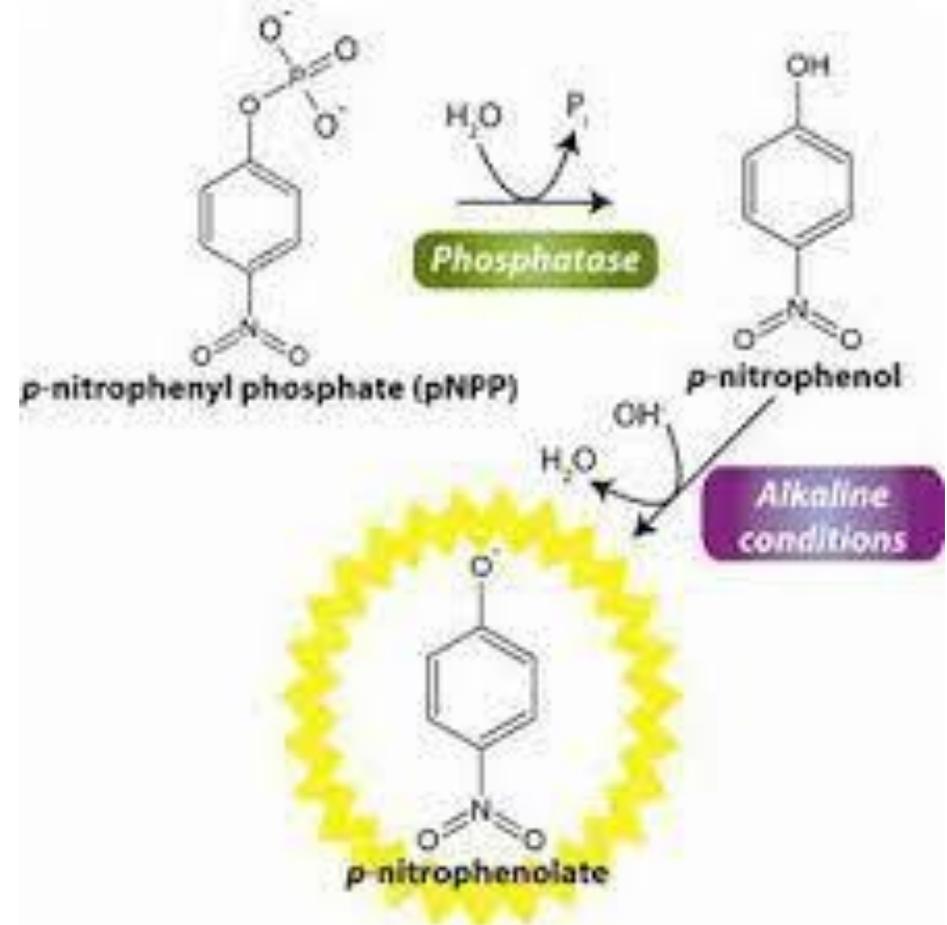
# Metodi rilevazione PCR in situ

Rilevazione grazie all'impiego di **substrati enzimatici chemiluminescenti** come sistemi di rivelazione di ibridi marcati (direttamente o indirettamente) con **fosfatasi alcalina** o **perossidasi**. Un esempio di tali sostanze è rappresentato dall'AMPPD (3-2'-spiroadamantano-4-metossi-4-3'-fosforilossi-fenil-1,2 diossietano), che viene defosforilato in presenza di fosfatasi alcalina dando origine ad un intermedio altamente instabile che si decompone con emissione di energia luminosa.



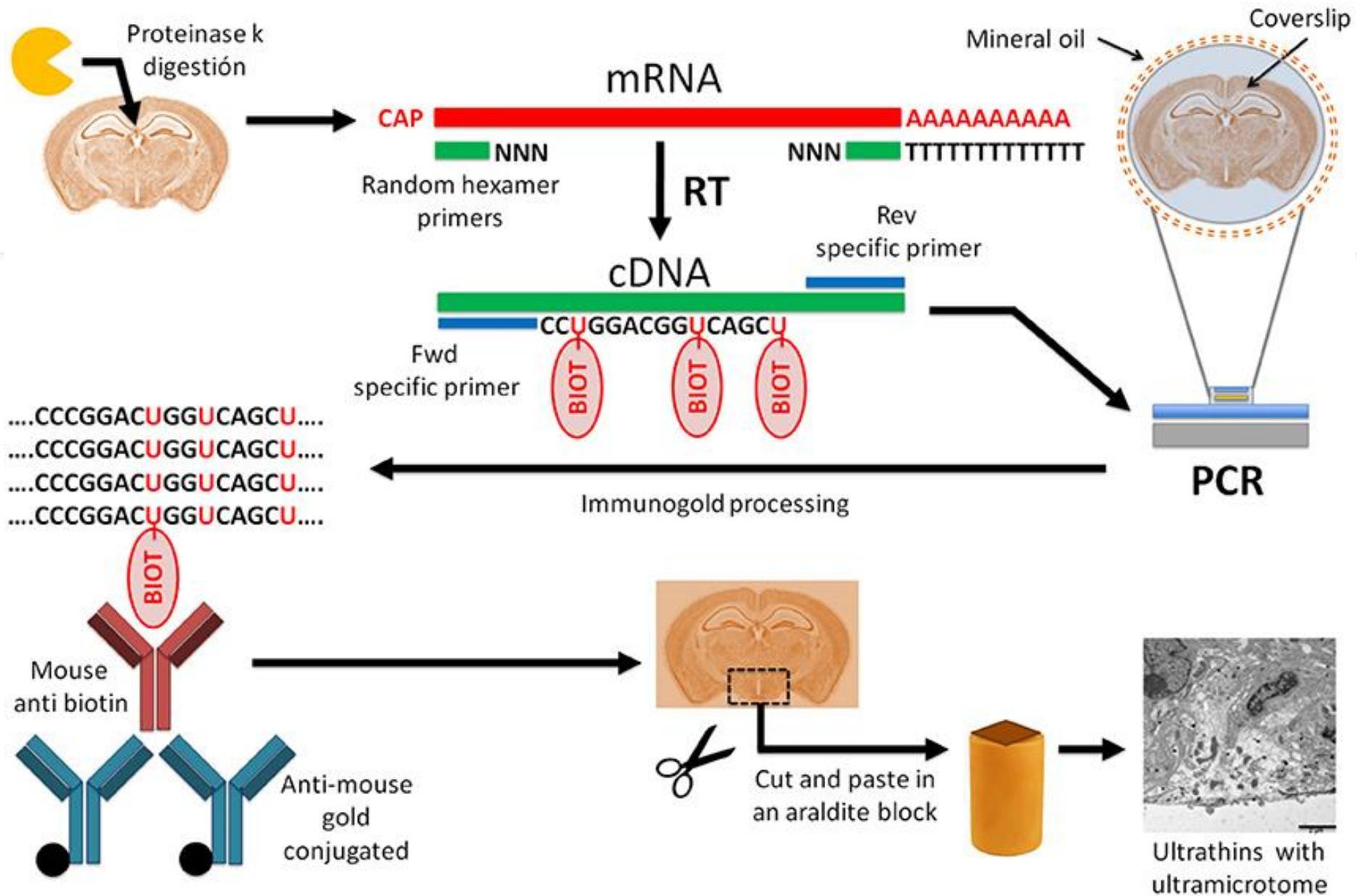
# Metodi rilevazione PCR in situ

Rilevazione grazie all'impiego di **substrati enzimatici colorimetrici** come sistemi di rivelazione di ibridi marcati (direttamente o indirettamente) con **fosfatasi alcalina o perossidasi**. **Nitrofenilfosfato** è substrato cromonigenico della fosfatasi alcalina viene idrolizzato a nitrofenolo che in ambiente acido assorbe a 405 nm



# PCR in situ

- Preparazione campione delicata e lunga
- Termociclatore specifico per alloggiamento e processazione dei vetrini
- Conserva informazione morfologica



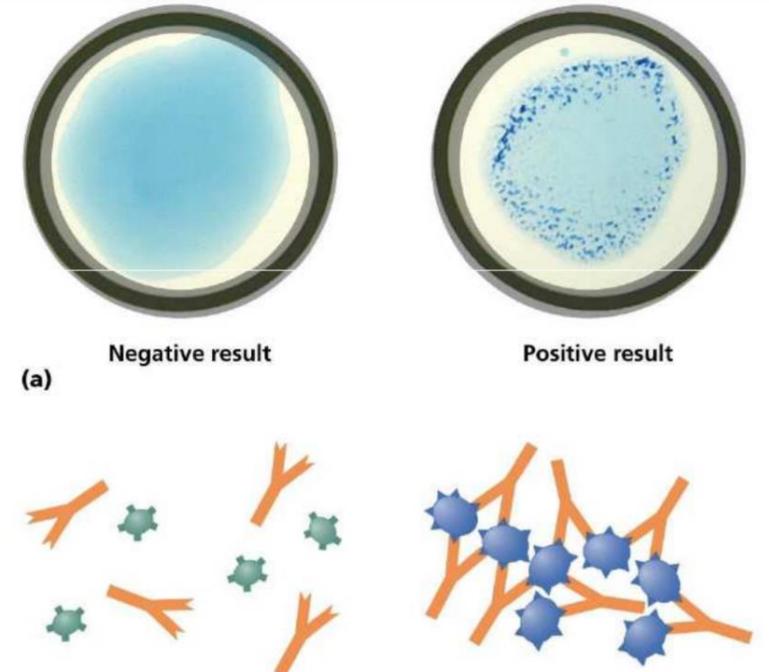
# IMMUNODOSAGGI

Tecnica immunochimiche consentono di effettuare un dosaggio immunologico ossia quantificare con precisione una sostanza antigenica, presente nei fluidi biologici

- Metodi marcati, rilevano l'immunocomplesso grazie all'impiego di traccianti enzimatici, colorimetrici o fluorescenti
- Metodi non marcati, rilevano l'immunocomplesso grazie all'agglutinazione in soluzione (**diretta** se antigene corpuscolato es. batteri o **indiretta** su carrier insolubili es. su sfere lattice per antigene solubile) o alla precipitazione su matrice solida

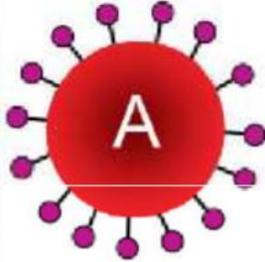
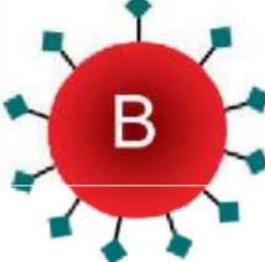
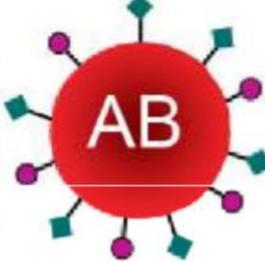
# Reazione agglutinazione/precipitazione

Si applicano condizioni sperimentali (es. pH, temperatura, forza ionica) che consentano l'agglutinazione o la precipitazione dell'antigene se presente nel campione



# Reazione agglutinazione

Vengono impiegate per determinare il gruppo sanguigno

|                       | Gruppo A  | Gruppo B  | Gruppo AB   | Gruppo 0  |
|-----------------------|---|---|---|---|
| Tipo di globuli rossi | <br>A            | <br>B             | <br>AB               | <br>0                |
| Anticorpi presenti    | <br>Anti-B      | <br>Anti-A      | Nessuno   | <br>Anti-A e Anti-B |
| Antigeni presenti     | <br>Antigene A | <br>Antigene B | <br>Antigeni A e B | Nessuno   |

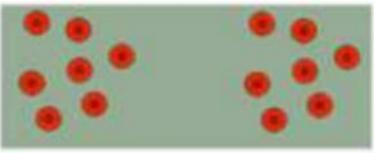
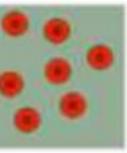
# Reazione agglutinazione

Il campione di sangue viene testato con due diversi tipi di siero immune contenenti anticorpi anti-A ed anti-B



# Reazione agglutinazione

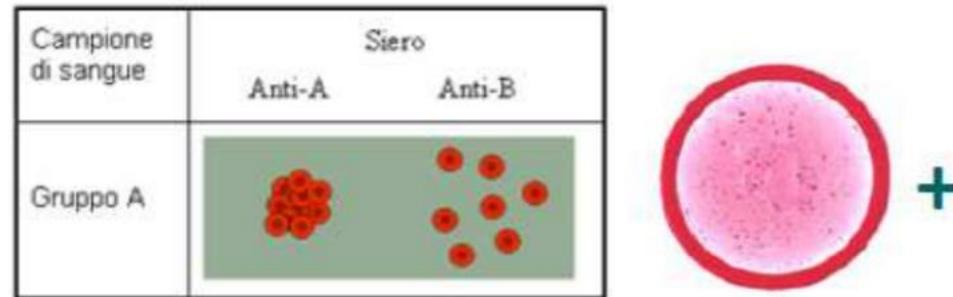
Se non avviene reazione di agglutinazione il campione non contiene né l'antigene A, né l'antigene B è quindi appartiene al Gruppo 0

| Campione di sangue | Siero   |   |
|--------------------|---|---|
|                    | Anti-A  | Anti-B  |
| Gruppo 0           |  |  |



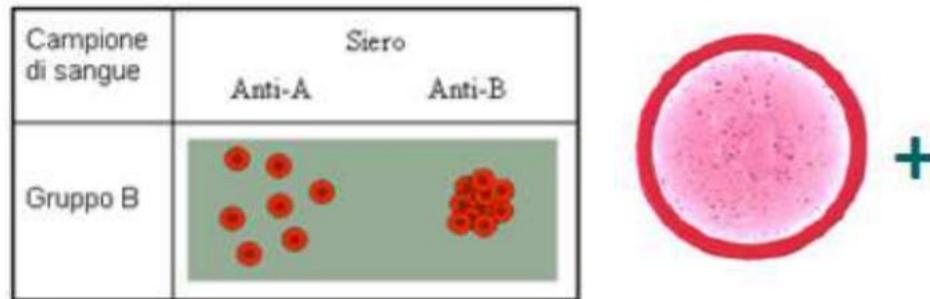
# Reazione agglutinazione

Se avviene reazione di agglutinazione del campione con siero contenente anticorpi contro l'antigene A il sangue appartiene al Gruppo A



# Reazione agglutinazione

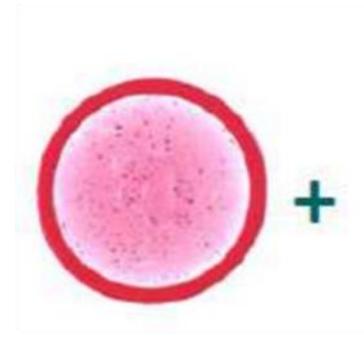
- Se avviene reazione di agglutinazione del campione con siero contenente anticorpi contro l'antigene B il sangue appartiene al Gruppo B



# Reazione agglutinazione

Se avviene in entrambi i casi la reazione di agglutinazione il campione contiene sia l'antigene A che l'antigene B è quindi appartiene al Gruppo AB

| Campione di sangue | Siero   |   |
|--------------------|---|---|
|                    | Anti-A  | Anti-B  |
| Gruppo AB          |  |  |



# Reazione di agglutinazione

In caso di infezioni batteriche si ricerca **la proteina C reattiva (PCR)** che viene prodotta dal fegato che in vivo può legare polisaccaridi batterici, funghi ecc ed in vitro il polissaccaride C dello pneumococco.

La PCR è presente normalmente nel siero ed incrementa in seguito a danni tissutali, infezioni batteriche e virali, infiammazioni e neoplasie.

Dosaggio della proteina C reattiva mediante (PCR) avviene mediante agglutinazione al lattice (indiretta)

# Reazione di agglutinazione

**Principio del test:** la proteina C reattiva causa l'agglutinazione di particelle di lattice ricoperte di anticorpi anti-PCR

## **Si esegue su siero fresco**

CTR+ Soluzione stabilizzata, di origine umana, avente concentrazione PCR di 30 - 50 mg/L.

CTR- Soluzione proteica non reattiva con il lattice

Un'agglutinazione evidente entro 2 minuti indica positività. L'assenza di agglutinazione è indice di negatività. In caso di positività è opportuno titolare semiquantitativamente il siero

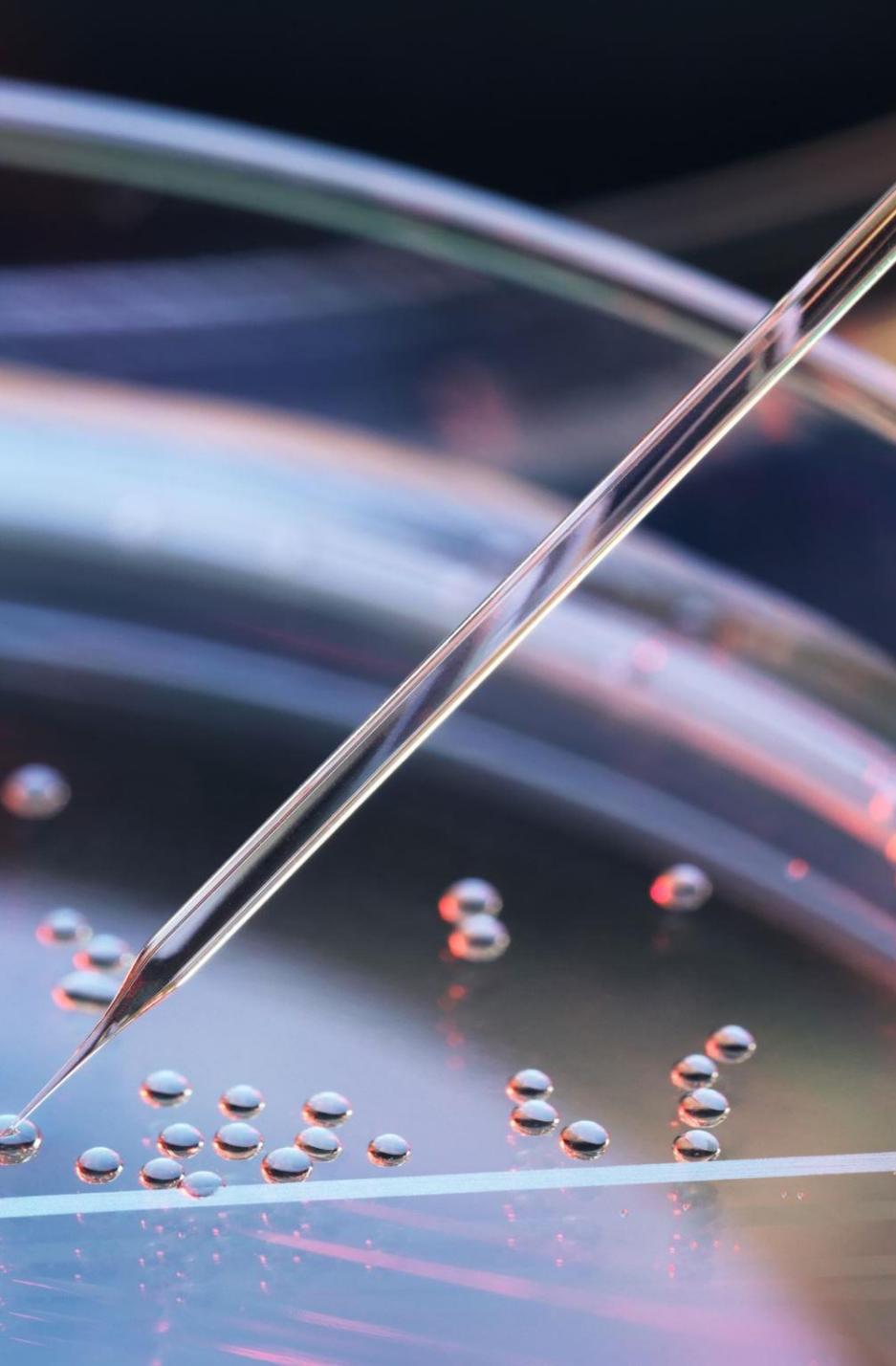
# Reazione di agglutinazione

## PROCEDIMENTO SEMIQUANTITATIVO

diluizioni seriali del siero in esame

Il titolo è dato dall'ultima agglutinazione evidente

| Reagenti    | Area 1     | 2               | 3               | 4               | 5               | 6               |
|-------------|------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Fisiologica | 50 $\mu$ l | 50 $\mu$ l      | 50 $\mu$ l      | 50 $\mu$ l      | 50 $\mu$ l      | 50 $\mu$ l      |
| Campione    | 50 $\mu$ l | 50 $\mu$ l da 1 | 50 $\mu$ l Da 2 | 50 $\mu$ l da 3 | 50 $\mu$ l da 4 | 50 $\mu$ l da 5 |
|             |            |                 |                 |                 |                 |                 |
| Sospensione | 50 $\mu$ l | 50 $\mu$ l      | 50 $\mu$ l      | 50 $\mu$ l      | 50 $\mu$ l      | 50 $\mu$ l      |
| Titolo      | 12 mg/l    | 24 mg/l         | 48 mg/l         | 96 mg/l         | 192 mg/l        | 384 mg/l        |



---

# ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

---

Tecnica immunochimica che consente di effettuare un dosaggio immunologico mediante la coniugazione chimica con enzimi (quali ad es. la fosfatasi alcalina o la perossidasi) di anticorpi o antigeni. L'attività di questi enzimi è facilmente monitorabile e consente di quantificare l'immunocomplesso.

DIRETTO (Ab I° marcato)

INDIRETTO (Ab II° marcato)

**Quantitative**

**Semiquantitative**

**Qualitative**

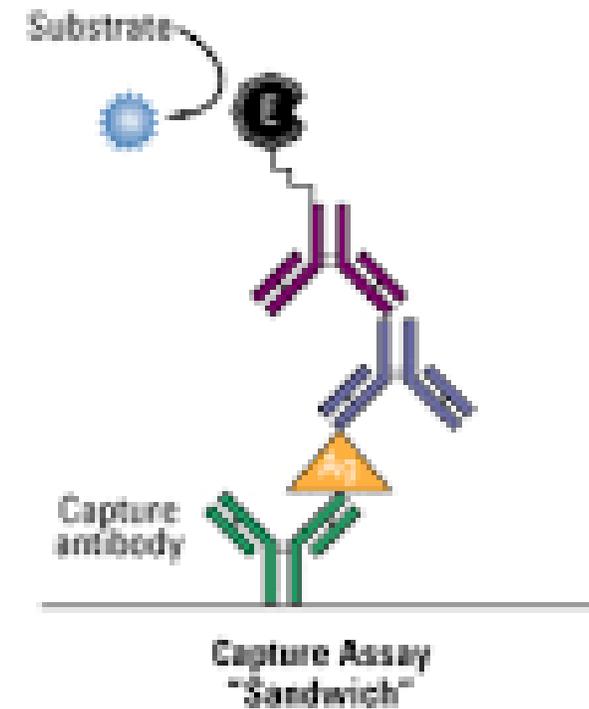
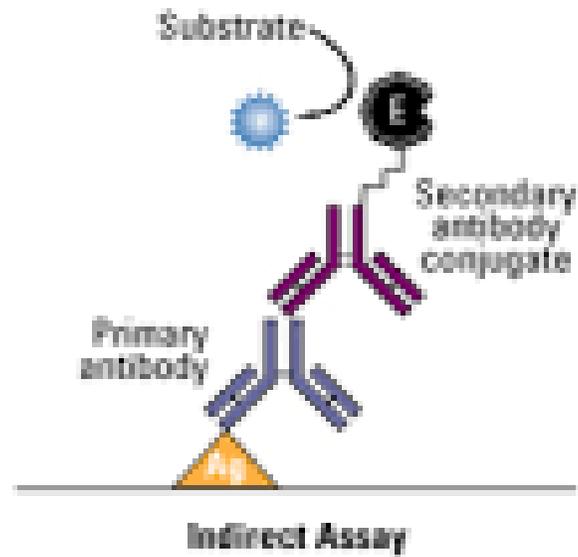
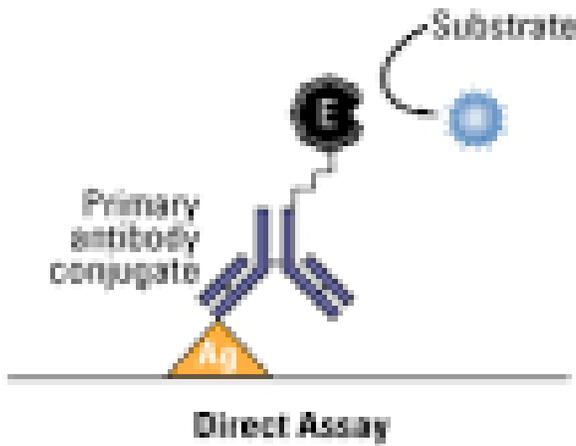
**ELISA**

**Western blot**

**Immunoistochemica**

# ELISA

- BLOCKING
- INCUBAZIONE
- IMMUNOCOMPLESSO
- SUBSTRATO

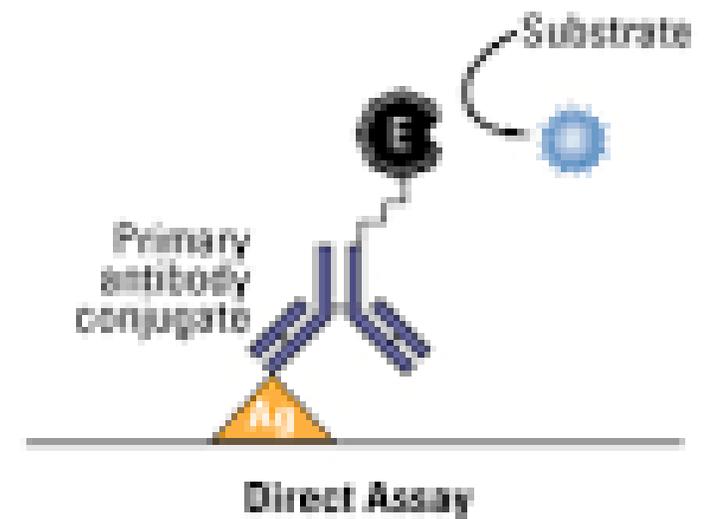


# ELISA DIRETTO

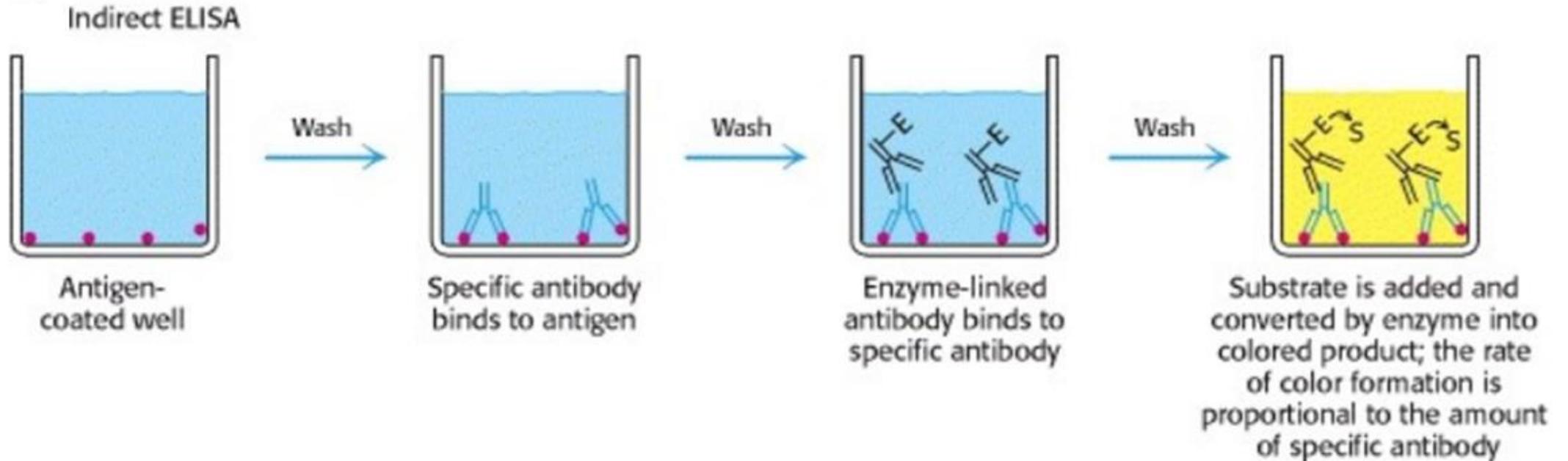
## TITOLAZIONE Ab

Antigeni adsorbiti passivamente alle pareti di provette di plastica o di pozzetti di apposite piastre di plastica

Siero diagnosi



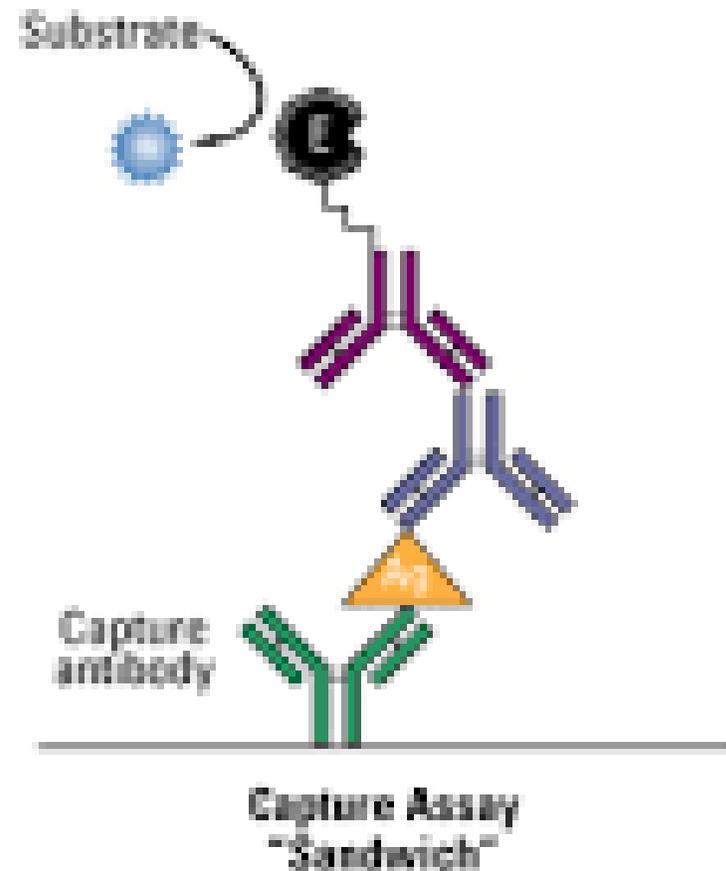
# ELISA INDIRECTO



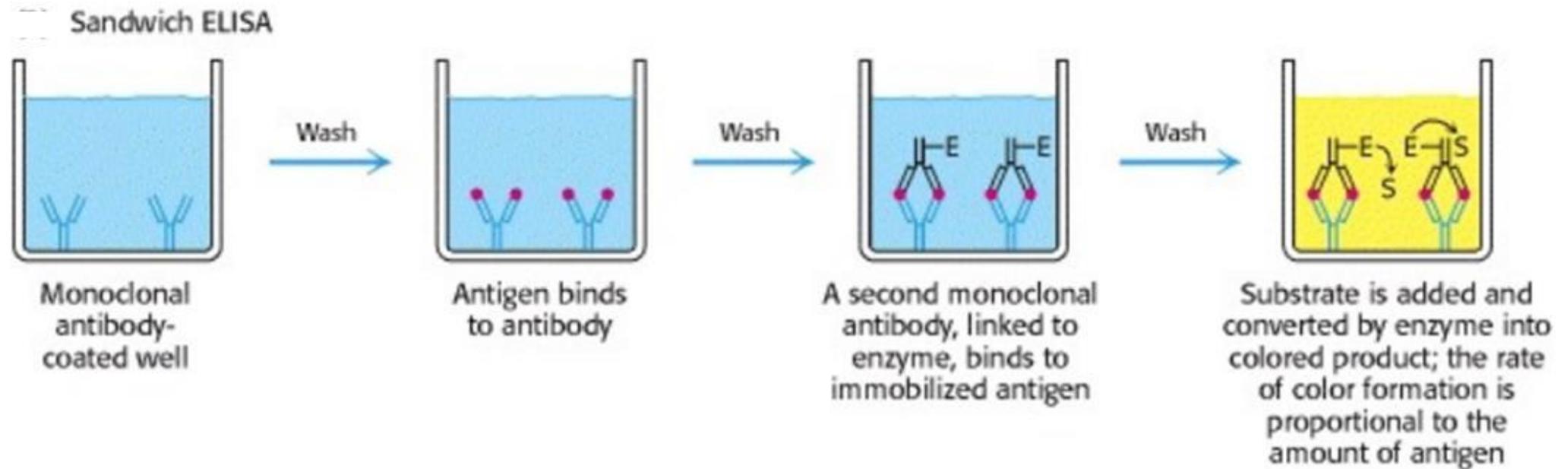
# ELISA SANDWICH

## RICERCA Antigeni

Uso di piastre in cloruro di polivinile (PVC) o polistirene polistirene - assorbimento passivo (coating) dovuto ad interazioni idrofobiche tra proteine non polari e matrice plastica -



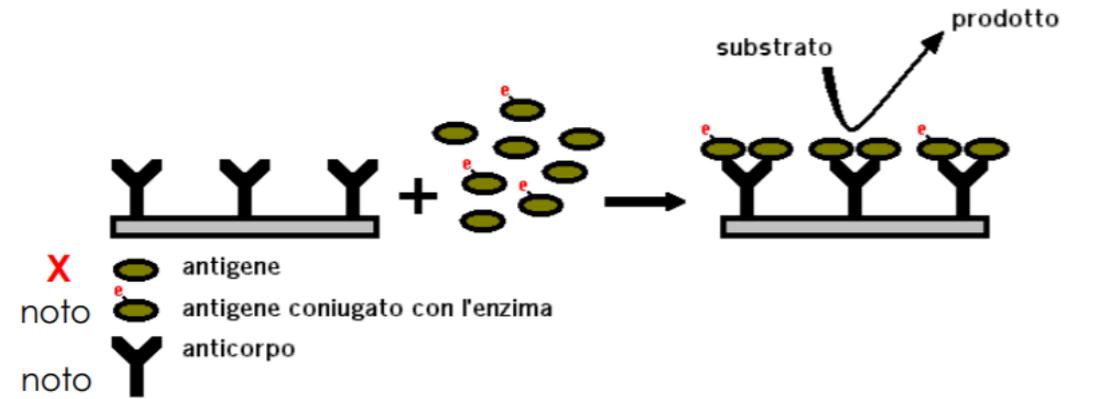
# ELISA DIRETTO, variante sandwich



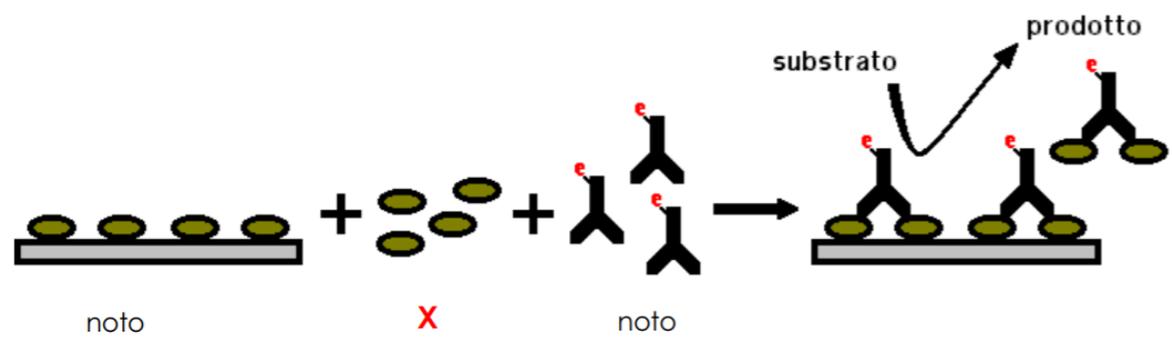
# ELISA COMPETITIVO

## COMPETITIVO DIRETTO

- fase solida Ab
- coniugato Antigene-Enzima

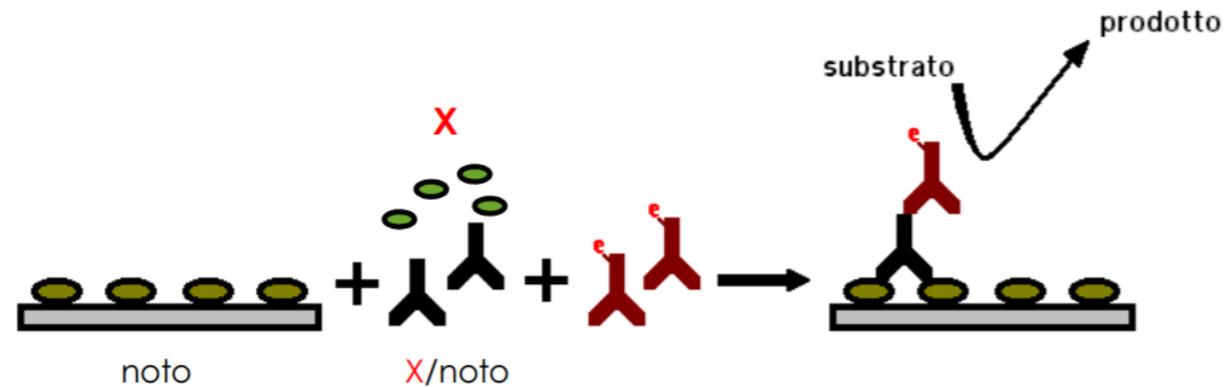


- fase solida Ag
- coniugato Anticorpo-Enzima

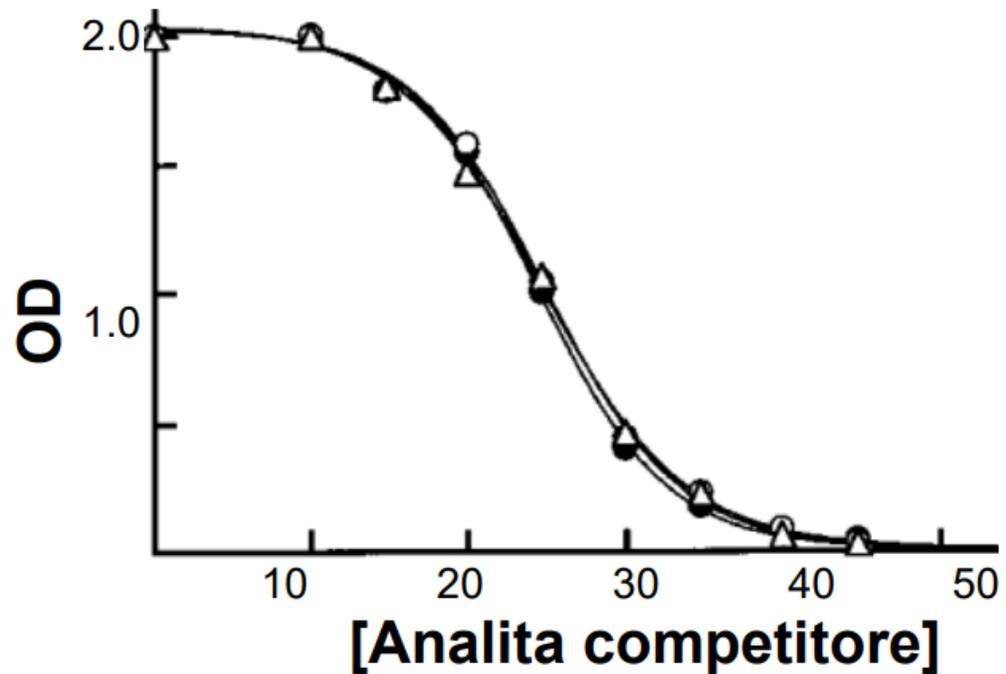


# ELISA COMPETITIVO

## COMPETITIVO INDIRETTO

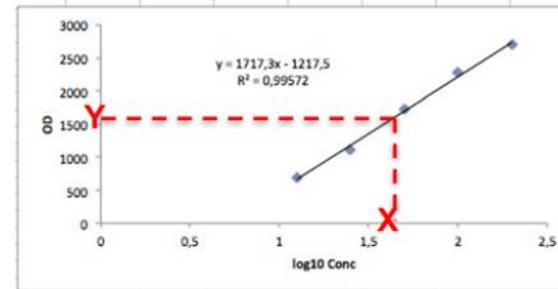
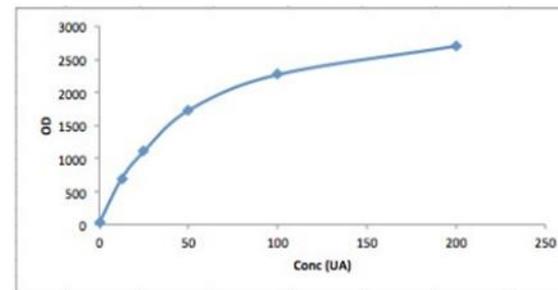
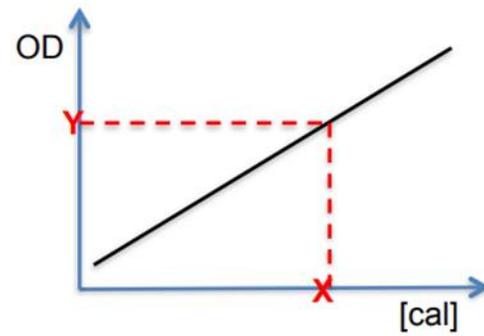


# ELISA COMPETITIVO



La concentrazione del prodotto enzimatico misurata risulterà inversamente proporzionale alla concentrazione dell'analita (antigene non marcato).

# ELISA

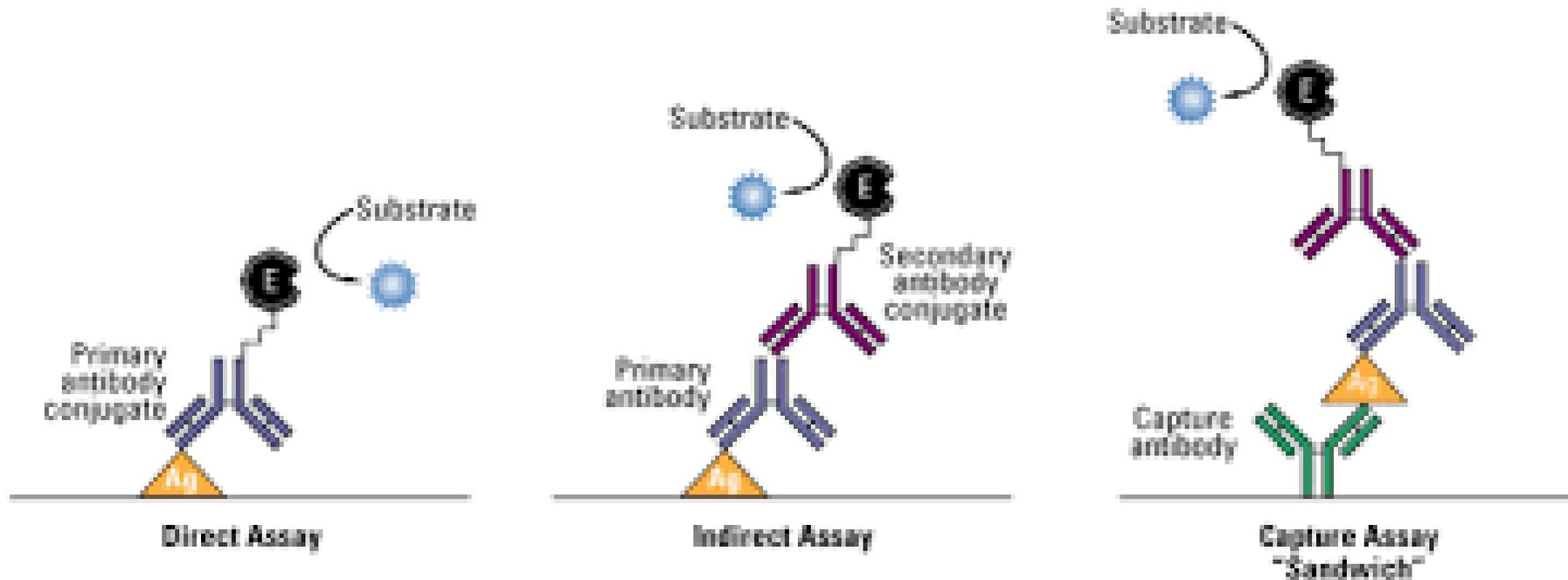


$$y = mx + q$$



$$x = (y - q) / m$$

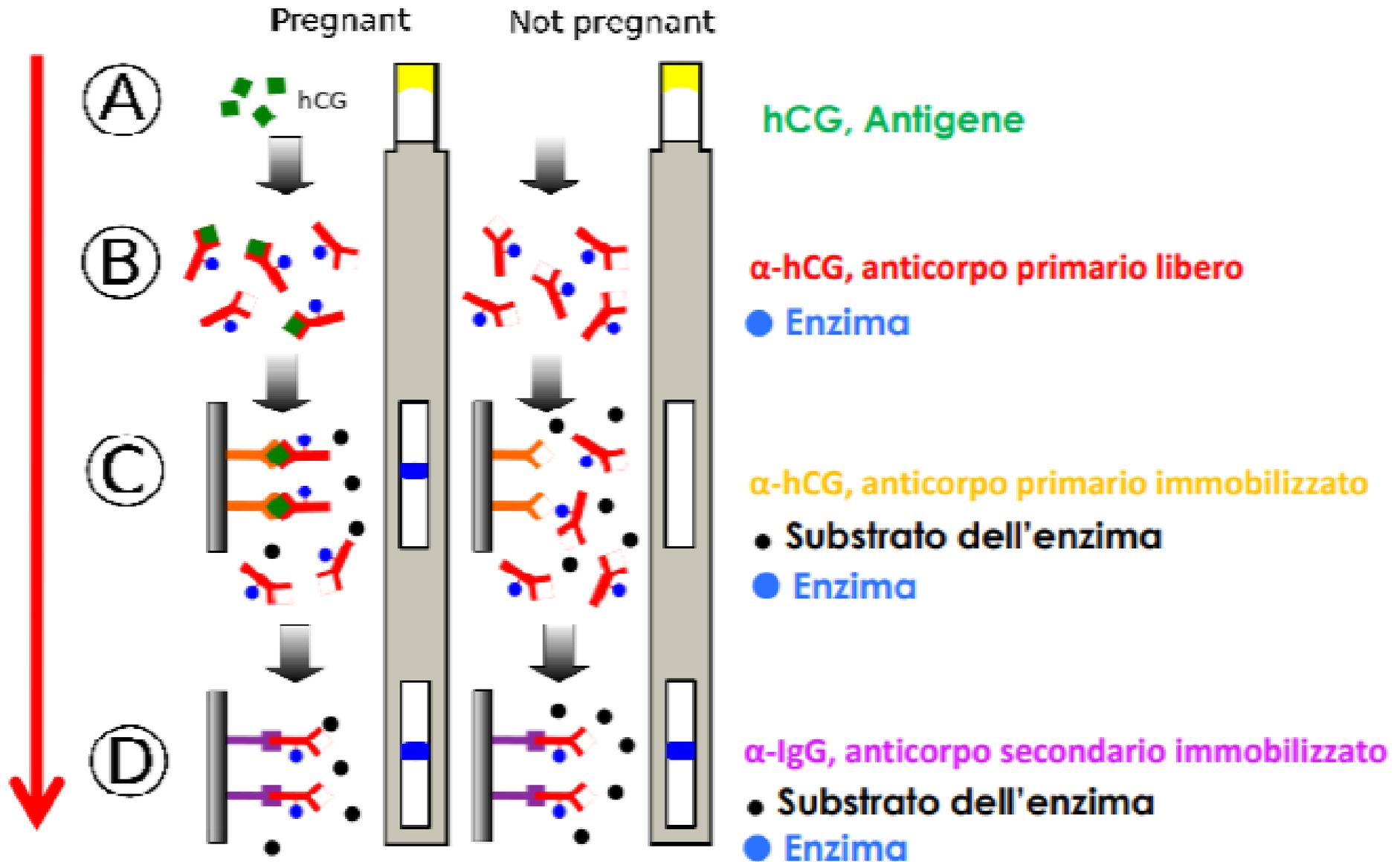
| ENZIMA             | SUBSTRATO                                    | SOLUZIONE BLOCCANTE | RIVELAZIONE |
|--------------------|--|---------------------|-------------|
| Fosfatasi alcalina | pNPP (p-nitrofenilfosfato)                   | NaOH                | 405 nm      |
| Perossidasi        | TMB (3,3',5,5'-tetrametil tetrametilbenzene) | Ac. Solforico       | 450 nm      |



# ELISA in diagnostica

Ricerca di proteine nel plasma, a concentrazioni così basse da non poter essere rilevate ad es. con metodi nefelometrici (basati sulla torbidità) (proteina C, proteina S, ecc.); dosaggio del ferro nel siero; ricerca di anticorpi (anti-HIV); ricerca di ormoni come l'insulina, di estrogeni, di gonadotropina corionica umana, di antigeni di superficie delle epatiti, ecc ecc.

MOVIMENTO PER CAPILLARITÀ



**Quantitative**

**Semiquantitative**

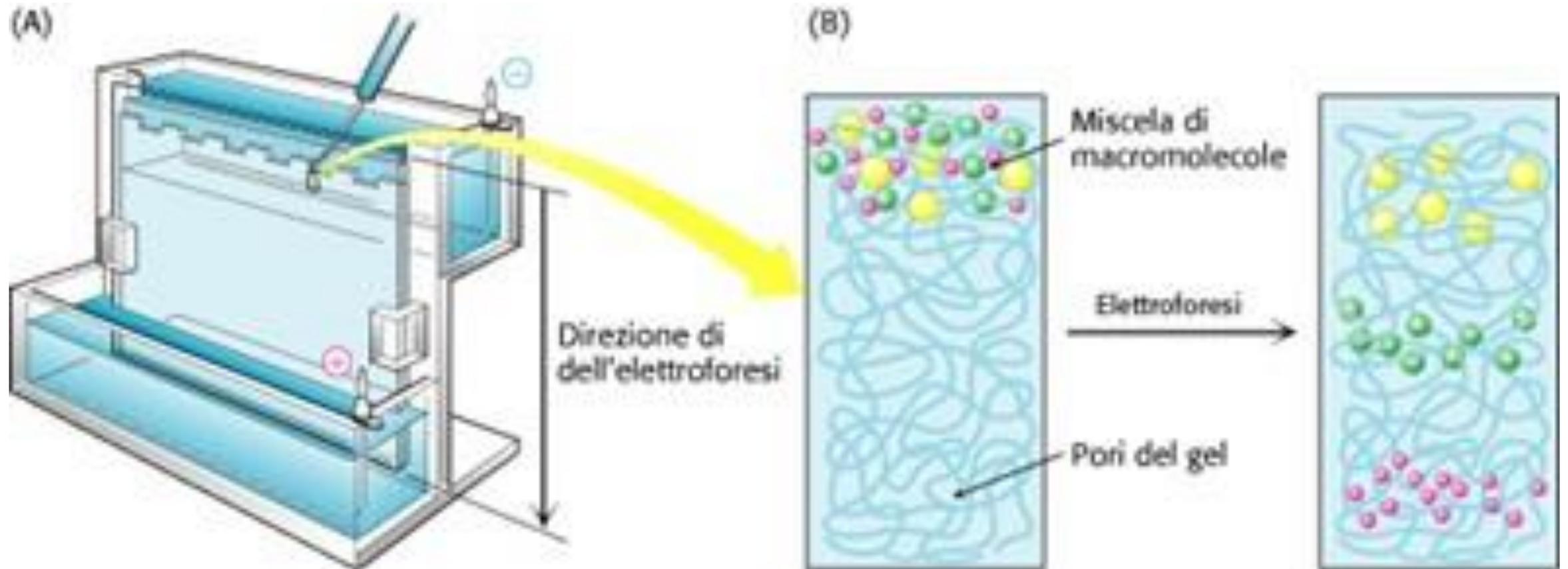
**Qualitative**

**ELISA**

**Western blot**

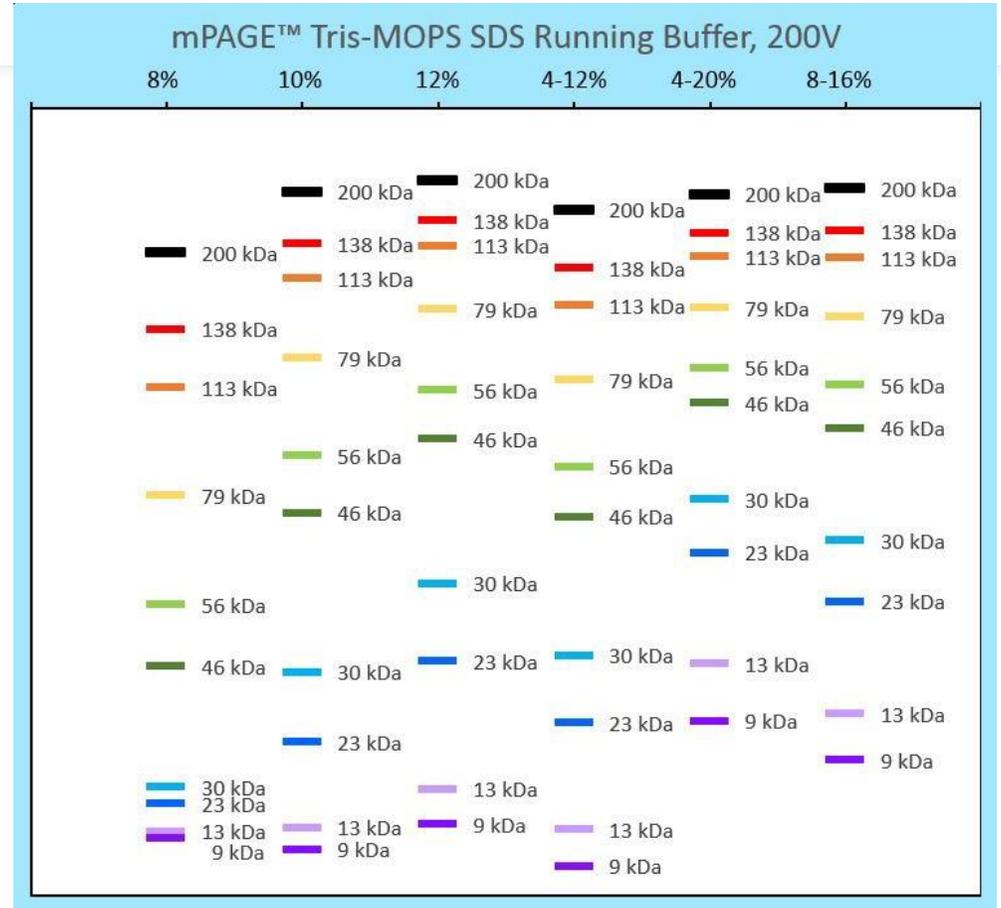
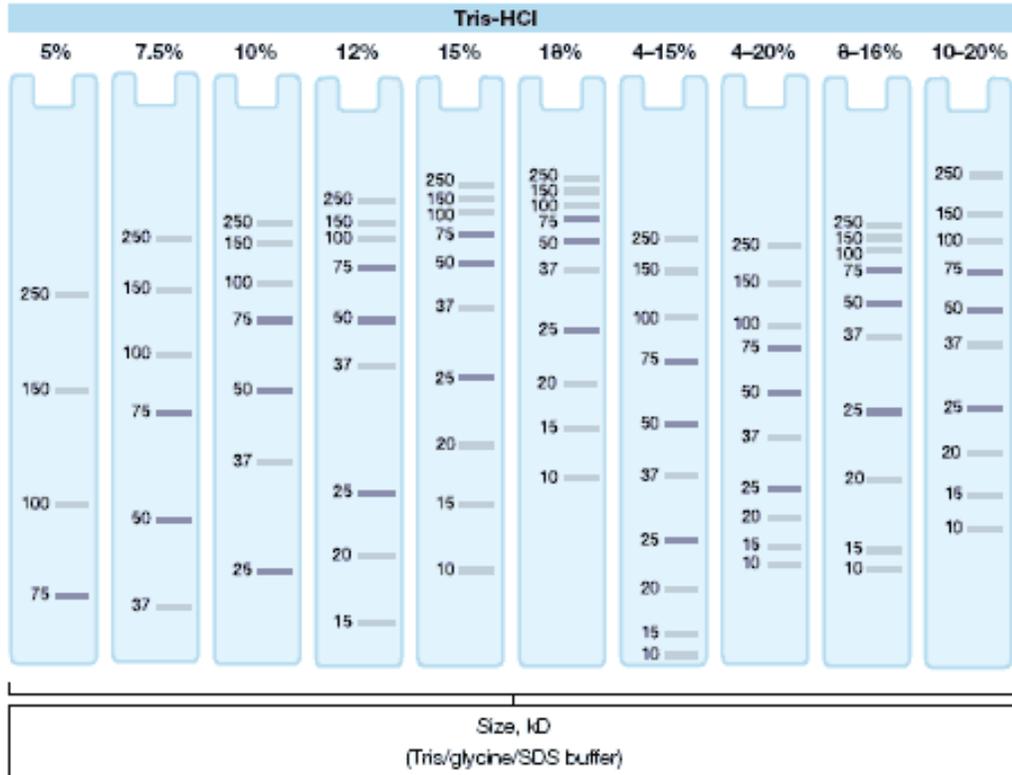
**Immunoistochemica**

# Western blot



# Western Blot

1. Estrazione e purificazione delle proteine da cellule/tessuti
2. Denaturazione del campione proteico
3. Separazione delle proteine in elettroforesi di acrilammide
4. Trasferimento su membrana (blotting)
5. Blocco dei siti aspecifici di legame
6. Rilevazione della proteina d'interesse con un anticorpo primario
7. Rilevazione dell'immunocomplesso con anticorpo secondario marcato



# Applicazioni diagnostiche Western Blot

- Presenza/assenza proteina e valutazione semi-quantitative
- Rilevazione di anticorpi nel siero di pazienti, test conferma infezione da HIV o malattia di lyme

# IMMUNOISTOCHEMICA

1. Allestimento sezione (Sparaffinatura e reidratazione)
2. Inibizione enzimi endogeni
3. Smascheramento antigenico
4. Blocco siti aspecifici
5. Rilevazione dell'antigene con Ab primario
6. Rilevazione dell'immunocomplesso mediante Ab secondario marcato
7. Substrato e contrasto
8. Montaggio

# IMMUNOISTOCHEMICA in DIAGNOSTICA

- DISPONIBILITA' DI ANTICORPI PER ANTIGENI SPECIFICI:  
LINEAGE-SPECIFIC (es. tireoglobulina per la tiroide) -  
LINEAGE-RESTRICTED (es. citocheratine in tessuti epiteliali)
- POSSIBILITA' DEGLI ANTICORPI PER TESSUTI FISSATI ED IN  
PARAFFINA
- INTERPRETAZIONE DEL DATO è SEMI-QUANTITATIVA'  
come il cut-off

# IHC markers

1. Ab EPITELIALI
2. Ab MESENCHIMALI
3. EMOLINFOPOIETICI
4. ORMONI, RECETTORI ORMONALI E PROTEINE CORRELATE
5. ONCOPROTEINE, FATTORI DI CRESCITA E LORO RECETTORI
6. MARKERS ASSOCIATI AL CICLO CELLULARE
7. MARCATORI DELLA MATRICE EXTRACELLULARE (es. Laminina)

# Citogenetica

- **Citogenetica classica** consente lo studio dei cromosomi in metafase mediante il bandeggio che non consente però una risoluzione di megabasi
- **Citogenetica molecolare** consente di studiare le alterazioni cromosomiche come amplificazioni e delezioni con limite di risoluzione di poche megabasi mediante impiego di sonde su acidi nucleici estratti da tessuti e cellule

# Cariotipo

Analisi del cariotipo consente di visualizzare l'aspetto d'insieme dell'assetto cromosomico.

Diagnostica citogenetica applicabile in diagnosi prenatale; infertilità; caratterizzazione cariologica di tumori.

# Analisi del cariotipo

Il termine **CARIOTIPO** è usato per indicare la serie completa di cromosomi di una cellula, di una specie, o di un singolo organismo.

È definito dall'analisi del numero e dalla morfologia di tutti i cromosomi presenti nel nucleo. Il cariotipo umano è costituito da un numero diploide  $2n=46$  cromosomi (22 coppie di autosomi + 1 coppia di cromosomi sessuali eteromorfi, X e Y) raggruppati in 6 gruppi (A-G)

# CARIOGRAMMA

L'analisi al microscopio ottico permette di studiare un cariotipo di un sistema cellulare determinando il numero cromosomico e, per ciascuno di essi le caratteristiche circa la **lunghezza, la posizione del centromero, la distribuzione caratteristica delle bande**, ottenute da colorazioni specifiche ('pattern di bandeggio', generalmente bande G), i cromosomi sessuali e la presenza di alterazioni morfologiche (mutazioni strutturali) rispetto al cariotipo *standard*

# CARIOGRAMMA

- Il cariotogramma è la rappresentazione ordinata di tutti gli elementi del corredo cromosomico **reale**, ottenuto da preparati cromosomici in metafase.
- A ciascun cromosoma della '**piastra cromosomica**' dell'individuo studiato viene appaiato il suo omologo e ciascuna coppia di omologhi viene disposta in ordine decrescente, per dimensioni e posizione del centromero.

# II BANDEGGIO CROMOSOMICO

- Il bandeggio è definito come la variazione di proprietà di colorazione del cromosoma nella sua lunghezza.
- Utilizzando diverse metodiche di colorazione dei cromosomi è possibile osservare al microscopio ottico la produzione di un certo numero di bande scure (regioni eterocromatiche) alternate da bande chiare, o interbande (regioni eucromatiche, trascrizionalmente attive), perfettamente riproducibili come numero, posizione ed estensione negli stessi cromosomi di cellule diverse provenienti dallo stesso individuo.

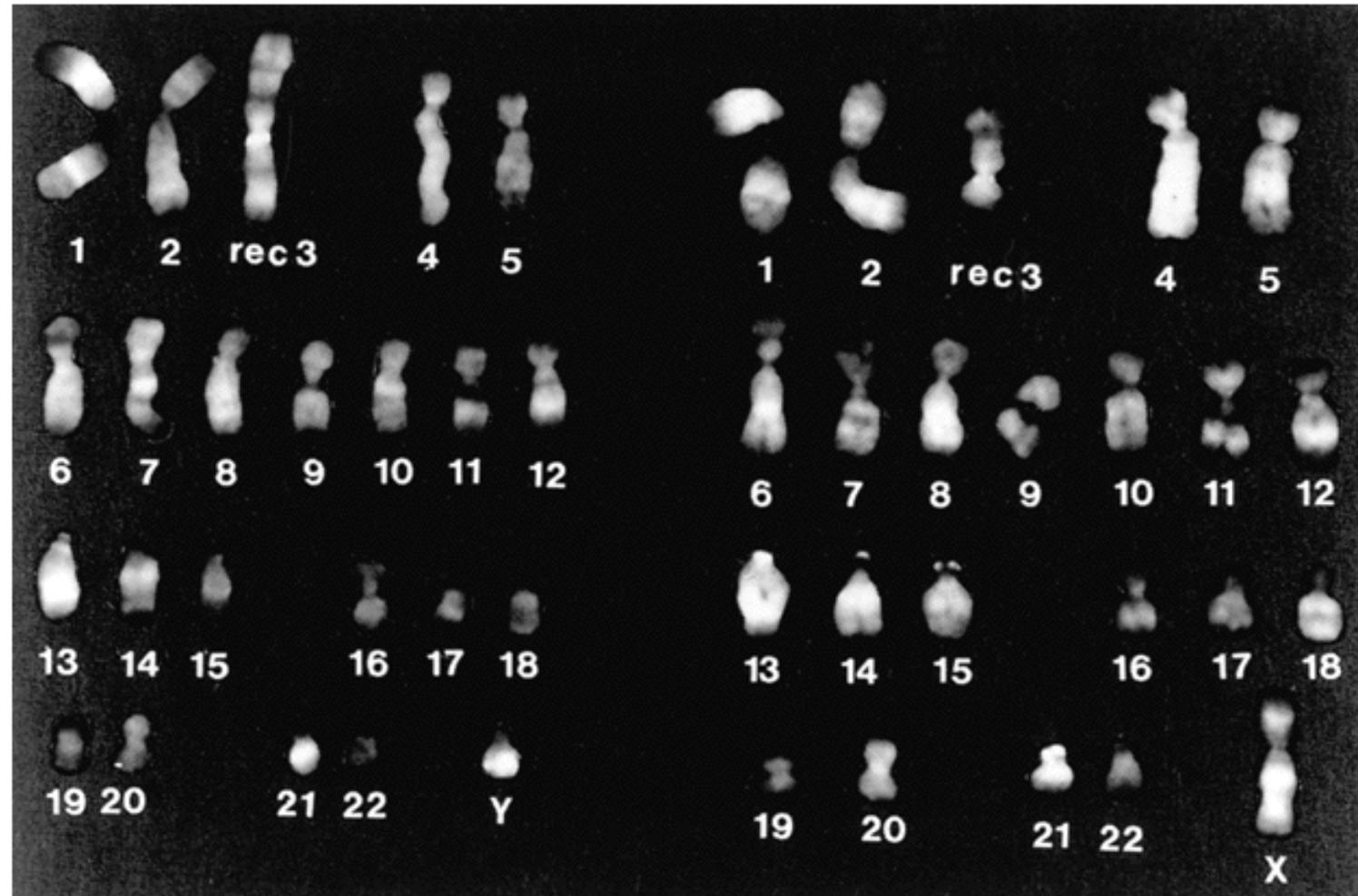
# II BANDEGGIO CROMOSOMICO

Tecniche di colorazione consentono di ottenere pattern di bandeggio diversi e caratteristici descrittivi del cromosoma. La bandeggiatura viene generalmente eseguita su cromosomi condensati di cellule in mitosi: cromosomi metafasici o prometafasici.

Le variazioni del numero di bande, per estensione e per morfologia, soprattutto in relazione al grado di condensazione dei cromosomi diventano oggetto di studio

# II BANDEGGIO CROMOSOMICO

I **bandeggi riflettono** in genere **il livello di compattamento della cromatina: nel bandeggio G** e in tutti i tipi di bandeggio **"G-like"**, le **bande scure** -o a colorazione più intensa, contengono **regioni eterocromatiche**; sono in **relazione con la composizione in basi nucleotidiche** del DNA (nel bandeggio G: bande scure=ricche in **AT**, bande chiare= ricche in **GC**);i **geni attivi** risiedono **per lo più nelle bande chiare**. Tutti i pattern di bandeggio comunque rivelano un **differente livello di organizzazione della cromatina**

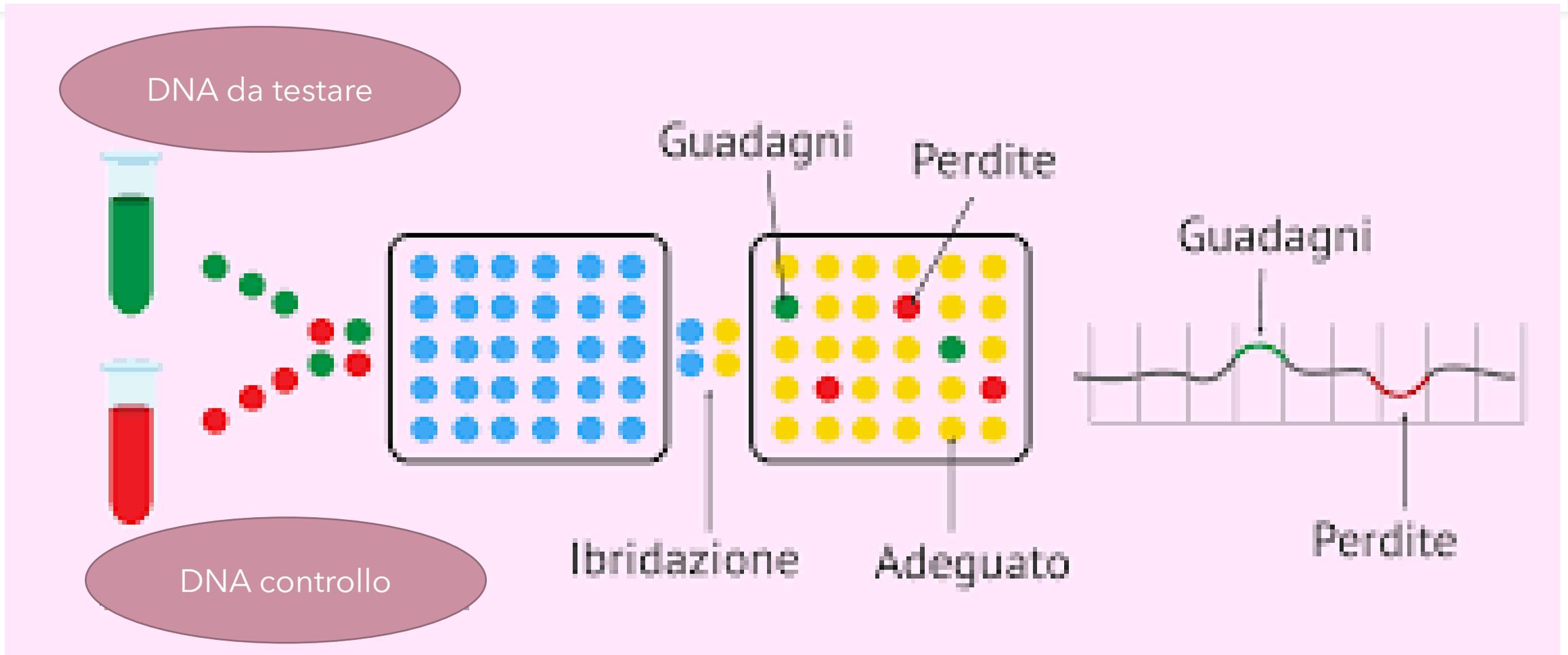


# CGH

Per amplificare sensibilità del CGH è stato sviluppato arrayCGH

Differiscono dal tradizionale perchè substrato di reazione è una matrice solida-microarray- trattato chimicamente per legare spot di frammenti clonati di DNA genomico

# CGH



# CGH

Matrice solida su cui sono depositate cellule in metafase o oligonucleotidi, corrispondenti a loci specifici di ogni singolo cromosoma fino a comprendere l'intero genoma umano, su cui vengono co-ibridati il DNA del genoma in esame con quello di un genoma di controllo

I campioni di **DNA test** e **di controllo** sono differentemente marcati, con fluorocromi **rossi (Cy5)** e **verdi (Cy3)** mediante Random Primer labeling

Segue differenziale

La fluorescenza è rilevata mediante uno **scanner a laser** grazie al quale si acquisisce una immagine per entrambi i fluorocromi.

# CGH

Le emissioni di fluorescenza sono quantificate calcolando per ogni sonda quanto il rapporto tra i segnali emessi dal campione e dal DNA di riferimento devia dal valore zero che indica un uguale dosaggio della regione del DNA test e del DNA controllo.

Se DNA reference e test sono uguali

rapporto ibridizzazione con cromosomi sarà  $2:2 = 1$

Se DNA test ha copie in eccesso rispetto a reference es 3

rapporto ibridizzazione sarà  $3:2$  quindi  $>1$

Se DNA test ha copie in meno rispetto a reference es 1

rapporto ibridizzazione sarà  $1:2$  quindi  $<1$

# CGH

Cy5 X sperim. **Cy5**      **Cy3**      Cy3 verde X riferim.

X sper = 0    X rif = 0      spot nero

X sper = X rif     $X_s - X_r = 0$     spot giallo

X sper < X rif     $X_s - X_r > 0$     spot verde

X sper > X rif     $X_s - X_r > 0$     spot rosso

La sovrapposizione di uno spot verde ed uno rosso di eguale intensità dà fluorescenza gialla  
= azzeramento del segnale differenziale

| <u>Spot</u>   | <u>Patient</u>   | <u>Control</u>  | <u>Green : Red</u> |
|---|--|---|--------------------|
|    | <br>2 copies  | <br>2 copies   | 1.0 : 1.0          |
|   | <br>3 copies | <br>2 copies  | 1.5 : 1.0          |
|  | <br>1 copy  | <br>2 copies | 0.5 : 1.0          |



# CGH

Vantaggi: analisi multipla di loci ed impiego di materiale anche congelato o paraffinato per estrarre DNA genomico

NON visualizza però traslocazioni reciproche bilanciate o inversioni ma solo sbilanciamenti del numero di loci

# Test genetici e mutazioni

---



# Test genetici e mutazioni

Test genetici diretti:

- Mutazioni attese in un solo gene in specifiche posizioni
- Mutazioni imprevedibili nella posizione ma attese in un dato gene
- Mutazioni con molti geni potenzialmente responsabili (eterogenicità genica)

# Mutazioni attese

Si ricercano mutazioni attese di un gene in una o poche posizioni specifiche

- Autosomiche dominanti monomorfe → specifica mutazione conferisce fenotipo malato (Ipercolesterolemia familiare; Neurofibromatosi; Nanismo acondroplastico; Sindrome di Marfan)
- A trasmissione autosomica recessive → pochi alleli mutati e relativamente frequenti (Fibrosi cistica; malattie lisosomiali; Talassemia; Fenilchetonuria)

# Mutazioni attese

Le malattie monogeniche **non sono diagnosticabili mediante esame cromosomico**, in quanto le mutazioni geniche sono troppo piccole per essere visualizzate con l'analisi del cariotipo al microscopio.

Se il gene che causa la malattia è stato scoperto si possono ricercare **le mutazioni del gene** mediante esami laboratoristici di tipo molecolare. Se il gene che causa la malattia **non è stato ancora scoperto**, la diagnosi al momento è esclusivamente clinica.

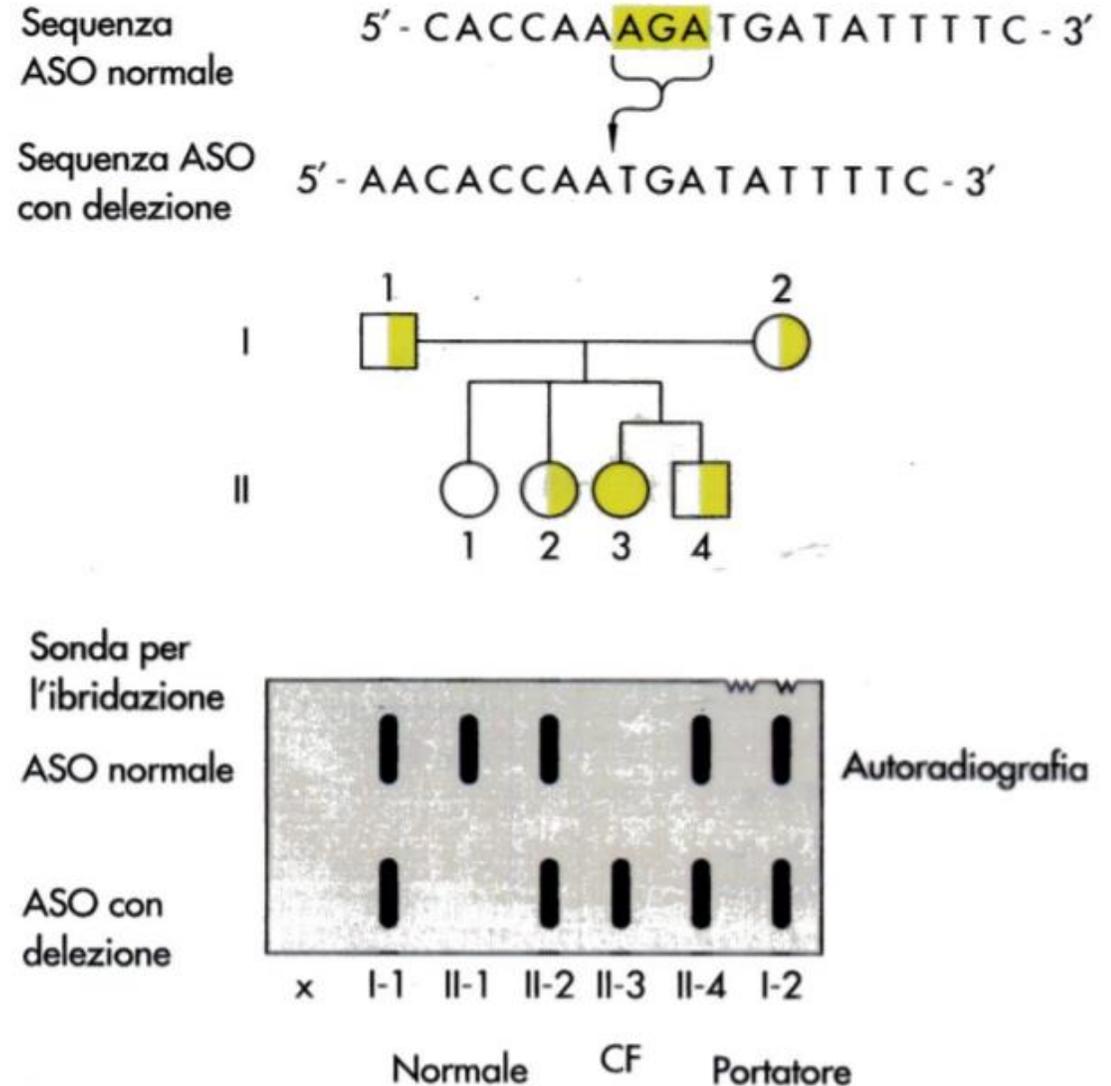
# Mutazioni attese

- ASO, allele specific oligonucleotide si basa su impiego di singolo oligo sintetico (20 nt) che ibrida con sonda DNA ma si dissocia in condizioni di astringenza es. per mutazione puntiforme
- ARMS, amplification refractory mutation sensitive  
Primer ed amplificato solo se non c'è mutazione

# ASO PCR, Allele specific oligonucleotide PCR

- DNA amplificato in PCR e poi denaturato
- Ibridazione per sequenza normale o mutata

CFTR Fibrosi Cistica  
BRCA1 Carcinoma della mammella



# ASO PCR, Allele specific oligonucleotide PCR

**Il gene *BRCA* è coinvolto nello sviluppo del tumore al seno e alle ovaie**

Il ***BRCA*** risulta essere implicato in una serie di funzioni cellulari di primaria importanza come la **riparazione del DNA**, la **regolazione della trascrizione**, il **controllo del ciclo cellulare** e l'**ubiquitinazione**

Mutazioni sono **suscettibili ed indicano familiarità della malattia**

Nei soggetti portatori di questo tipo di mutazione il **rischio di sviluppare un carcinoma mammario** nell'arco della vita è compreso tra il 50 e l'70%; per il carcinoma **ovarico** il rischio è del 15-44%

## ASO PCR, Allele specific oligonucleotide PCR

- Le mutazioni identificate sono più di 600 e quasi tutte comportano la produzione di una proteina tronca alcune di esse sono più frequenti di altre all'interno di una popolazione
- È stato messo a punto un test di screening per identificare mutazioni (SNPs) in qualsiasi posizione del del cDNA di BRCA1/2.

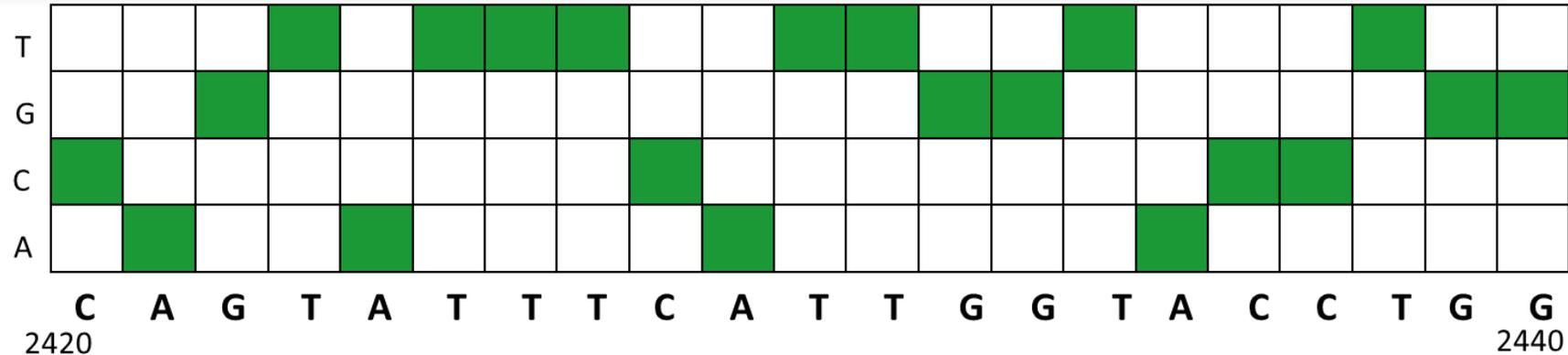
# SNPs in BRCA1

1. Si amplifica il cDNA dal soggetto in esame mediante PCR
2. Si marca l'amplificato con un **colorante fluorescente**
3. Si **ibrida al microarray**, usando condizioni che permettono l'ibridazione di piccole sequenze (gli oligo) **perfettamente complementari**
4. Si analizza il risultato dell'ibridazione mediante analisi computerizzata per identificare eventuali differenze rispetto ad un campione amplificato da un individuo omozigote per l'allele normale del gene *BRCA 1*

# SNPs in BRCA1

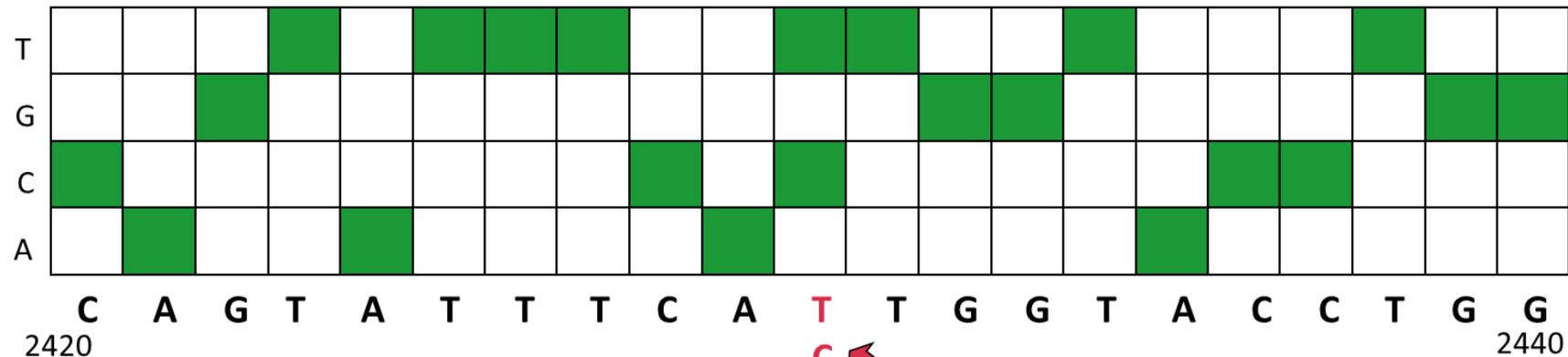
Confronto di due microarray tra la posizione 2420 e 2440 del gene BRCA 1 con DNA da individui con genotipo che differisce per un singolo nucleotide in posizione 2431

Individuo OMOZIGOTE per l'allele normale di BRCA 1



Il DNA AMPLIFICATO e MARCATO ottenuto, può essere complementare con tutte le sue basi SOLO ad un ASO presente in ogni colonna del microarray.

Individuo ETEROZIGOTE per l'allele normale di BRCA 1 e un allele con SNP in posizione 2431



C

# Mutazioni attese

- ASO, allele specific oligonucleotide si basa su impiego di singolo oligo sintetico (20 nt) che ibrida con sonda DNA ma si dissocia in condizioni di astringenza es. per mutazione puntiforme
- ARMS, amplification refractory mutation sensitive  
Primer ed amplificato solo se non c'è mutazione

# ARMS, amplification refractory mutation sensitive

Si eseguono due amplificazioni parallele:

- uno dei primer è comune ad entrambe le reazioni;
- l'altro in una reazione è specifico per l'allele normale, nell'altra per l'allele mutato

Usata per il clonaggio o la diagnosi di SNPs

La sequenza deve essere nota e uno dei due primers deve essere posizionato sullo SNP

Le condizioni di reazione devono essere stringenti per avere il riconoscimento specifico del primer

# ARMS, amplification refractory mutation sensitive

## Reazione PCR 1

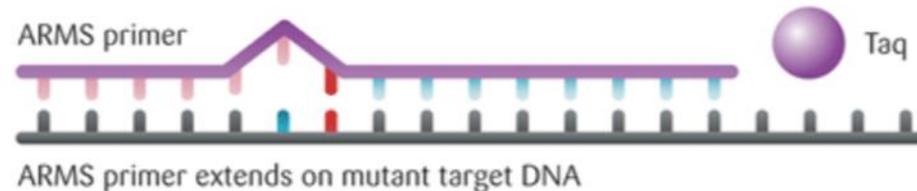
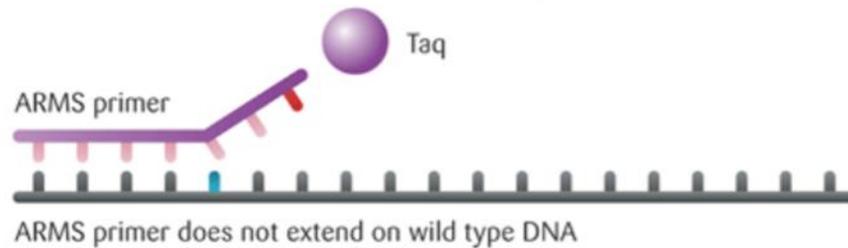
- **un primer specifico per l'allele normale**
- **Secondo primer comune**

## Reazione PCR 2

- **un primer specifico per l'allele mutato**
- **Secondo primer comune**

# ARMS, amplification refractory mutation sensitive

- 1) amplifico in 1 ma non in 2 -> omozigote wt
- 2) amplifico in 2 ma non in 1 -> omozigote mutato
- 3) amplifico in 1 e in 2 -> eterozigote



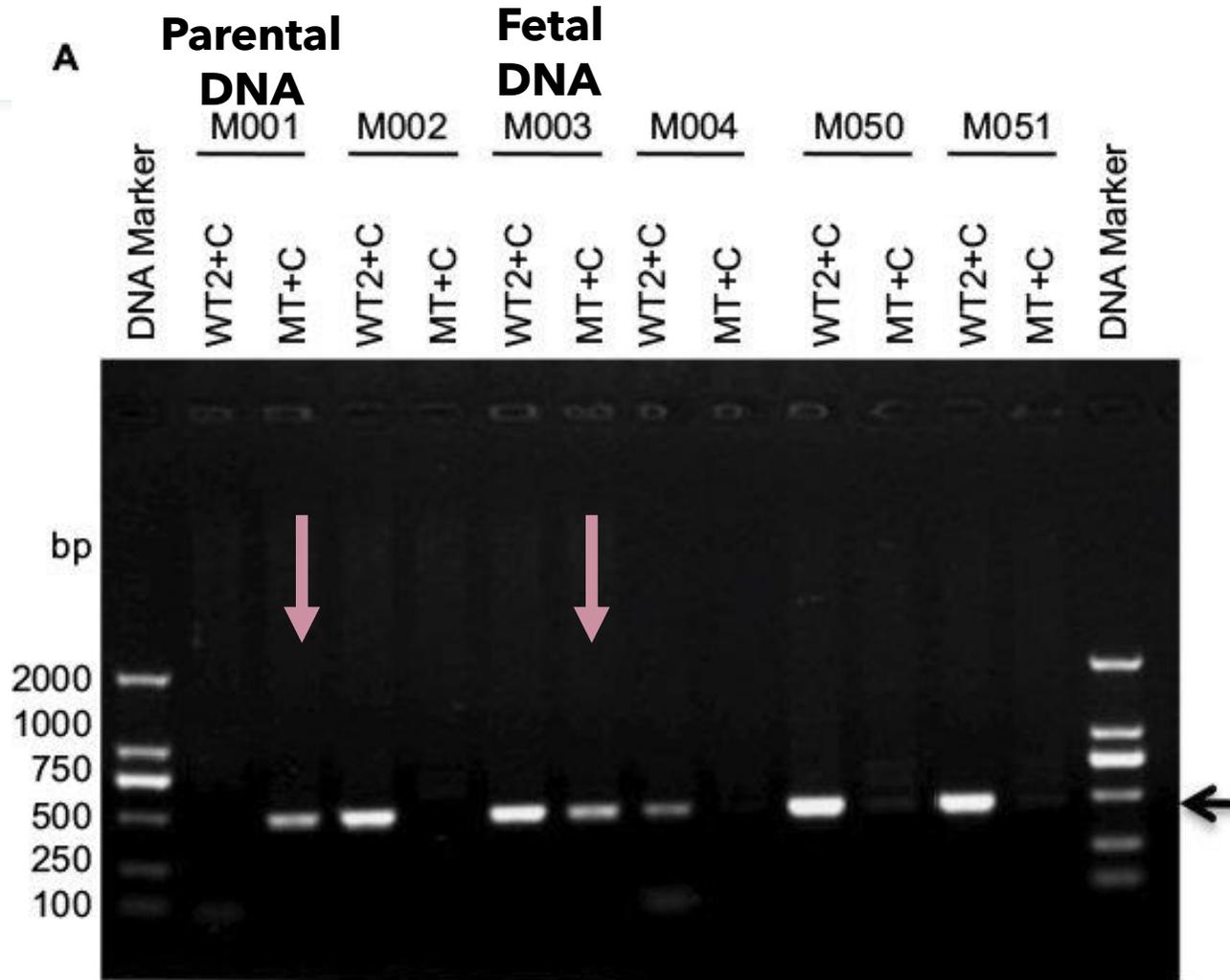
# ARMS, amplification refractory mutation sensitive

La coroideremia (CHM) è una distrofia corioretinica legata all'X con degenerazione progressiva della coroide, dell'epitelio pigmentato della retina (RPE) e della retina.

La mutazione del gene CHM sul cromosoma X causa la mancanza di una determinata proteina (REP-1), che svolge un'importante funzione nell'epitelio pigmentato retinico

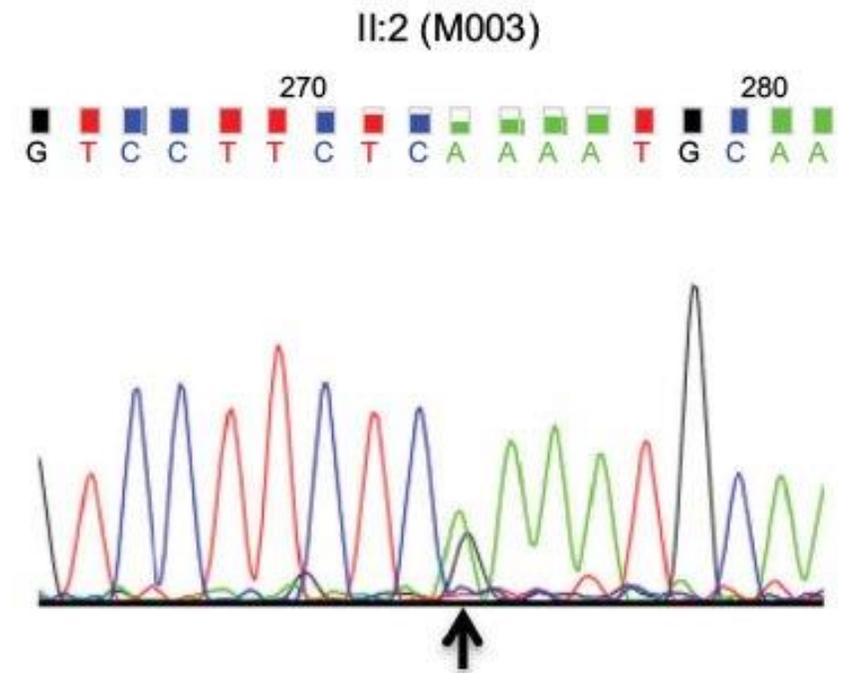
Disegno di set di primers da impiegare per ARMS in paziente ed in DNA fetale

# ARMS, amplification refractory mutation sensitive



**B**

## point mutation of *CHM* c.C799T



Sanger sequencing M003 had a heterozygous variant from C→T

# RLFP, Il polimorfismo di lunghezza di frammento di restrizione

- per determinare lo stato delle malattie genetiche associate a modifiche di siti di restrizione, ad esempio fibrosi cistica in una persona.
- effetto del fondatore o vantaggio degli eterozigoti (Talassemie - Fibrosi cistica)
- per determinare o confermare la sorgente di un campione del DNA quali nelle prove o le indagini penali di paternità.
- nella mappatura genetica per determinare le tariffe di ricombinazione che mostrano la distanza genetica fra i luoghi. (sono trasmessi come caratteri mendeliani semplici es pedigree)
- per identificare i portafili di una mutazione malattia-causante in una famiglia.

# RLFP

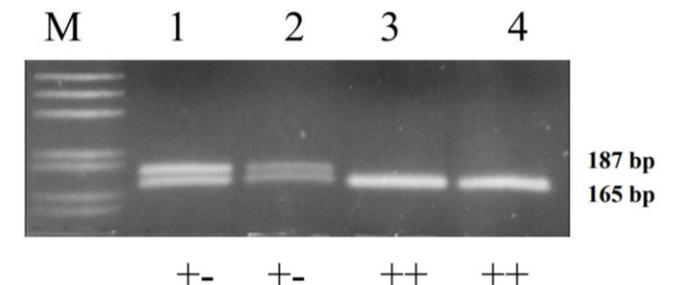
- i primers (inneschi) della PCR vengono disegnati a monte e a valle del sito di restrizione.
- Il segmento di DNA amplificato viene sottoposto a digestione con l'enzima di restrizione e i prodotti della digestione vengono analizzati dopo separazione elettroforetica

# RFLP, FIBROSI CISTICA

- La fibrosi cistica è la malattia genetica grave più diffusa
- La FC rientra infatti nello screening di base delle malattie genetiche
- E' una patologia multiorgano
- Causata da mutazioni del **gene CFTR** (Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator) in omozigosi

# RLFP, fibrosi cistica

- Digestione con enzimi di restrizione di DNA amplificato con PCR; controllo della grandezza dei frammenti su gel
- Analisi della mutazione N1303K (gene CFTR: 4041 C>G)
- la mutazione crea un **sito di restrizione** per l'enzima Ddel (CTNAG), perciò l'enzima taglia il DNA con la mutazione (+ presenza della mutazione; - mutazione assente; M = marcatore di peso molecolare)



# Talassemia

Le talassemie sono un gruppo di malattie ereditarie caratterizzate da anemia cronica di gravità variabile conseguente a un difetto quantitativo nella produzione di emoglobina.

L'emoglobina è costituita da quattro catene proteiche: due alfa (codificate da 4 geni sul cromosoma 16) e due beta (codificate da 2 geni sul cromosoma 11). A seconda di quali catene sono difettose si parla di alfa o beta talassemia.

# Anemia falciforme

L'emoglobina S [HbS,  $\beta(A3)6\text{Glu}\rightarrow\text{Val}$ ] è la più diffusa variante emoglobinica nel mondo e la prima ad essere stata descritta. Dal punto di vista molecolare è caratterizzata da una mutazione puntiforme **GAG** $\rightarrow$ **GTG** del codone 6 del gene  $\beta$ -globinico che comporta la sostituzione in posizione 6 sulla catena  $\beta$  di un residuo di **acido glutammico con uno di valina**. Questa variazione strutturale modifica la carica superficiale dell'emoglobina provocando, in situazioni di deossigenazione, un'interazione idrofobica tra diversi tetrameri emoglobinici che portano alla formazione di polimeri che si ordinano in strutture parallele di fasci di fibre. **La polimerizzazione dell'emoglobina** si associa ad importanti alterazioni della membrana degli eritrociti che diventano meno deformabili e più fragili

# Anemia falciforme

È una beta-talassemia

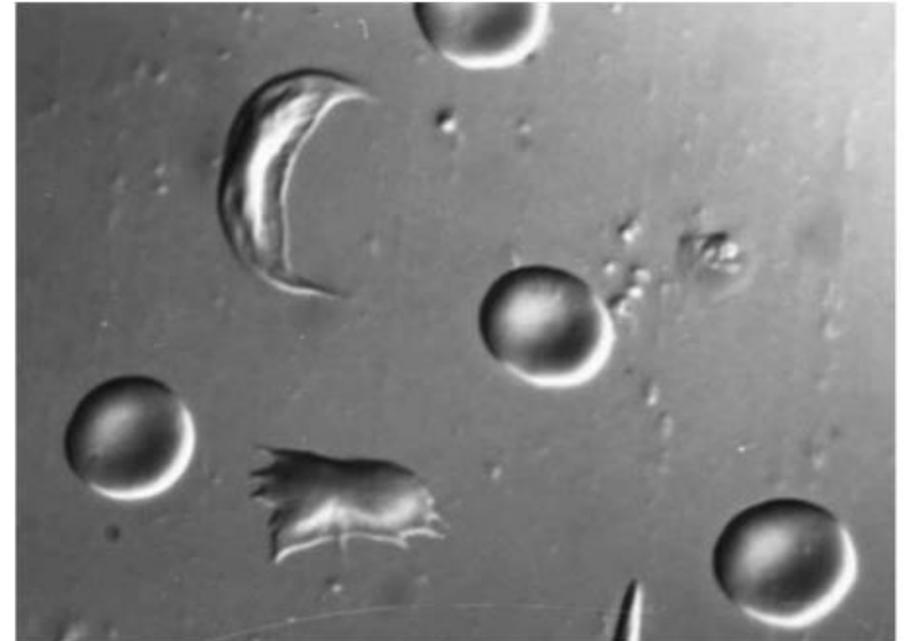
Tecniche elettroforetiche e cromatografiche possono essere impiegate per separare le varianti emoglobiniche.

Tecniche elettroforetiche si differenziano per i supporti utilizzati (gel d'amido, acetato di cellulosa, agar citrato) e per il pH, basico per i primi due (pH 8,6-8,5) e acido (pH 6,2) per il terzo

Le tecniche cromatografiche sono essenzialmente quelle in HPLC, che generalmente utilizzano resine a scambio cationico l'identificazione della HbS si ottiene in base al tempo di ritenzione

# Anemia falciforme

riconoscimento della HbS in un campione di sangue per confermarne la presenza quando compare un picco anomalo nell'analisi HPLC o nel tracciato elettroforetico: la prova di falcizzazione e la prova di solubilità.

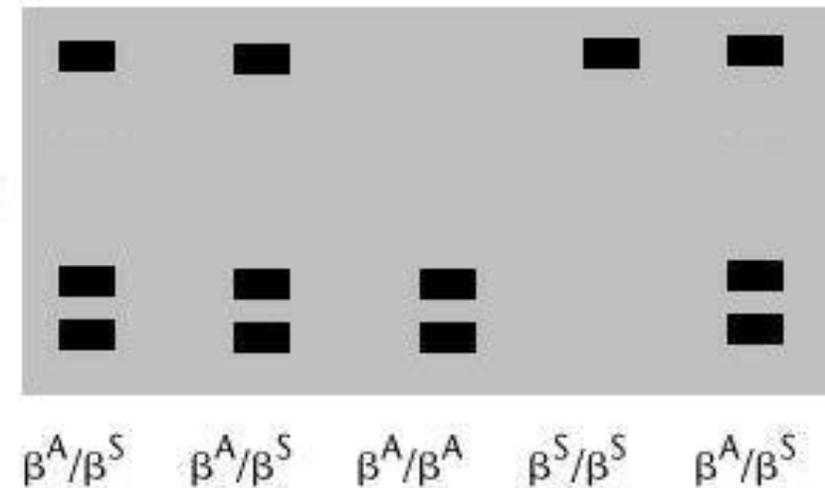
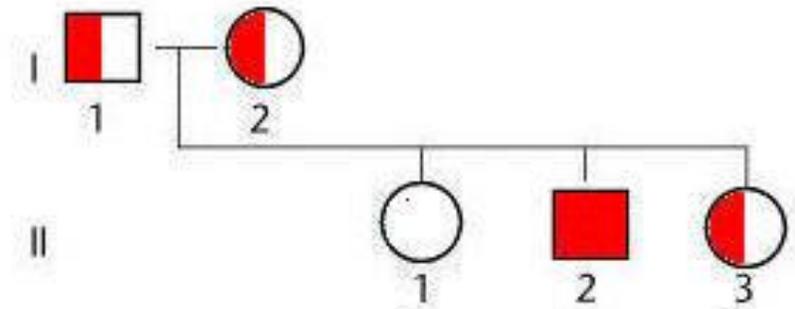
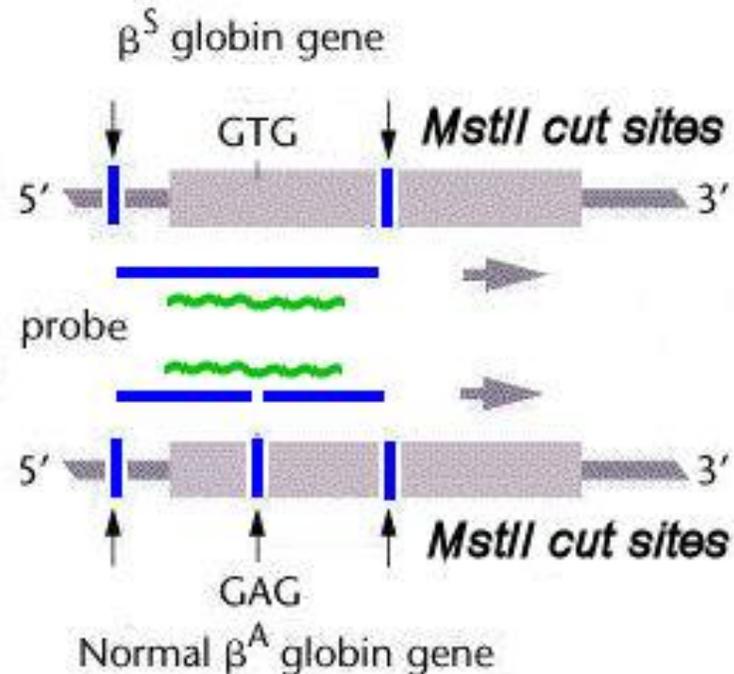


# Anemia falciforme

- La prova di falcizzazione ("sickling test") prevede che un piccolo volume (50-100  $\mu\text{L}$ ) di sangue fresco venga mescolato in una provetta con un volume doppio di una soluzione di sodio ditionito (20 mg/mL) e che 10-20  $\mu\text{L}$  di tale miscela vengano deposti su un vetrino
- Dopo un'incubazione in stufa a 37 °C per circa un'ora, osservando il preparato al microscopio ottico si possono riconoscere le emazie falcizzate
- La prova di solubilità si esegue invece in provetta, diluendo un lisato eritrocitario in un tampone fosfato con saponina, al quale viene successivamente aggiunto sodio metabisolfito. Se è presente Hb mutata (HbS) si forma subito torbidità.

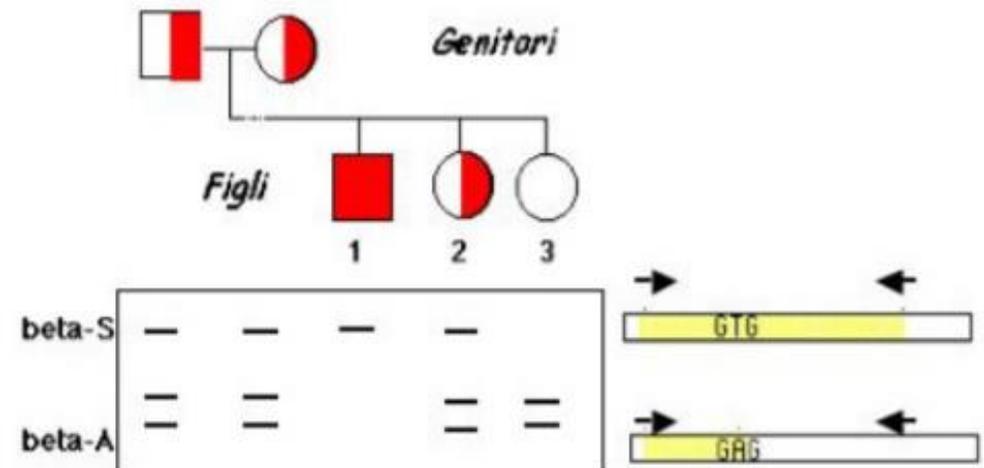
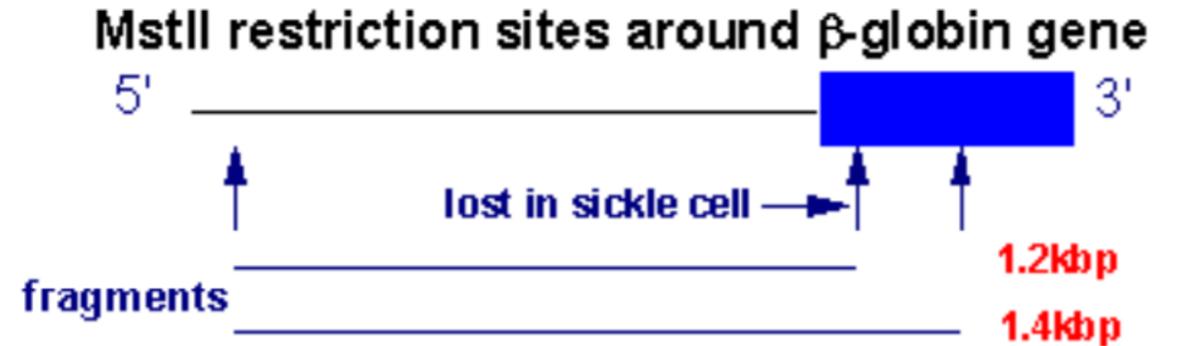
# RLFP, anemia falciforme

Gli individui affetti da anemia falciforme sono **omozigoti per la mutazione HbS**, che consiste nella sostituzione di un singolo amminoacido dei 146 che formano la catena dell'emoglobina. La sostituzione che converte il codone GAG (acido glutammico) nel codone GTG (valina) modifica la sequenza CCTGAGG riconosciuta e tagliata dall'**enzima di restrizione MstII**



# RLFP anemia falciforme

In questo caso specifico, la stessa mutazione che causa la malattia **altera anche un sito di restrizione**. La semplice digestione con l'enzima di restrizione rilevante consente di fare diagnosi diretta di malattia e di riconoscere i portatori

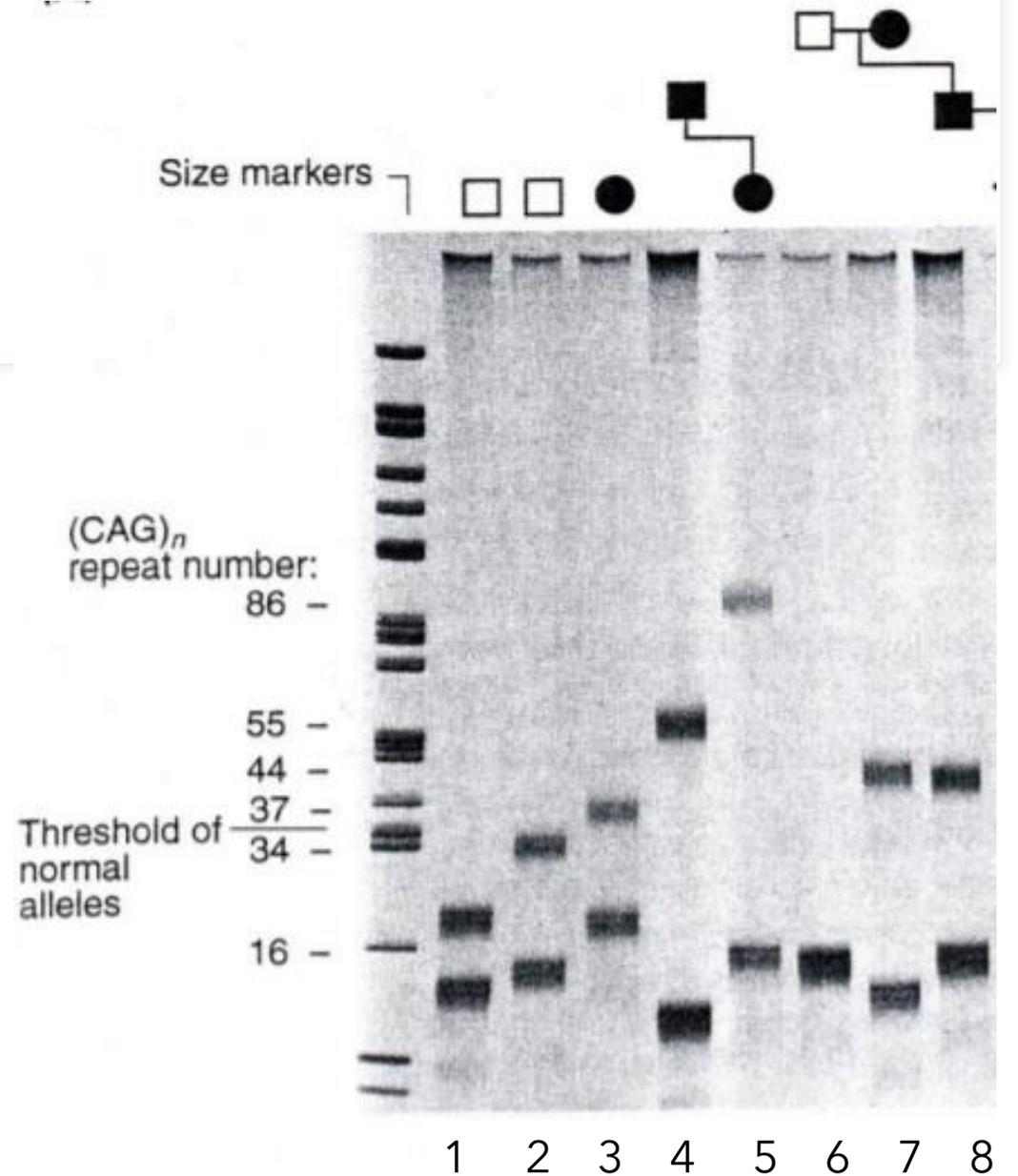


# Corea di Huntington

- La Corea di Huntington (MH) è stata la prima malattia per cui si è trovata una associazione con gene grazie all'uso RFLP
- Malattia neurodegenerativa, autosomica dominante ad esordio tardivo
- Gene responsabile: IT15 cromosoma 4
- C'è mutazione per espansione della tripletta CAG in esone → proteina huntingtina (HTT) con glutammine in eccesso
- Tanto più estesa è la ripetizione CAG, tanto più precoce è l'esordio della malattia
- Sono stati raccolti i campioni di DNA di tutti i possibili componenti delle due famiglie e li hanno analizzati usando sonde polimorfiche che mappavano su diversi cromosomi per trovare gene responsabile

# Corea di Huntington

Il test genetico si basa sulla determinazione del numero di espansione della tripletta (Da 36 in su espansione)



# Mutazioni imprevedibili

- Per differenti mutazioni di un gene (eterogeneità allelica) es emoglobinopatie.
- <https://globin.bx.psu.edu/>
- Server varianti umane emoglobina <https://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/counter> ad oggi 1848
- Sviluppo di chips per rilevamento in parallelo di centinaia di mutazioni note

# Eterogeneità allelica

In casi di eterogeneità allelica il sequenziamento in PCR è ritenuto metodo diretto per l'analisi

Sequenziamento di stampo a singola elica + primers d'innescio in presenza di una quantità di 10-20 volte inferiore di **di-desossinucleotidi** (ddNTP) che non avendo sul 3' Gruppo  $O_2$  funzioneranno da **terminatori**.

I 4 ddNTPs sono marcati con fluorocromi diversi accoppiato con elettroforesi capillare e lettura di fluorescenza si avrà elettroferogramma

# Sequenziamento

Genomico:

Si effettua sequenziamento dei soli esoni e delle sequenze fiancheggianti, non visualizza mutazioni introniche profonde

Trascritto:

Se trascritto è in tessuto di difficile accesso sarà difficile studiare l'mRNA es. cervello

Si possono usare mRNA di citotipo diverso es dai leucociti

Il trascritto ectopico può però dare falsi positive (mutazione si in leucociti, no in tessuto) o falsi negative (mutazione no in leucociti si in tessuto)

# Mutation scanning

Per eterogeneità genica o per geni grandi > 10 esoni non si effettua sequenziamento troppo oneroso ma **mutation scanning**. Prima si identifica se frammento è identico a standard o ha nucleotide diversi. Poi si sequenziano solo i frammenti sospetti.

I frammenti sospetti da poi sequenziare si identificano:

- SSCP single strand conformation polymorphism
- dHPLC denaturing high-performance liquid chromatography

# Mutation scanning

- PCR
- frammentazione
- Caricamento su matrice
- Analisi

# SSCP single strand conformation polymorphism

Discrimina le diverse **conformazioni tridimensionali** che può assumere un frammento di DNA a sigola elica, ottenute dopo una denaturazione a cui segue corsa elettroforetica non denaturante in gel di acrilammide a bassissimo cross-linking (1:200).

La coformazione dell'elica è sequenza specifica, sarà quindi sequenziato frammento con profilo elettroforetico anomalo.

Limite bassa sensibilità, circa 70% per frammenti fino a 400 bp.

## dHPLC denaturing high-performance liquid chromatography

È tecnica di HPLC inversa con fase stazionaria di microsferiche di polistirene di vinilbenzene in grado di legare molecole polari come DNA

Si valutano tempi differenti di eluizione di DNA omoduplex ed eteroduplex.

# SCANNING BY MELTING

Amplificazione

Analisi in alta definizione delle  $T_m$  consente visualizzazione SNPs

