

# Tecnologie biomolecolari nella diagnosi delle neoplasie ginecologiche: dalla PCR alla real time

Andrea Tinelli, Maurizio Pisanò, Sara Leo, Valeria Mezzolla, Stefania Malerba, Claudia Petrelli, Marilena Galante, Fabio Storelli, Giuseppe Leo

Unità Operativa di Ginecologia e Ostetricia, Ospedale Vito Fazzi, ASL Lecce

° Laboratorio di Biologia Molecolare e Oncologia Sperimentale (LB MOS), Ospedale Vito Fazzi, ASL Lecce

## Riassunto

Una neoplasia è caratterizzata da una incontrollata riproduzione cellulare, per una cessazione di risposta ai meccanismi di controllo di proliferazione, in seguito a danni a carico del patrimonio genetico cellulare. Lo studio di tali passaggi prevede l'utilizzo corrente di tecniche di biologia molecolare, attualmente imprescindibile in ogni determinazione clinico-scientifica.

La moderna biologia molecolare si avvale di sistemi di clonazione e di studio genomico degli acidi nucleici messi a punto agli inizi degli anni 80 e via via sviluppati sino ai giorni nostri, sulla scorta di geniali intuizioni e ripetuti tentativi in laboratorio. In questo articolo parleremo della nascita della PCR (Polimerase Chain Reaction), del suo continuo sviluppo sino alla messa a punto della metodica automatizzata della Real Time, delle varie indagini molecolari sul DNA e sull'mRNA, mediante il recupero da frammenti congelati o paraffinati o da sangue o campioni tissutali.

## Parole chiave

Oncologia ginecologica  
DNA  
mRNA  
Biologia molecolare  
Real Time  
Paraffina

## INTRODUZIONE

Il termine "oncologia" deriva dal greco *ónkos* = massa e *logos* = studio ed è quella branca della medicina che si occupa dello studio delle neoplasie. L'oncologia si divide a sua volta in due discipline che hanno caratteristiche diverse ma sono tra loro complementari. L'oncologia sperimentale che individua tutte quelle specialità che studiano i meccanismi molecolari alla base delle neoplasie, e l'oncologia clinica che individua tutte quelle specialità mediche che si occupano della diagnosi e del trattamento terapeutico dei tumori.

Dal punto di vista biologico, un tumore maligno è caratterizzato da una incontrollata riproduzione cellulare, a sua volta determinata da una cessazione di risposta ai meccanismi di controllo di proliferazione, per danni a carico del patrimonio genetico cellulare.

I tumori, nonostante il meccanismo biologico di sviluppo sia unico, possono manifestarsi in molteplici modi; costante è però l'aumento del numero di cellule cancerose, dovuto alla maggiore velocità di riproduzione cellulare, motivo per cui un maggior numero di cellule tumorali si moltiplica ed un minor numero di esse muore, mentre quelle che sopravvivono continuano a moltiplicarsi. La crescita tumorale segue una impostazione geometrica: è molto lenta all'inizio, ma accelera all'aumentare della massa del tumore. La dimensione critica di un tumore è di circa 1

centimetro cubico, raggiunta tale dimensione il tumore inizia a crescere molto velocemente e a dare luogo ai primi sintomi, e diventa diagnosticabile mediante visite mediche ed analisi biochimiche e strumentali. All'anatomia patologica spetta il compito di confermare la natura, il grado di malignità (o grading) e l'estensione (o staging) del tumore, in particolare attraverso l'esame istologico dei tessuti che ormai viene integrato da tecniche molecolari di indagine genomica che scandagliano gli acidi nucleici (DNA ed RNA) e/o si concentrano sullo studio proteomico dell'espressione proteica.

In questo articolo, spiegheremo meglio quali sono le indagini strumentali molecolari più utilizzate in ambito genomico per lo studio delle neoplasie ginecologiche (1-3).

## LA SCOPERTA DELLA PCR NELLA DIAGNOSTICA MOLECOLARE

Nel 1983 Kary Banks Mullis, un biochimico statunitense, risolveva il problema principale della genetica del tempo, cioè quello delle troppo esigue quantità di DNA di cui gli operatori disponevano per effettuare i loro studi sul genoma. I metodi allora esistenti, per aumentare la quantità di DNA, infatti erano lunghi, molto complessi, imprecisi e costosi.

Lo scienziato ispirandosi ai meccanismi di replicazione del DNA, che avvengono nella cellula, per la prima volta parlò di PCR (Polime-

## Summary

### ***Biomolecular Technologies in Gynecological Tumor Diagnosis: from PCR to Real Time***

A tumor is characterized by an uncontrolled cellular reproduction, for a stop in the proliferating control mechanisms, for a DNA damaging in the genomic heritage. The study of such passages foresees the utilization of techniques of molecular biology, currently strictly linked to each scientific and clinical evaluation.

The modern molecular biology avails of cloning systems and of genomic study of nucleic acids, adjusted since the beginning of 80', and successively developed till to our days, basing on genial intuitions and repeating laboratory attempts. In this article, we discuss on the newborn of PCR (Polimerase Chain Reaction), on its developing till to the current automatic method called Real Time, of the various molecular exams on DNA and mRNA, by their recovering in frozen sections or in paraffined tissues or in bloody samples or in tissue collections.

## Keywords

Gynecologic oncology

DNA

mRNA

Molecular biology

Real Time

Paraffine

rase Chain Reaction) e, in una delle più antiche e prestigiose riviste americane di divulgazione scientifica, Scientific American, pubblicò un articolo in cui scriveva: "Iniziando da una singola molecola di DNA, la PCR è in grado di generare 100 bilioni di molecole simili, in un solo pomeriggio. La reazione è semplice da eseguire. Essa richiede solo una provetta, alcuni semplici reagenti e una fonte di calore. Il DNA che si desidera copiare può essere puro, oppure può essere una piccola parte di una miscela estremamente complessa di materiale biologico. Il DNA può provenire da un campione tissutale ospedaliero, può essere prelevato da un singolo capello, da una goccia di sangue essiccato rilevato sulla scena del crimine, può provenire da tessuti cerebrali imbalsamati o da fossili di resti di mammoth congelati nei ghiacciai e risalenti a 40.000 anni fa".

Con queste brevi righe lo scienziato metteva quindi in risalto, non solo l'estrema semplicità della tecnica, ma anche la sua enorme versatilità e molteplicità di impiego. (4)

Il 13 ottobre 1993 la Royal Swedish Academy of Science assegnò il premio Nobel per la Chimica al Dr. Mullis, per la sua invenzione sulla PCR e al Professor Michael Smith per la messa a punto di tecniche di mutagenesi sito specifiche.

È da tale momento che la biologia molecolare ricevette un forte sviluppo, tale da cambiare radicalmente l'approccio allo studio degli acidi nucleici, conclusosi poi con il progetto Genoma Umano (con una non prevista grande accelerazione sui tempi di attuazione).

La possibilità di disporre di quantità virtualmente illimitate di un determinato frammento di DNA, anche nel caso di materiale di partenza estremamente esiguo o danneggiato da processi di degradazione, ha di fatto reso questo procedimento come una delle scoperte più importanti di tutti i tempi nel campo della biologia molecolare.

Dal punto di vista tecnico, la PCR è un processo in vitro che permette, attraverso l'utilizzo di una DNA Polimerasi, l'amplificazione di un target a DNA o anche ad RNA, previa retrotrascrizione in cDNA, utilizzando l'enzima Retrotrascrittasi (RT-PCR). (5-7)

Nelle prime tecniche di amplificazione veniva usata la DNA Polimerasi I di E. Coli, un

enzima di 109 kDa privato però, dei primi 323 amminoacidi posti all'N-terminale. Con un enzima dotato di tale attività infatti, si andava incontro al rischio della degradazione dei primers, quindi è stato preferito andare a modificare tale proteina rimuovendo questa parte cataliticamente scomoda.

Per tale motivo, si è assegnato a questa Polimerasi, il nome di Frammento di Klenow, rappresentando essa, solo una parte (un frammento appunto) dell'intero enzima. Tuttavia un limite importante di questa Polimerasi modificata era la sua termolabilità alle alte temperature raggiunte durante le fasi di denaturazione, che costringeva l'operatore a doverla aggiungere a ogni ciclo e che impediva all'intero metodo di essere duttile (8).

La soluzione a tale problema si ebbe più tardi, con la scoperta, nelle calde acque delle sorgenti geotermiche del Parco Nazionale di Yellowstone (uno dei più grandi ecosistemi intatti della zona temperata presenti sulla Terra, negli USA) di una forma di vita estremofila, un batterio, il *Thermophilus aquaticus*. (4,9).

Nel 1969 due ricercatori, Thomas Brock e Hudson Freeze, che lavoravano per l'Università dell'Indiana, riportarono in letteratura, l'esistenza di questo batterio a cui si interessò in particolar modo Mullis che all'inizio degli anni '80 stava tentando di perfezionare il metodo della PCR.

In quel periodo, Mullis lavorava per la Cetus Corporation, in California, una delle più antiche e importanti compagnie bio-tecnologiche del Mondo; il dr. Mullis intuì che, utilizzando la DNA polimerasi del *Thermophilus aquaticus*, avrebbe potuto evitare di aggiungere a ogni ciclo l'enzima, in quanto, la Taq -nome che fu dato a questa polimerasi - era termostabile e manteneva la sua attività fino a una temperatura massima di 97,5°C per almeno 5-6 minuti. A temperature leggermente più basse, invece, la funzione enzimatica viene conservata per tempi maggiori e più precisamente a temperature di 92°C si osservava un dimezzamento dell'attività catalitica dopo ben 130 minuti, mentre a 95°C dopo 40 minuti. Inoltre l'efficienza dell'enzima, calcolata come numero di nucleotidi incorporati al secondo, aumentava proporzionalmente con la temperatura e mostrava un optimum a 72°C ( con 150 nt/sec): a 55°C si aveva un

efficienza di 24nt/sec, mentre a 70°C di 60nt/sec. (4,10)

Con tali evidenze, Mullis realizzò la possibilità di automatizzare il processo di amplificazione del DNA, riuscendo a coniugare velocità e specificità, in quanto difficilmente le alte temperature consentono la formazione di appaiamenti aspecifici fra gli acidi nucleici. Questo permetteva ai primers di andare a legarsi a regioni specifiche del DNA, che quindi venivano duplicate esponenzialmente a ogni ciclo. (10,11)

### L'UTILITÀ DALLA CLASSICA PCR E LIMITI DELLA TECNICA

Da quanto enunciato, appare evidente che la PCR resta una tecnica molecolare che permette di amplificare selettivamente, mediante una reazione a catena, sequenze di DNA o RNA di interesse clinico, che successivamente possono essere processate in modo diverso in base al tipo di scopo.

La possibilità di automatizzare tale processo mediante l'utilizzo della Taq, ha portato all'ideazione di una macchina programmabile, il termociclatore, grazie alla quale si possono impostare le diverse temperature del processo insieme ad altri parametri (tempo, ramp rate, ect...)(12).

Il processo di amplificazione si articola in tre fasi distinte che avvengono a temperature differenti:

- **Denaturazione (94-95°C):** durante questa fase si ha l'apertura della doppia elica di DNA, quindi il DNA passa da doppio a singolo filamento.
- **Annealing (40-68°C):** la temperatura della fase di annealing può variare e viene calcolata sulla base della temperatura di melting dei primers, che viene chiamata temperatura di dissociazione ed è indicata con "Td". La temperatura di dissociazione equivale alla temperatura alla quale i primers si trovano per il 50% della loro lunghezza, in forma denaturata. Il calcolo che viene eseguito per stabilire la temperatura di annealing, cioè la temperatura alla quale i primers andranno ad appaiarsi con il DNA stampo (o template).
- **Estensione (70-74°C):** a questo punto si attiva la Taq polimerasi che provvede ad allungare la sequenza di DNA a partire dall'estremità 3'-OH dei primers.

Grazie a questa cascata di eventi, tale tecnica appare dunque estremamente versatile e precisa, giacché, a partire anche da una singola molecola di DNA stampo, la PCR è in grado di aumentare esponenzialmente la quantità di acido nucleico. (4,9,12)

Partendo da una singola molecola di DNA doppio strand, alla fine del processo, dopo un numero predefinito di cicli ( $n^{\circ}$  cicli), si ottengono un numero di copie dello stampo pari a  $2n$ .

In questo modo, teoricamente, dopo 20 cicli, da una sola copia se ne sono formate 10<sup>6</sup>, dopo 30 cicli 10<sup>7</sup>, e così via di seguito. Tale andamento esponenziale spiega la grande sensibilità della PCR nella messa in evidenza di quantità anche minime di DNA.

Il numero di cicli impostabili, inoltre, varia a seconda delle necessità e della quantità di partenza del campione di acido nucleico. Un ciclo completo di amplificazione che comprende le tre fasi, di denaturazione, annealing ed estensione, viene ripetuto solitamente da 25 a un massimo di 40 volte. Il limite superiore è imposto da alcuni problemi, che elencheremo di seguito:

- ingombro sterico (che aumenta la probabilità di appaiamenti aspecifici dei primers)
- terminazione dei primers nella mix di reazione
- diminuzione dell'efficienza dell'enzima nel tempo. Inoltre l'accumularsi a ogni ciclo, di gruppi fosfato derivati dai precursori (dNTP), a seguito dell'incorporazione di questi nel neo-filamento è anche un fattore che influisce negativamente sull'attività catalitica dell'enzima che di conseguenza viene inibita.

Da quanto detto appare evidente che è inutile superare i 40 cicli; nel caso in cui sia strettamente necessario disporre di una maggior quantità di prodotto, la maniera corretta di procedere consiste nell'allestire una seconda reazione di PCR partendo dal primo amplificato (4,13-15).

### EVOLUZIONE DELLA PCR CLASSICA NELLA ATTUALE METODICA DI UTILIZZO

Il metodo proposto da Mullis, per superare i limiti della classica PCR ha rivoluzionato, la biologia molecolare e la genetica, non solo per la sua estrema utilità e sensibilità, ma an-

che per la sua semplicità di realizzazione, considerando il numero limitato di reagenti e di strumentazione richiesta.

La miscela di reazione deve contenere soltanto:

- DNA target, rappresentato da molecole di DNA, cDNA, o da frammenti di questi che fanno da stampo per l'enzima. L'estratto di DNA può essere lineare o circolare, mono o bicatenario, integro o degradato.
  - Primers (forward e reverse), cioè coppie di sequenze oligonucleotidiche ottenute per sintesi chimica e disegnate in modo tale da legarsi specificamente al template delimitando la zona di interesse da amplificare. Ogni coppia di primers ha le sue concentrazioni e condizioni ottimali di reazione, da determinare di volta in volta sperimentalmente ai fini della messa a punto di un protocollo di lavoro definitivo. Il disegno dei primers, oltre a essere deciso sulla base dell'importanza clinico-diagnostica del tratto di DNA che si vuole amplificare, deve anche tener conto di altri parametri come la lunghezza e la composizione in basi. Primers che superino di molto i 16nt di ampiezza o che contengano tratti di sequenze complementari alle due estremità, possono formare strutture secondarie abbastanza stabili causate da appaiamenti intramolecolari che diminuirebbero di conseguenza, la loro capacità di legarsi al template, quindi l'efficienza della reazione.
  - Desossiribonucleotidi, i "mattoni" con i quali la polimerasi costruisce ex novo, partendo dal primer e scorrendo lungo il target, nuove sequenze nucleotidiche.
  - DNA polimerasi; è importante ricordare che oltre alla Taq, sono oggi disponibili diverse Polimerasi termostabili (estratte da altri microrganismi termofili) solitamente ingegnerizzate per migliorarne le performances.
  - Soluzione tampone per PCR, costituita da KCl, Tris-HCl e MgCl<sub>2</sub> in concentrazioni diverse in relazione al protocollo sperimentale. Molto importante è la concentrazione dello ione magnesio che va ottimizzata in relazione alla presenza di agenti chelanti (EDTA) e di ioni carichi negativamente.
- Con questi accorgimenti Mullis poteva disporre, con la PCR, in non più di tre ore, di notevoli quantità di DNA, da sfruttare per offrire importanti informazioni diagnostiche e

di studio (4,9-12).

Usando primer specifici egli poteva identificare la presenza di un virus o di batteri, anche in quei pazienti in cui non si era ancora espressa una risposta immunitaria. (16,17)

Con la PCR si possono attualmente identificare inoltre mutazioni a carico di alcuni geni per il controllo della crescita cellulare, e quindi implicati nell'insorgenza dei tumori (18-22).

L'analisi di sangue e di campioni di spermatozoi attraverso la PCR può fornire informazioni in casi di aggressioni e violenze carnali; inoltre, tale metodica, permette l'analisi e la ricostruzione del DNA prelevato da campioni antichi, amplificandone i rari frammenti sopravvissuti (10,23).

### NASCITA DEI SISTEMI REAL TIME

Arrivati a questo punto, è necessario specificare, che come tutte le tecniche sperimentali innovative, anche la PCR è andata incontro a un processo di evoluzione che permette oggi di distinguere fra PCR classica e sistemi Real Time.

La differenza fra le due tecniche è nel metodo adottato per la rilevazione, che nel primo caso viene effettuata recuperando l'amplificato al termine della PCR (appunto per questo, la PCR classica viene anche chiamata PCR all'end point) (4,24).

Quindi, gli amplimeri vengono fatti correre all'interno di un gel per elettroforesi di agarosio o di poliacrilammide (PAGE) in base al tipo di definizione che si vuole ottenere.

È possibile di conseguenza, fare analisi qualitative e quantitative del prodotto riservando uno o più pozzetti del gel per il caricamento di controlli, che possano essere da riferimento per stabilire la lunghezza dei frammenti amplificati e indicativamente la loro concentrazione (25).

Nel sistema Real Time l'analisi quantitativa avviene già durante il processo di amplificazione e viene direttamente rilevata da un software, in quanto il Light Cycler è collegato a un computer, che permette all'operatore di visualizzare l'andamento della reazione sullo schermo (26).

L'analisi quantitativa è estremamente precisa e al termine del processo di amplificazione il sistema calcola la temperatura di melting dell'amplimero, cioè quella temperatura alla qua-

le il frammento di DNA amplificato è per il 50% della sua lunghezza denaturato.

La temperatura di melting è una misura importante in quanto permette di fare l'analisi qualitativa del prodotto di amplificazione e l'utilizzo dell'HRMM, si basa proprio sull'elaborazione fine di questo parametro.

La possibilità di disporre già durante il processo di amplificazione, di informazioni quantitative, è data su un dispositivo di rilevazione della fluorescenza, che viene emessa da opportuni fluorofori, che vengono aggiunti alla miscela di reazione (27,28).

Per meglio chiarire quanto detto sul sistema di rilevazione è bene approfondire le caratteristiche dei fluorofori utilizzati nei sistemi Real Time, considerando vari aspetti, tra cui accuratezza e costi, cercando magari di evidenziare nell'HRMM il giusto compromesso tra l'alta risoluzione dell'informazione data e il risparmio economico.

### REAL TIME CON LA SYBR GREEN

Si tratta di un noto colorante fluorescente utilizzato nella biologia molecolare per vari scopi, quali identificazione delle bande di DNA nella gel elettroforesi, analisi quantitative di DNA in soluzione e nella Real Time viene impiegato per seguire le reazioni di amplificazione.

Si tratta di un composto organico aromatico facente parte del gruppo delle canine asimmetriche, molecole dotate di attività fluorofora.

Per le sue caratteristiche il SYBR GREEN è un colorante aspecifico simile all'etidio bromuro, ma presenta una sensibilità nella rilevazione, 25 volte maggiore rispetto all'etidio bromuro e si pensa sia meno pericoloso rispetto a quest'ultimo, che viene indicato come potente mutageno.

Ufficialmente, il SYBR GREEN viene considerato "non pericoloso", ma in virtù dell'elevata affinità con la quale lega il DNA occorre comunque prestare attenzione quando lo si maneggia, evitando assolutamente il diretto contatto con la pelle.

Un'altra caratteristica, che lo rende privilegiato rispetto al suo predecessore etidio bromuro, deriva dal fatto che la sua presenza nel DNA non impedisce l'attività di numerosi enzimi, tra cui quelli di restrizione, le ligasi e le DNA polimerasi, né impedisce il trasferimen-

to dell'acido nucleico a membrane per ibridizzazioni (Southern Blot) se viene aggiunto 0,1%-0,3% di SDS nei buffer di ibridizzazione; inoltre tale molecola è membrana-permeabile, cioè in grado di entrare in cellule ancora in vita.

Il SYBR GREEN si intercala nel DNA, preferibilmente quando questo si trova nella sua forma a doppio strand e quindi non è molto adatto per quantizzazioni di RNA o altro DNA contaminante a singolo filamento (primers, dNTP derivanti da PCR).

Una volta inseritosi all'interno della doppia elica si viene così a formare il complesso SYBR GREEN-DNA, che presenta un massimo picco di assorbimento nel blu, a 488 nm. Segue un decadimento radioattivo con emissione di luce nel verde, e più precisamente con un picco massimo a 522 nm. Altri picchi di assorbimento, sebbene più deboli, si trovano nella regione dell'ultravioletto ( $\lambda = 284$  nm e 382 nm).

Oltre al SYBR Green originale, sono stati sviluppati altri fluorofori simili leganti gli acidi nucleici, tra cui:

- SYBR Green II (lega preferenzialmente DNA a singolo filamento e RNA); ha caratteristiche simili al SYBR Green I ma ha un picco di assorbimento a 497 nm)
- SYBR Gold
- SYBR Safe (4,29)

### REAL TIME CON LA HRMM

HRMM (High Resolution Melting Master 480) è un prodotto che, mediante l'utilizzo del nuovo sistema denominato LightCycler 480 real-time PCR, permette di ottenere curve di melting estremamente accurate, tali da consentire l'individuazione di polimorfismi a singolo nucleotide (Single Nucleotide Polymorphisms, o "snips"), cioè variazioni puntiformi della sequenza.

Più precisamente l'HRMM è un fluoroforo che lega il DNA nella sua forma a doppio strand, e appartiene a una nuova famiglia di intercalanti, che legano il template saturandolo, cioè inserendosi base-base lungo la sequenza del DNA.

La formula chimica di questo intercalante, così come le sue caratteristiche chimico-fisiche, sono attualmente un segreto industriale. La differenza con i fluorofori tradizionalmente in uso, come SYBR GREEN ed Etidio Bromu-

ro, è che questi si inseriscono in maniera random e non saturante nella doppia elica. Grazie a questa sua caratteristica saturante, rispetto ai suoi predecessori, l'HRMM è in grado di rilevare la presenza di eteroduplex che si formano durante la PCR (per es. se il campione è un eterozigote per una particolare mutazione).

L'intercalante può essere utilizzato a elevate concentrazioni in quanto non interferisce con il funzionamento della polimerasi.

Fino ad oggi questa nuova generazione di fluorofori è stata testata per svariati scopi, ottenendo ottimi risultati seppur con qualche limitazione, che sarà approfondita più avanti (30,31).

### INDAGINI MOLECOLARI SU ACIDI NUCLEICI

Il primo passo verso l'indagine molecolare sugli acidi nucleici parte dall'estrazione e dalla purificazione di questi dal campione, che viene eseguita facendo uso di enzimi proteolitici e solventi organici (10).

Solitamente i campioni che giungono al laboratorio sono prelievi di sangue, sia midollare che periferico (questo naturalmente dipende dal tipo di ricerca che si sta conducendo), scraping superficiali (ad esempio di cer-vice uterina o vulva), e tessuti di vario tipo (32-35), che prima di essere sottoposti al protocollo di estrazione del DNA, vanno incontro a un trattamento preliminare più o meno lungo, in base alle necessità imposte dalle caratteristiche del tessuto stesso o a eventuali trattamenti precedenti del tessuto che, per esempio, può essere stato incluso in paraffina per esame istologico (36).

Illustreremo, dunque, i vari protocolli adottati in base al tipo di campione da analizzare.

### RECUPERO DI DNA DA TESSUTI INCLUSI IN PARAFFINA E DEPOSITI SU VETRINO

La paraffina è un materiale ceroso, quindi insolubile in acqua, è costituita da una miscela di idrocarburi a catena lunga e solidi a temperatura ambiente.

Tale composizione la rende particolarmente resistente all'attacco di solventi chimici acidi e spesso viene utilizzata per includere tessuti biologici in modo tale da ottenere, mediante taglio al microtomo, sottilissimi strati di tes-

suto che vengono depositati su vetrini e, previa colorazione, osservati al microscopio per indagini istologiche.

Occorre innanzi tutto rimuovere, con vari procedimenti, tale componente dal campione: questo è reso possibile solo mediante l'utilizzo di solventi organici date le caratteristiche chimico-fisiche della paraffina.

### RECUPERO DI DNA DA TESSUTI CONGELATI

Fra i campioni pervenuti al laboratorio di biologia molecolare, alcuni consistono di biopsie di tessuti neoplastici generalmente asportati a seguito di intervento chirurgico o biopsia.

I campioni vengono subito processati, oppure dopo conservazione a  $-80^{\circ}\text{C}$ , per ritardare ovviamente i processi di degradazione. Il prelievo del campione per la diagnosi molecolare è effettuato in area neoplastica, evitando per quanto possibile, zone necrotiche o componenti tissutali normali.

La massa tumorale si presenta frequentemente come un tessuto eterogeneo: accanto ad aree carcinomatose, possono essere presenti aree di necrosi, aree flogistiche e componenti tissutali normali. La possibilità di individuare mutazioni geniche, naturalmente risente molto della percentuale di cellule mutate nel campione e quindi delle caratteristiche dell'area di tessuto destinata all'analisi molecolare.

Tali caratteristiche prima dell'estrazione del DNA, devono essere accuratamente valutate: una volta individuata l'area esatta da sottoporre ad analisi, questa è sminuzzata con bisturi monouso fino a farle assumere la consistenza di un omogenato.

Seguono i vari passaggi qui sotto elencati:

- un volume pari a circa  $50\ \mu\text{l}$  dell'omogenato ottenuto è trasferito in sarsted da  $1,5\ \text{ml}$ , al quale si aggiungono  $100\ \mu\text{l}$  di soluzione di lisi e  $4\ \mu\text{l}$  di proteasi, per favorire l'ulteriore lisi del tessuto e la proteolisi delle deossiribonucleasi lisosomiali, che si liberano durante il trattamento.
- il campione è quindi incubato in termoblock a  $55^{\circ}\text{C}$  per 3 ore e successivamente trasferito in stufa a  $37^{\circ}\text{C}$  overnight. Alcuni campioni richiedono un tempo maggiore di incubazione, della durata anche di due o di tre giorni. A distanza di tempo è ne-

cessario andare ad aggiungere nuova soluzione di lisi e proteasi, a causa dell'inattivazione di quella messa precedentemente.

- una volta ottenuta la completa liquefazione del tessuto si può procedere alla fase successiva, che prevede l'inattivazione della proteasi mediante denaturazione a  $95^{\circ}\text{C}$  per 10 minuti. Questo è importante, in quanto, lo scopo finale è quello di andare a effettuare un'amplificazione utilizzando, ad esempio, l'HRMM e questo comporta l'utilizzo della Taq Polimerasi, che altrimenti, verrebbe degradata dalla proteasi al momento dell'allestimento dei capillari per la reazione.
- il campione, a questo punto, dopo opportuni lavaggi con acqua, è conservato a  $-20^{\circ}\text{C}$  (11-15,37).

### RECUPERO DEL DNA DA CAMPIONI DI SANGUE

I campioni di sangue sono generalmente utili per diagnosticare la presenza di mutazioni genetiche nel paziente o di anomalie biomolecolari determinate dalle metastasi.

Il sangue pervenuto in laboratorio viene trasferito all'interno di provette Vacutainer da  $4\ \text{ml}$  contenenti l'anticoagulante sodio-eparina e un gel (a base di ficoll) che funge da mezzo di separazione delle diverse popolazioni di cellule in base alla loro densità.

La tecnica adottata per isolare le cellule è la centrifugazione isopicnica in gradiente di densità, dove il gradiente preformato è rappresentato da un gel. Dopo una centrifugazione a  $3100\ \text{rpm}$  per 21 minuti, gli eritrociti agglutinati e i granulociti si troveranno al di sotto del gel, mentre le cellule mononucleate (monociti, linfociti e altre cellule) si posizioneranno al di sopra di esso.

Il plasma sovrastante viene aspirato e allontanato fino a giungere in prossimità dell'anello linfocitario che appare come una nuvoletta bianca sospesa all'interno del mezzo al di sopra del gel, che quindi deve essere recuperato in una sarsted da  $1,5\ \text{ml}$ . Seguono una serie di lavaggi con acqua.

Il campione di cellule viene conservato a  $-2^{\circ}\text{C}$  nell'attesa di essere processato (13,38,39).

### CONCLUSIONI

Da quanto detto appare chiaro che la moderna biologia molecolare si avvale di sistemi

estremamente sofisticati e automatizzati, dotati di complessi software e di materiali delicati e complessi. Sin dalle origini, i ricercatori che si sono avvalsi della biologia molecolare nello studio dei tumori, si sono dovuti confrontare con notevoli complessità e difficoltà nella messa a punto delle tecniche. Dopo anni di sperimentazioni e tentativi, si è poi giunti, finalmente, alla nascita della PCR, che, dopo notevoli e progressivi perfezionamenti, si è trasformata nella moderna macchina replicante quale è. Da tale scoperta si poi passati alla nascita della Real Time, in cui il processo di amplificazione viene direttamente rilevato da un computer che permette all'operatore di visualizzare l'andamento della reazione sullo schermo, con estrema precisione.

Entrambe i metodi permettono di disporre di notevoli quantità di DNA tumorale, da sfruttare per scopi diagnostici e di studio, quali, ad esempio, l'identificazione di mutazioni geniche implicate nel controllo della crescita cellulare e, quindi, nell'insorgenza tumorale. Al giorno d'oggi non è pensabile ipotizzare lo studio dei tumori senza la presenza di questi presidi biomolecolari, che permettono l'identificazione di situazioni gnomiche non altrimenti individuabili in altro modo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Tinelli A, Leo G, Pisanò M, Mezzolla V, Storelli F, Montinari MR, Malvasi A. Utilizzo dell'instabilità dei microsattelliti (msi) come markers genomico nel carcinoma endometriale: evidenze scientifiche. *Italian Journal of Gynaecology and Obstetrics* 2009, 21: N. 1: 49-61
2. Tinelli A, Vergara D, Martignago R, Leo G, Malvasi A, Tinelli R. Hormonal carcinogenesis and sociobiological development factors in endometrial cancer: a clinical review. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2008; 87:1101-1113
3. Tinelli A, Vergara D, Martignago R, Leo G, Pisanò M, Malvasi A. An outlook on ovarian cancer and borderline ovarian tumors: focus on genomic and proteomic findings. *Current Genomics*, July 2009 (in press)
4. Dujols V, Kusakawa N, McKinney JT, Dobrowolsky SF, Wittwer CT. High-resolution melting analysis for scanning and genotyping. In: Tefvik D. *Real Time PCR*. Informa Healthcare-Taylor and Francis Editor, Abingdon, UK, 2006
5. Jost R, Berkowitz O, Masle J. Magnetic quantitative reverse transcription PCR: a high-throughput method for mRNA extraction and quantitative reverse transcription PCR. *Biotechniques*. 2007 Aug;43(2):206-11
6. Gullicksen PS, Dean RG, Baile CA. Detection of DNA fragmentation and apoptotic proteins, and quantification of uncoupling protein expression by real-time RT-PCR in adipose tissue. *J Biochem Biophys Methods*. 2004 Jan 30;58(1):1-13
7. Levesque-Sergerie JP, Duquette M, Thibault C, Delbecchi L, Bissonnette N. Detection limits of several commercial reverse transcriptase enzymes: impact on the low- and high-abundance transcript levels assessed by quantitative RT-PCR. *BMC Mol Biol*. 2007 Oct 22;8:93
8. Wang C, Kim T, Gao D, Vaglenov A, Kaltenboeck B. Rapid high-yield mRNA extraction for reverse-transcription PCR. *J Biochem Biophys Methods*. 2007 Apr 10;70(3):507-9
9. VanGuilder HD, Vrana KE, Freeman WM. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques*. 2008 Apr;44(5):619-26
10. Alvarez M, Juusola J, Ballantyne J. An mRNA and DNA co-isolation method for forensic casework samples. *Anal Biochem*. 2004 Dec 15;335(2):289-98
11. Martin I, Frank O. Real-time quantitative rt-PCR assays. *Methods Mol Biol*. 2004;238:231-8
12. Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc*. 2006;1(3):1559-82
13. Reed GH, Wittwer CT. Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. *Clin Chem*. 2004;50:1748-54
14. Takano EA, Mitchell G et al. Rapid detection of carriers with BRCA1 and BRCA2 mutations using high resolution melting analysis. *BMC Cancer* 2008;8(1):59
15. Margraf RL, Mao R et al. Rapid Diagnosis of MEN2B Using Unlabeled Probe Melting Analysis and the LightCycler 480 Instrument. *J Mol Diagn* 2008;10(2): 123-8
16. Varani S, Stanzani M, Paolucci M, Melchionda F, Castellani G, Nardi L, Landini MP, Baccarani M, Pession A, Sambri V. Diagnosis of bloodstream infections in immunocompromised patients by real-time PCR. *J Infect*. 2009 May;58(5):346-51
17. Kasai M, Harrington SM, Francesconi A, Petraitis V, Petraitiene R, Beveridge MG, Knudsen T, Milanovich J et al. Detection of a molecular biomarker for zygomycetes by quantitative PCR assays of plasma, bronchoalveolar lavage, and lung tissue in a rabbit model of experimental pulmonary zygomycosis. *J Clin Microbiol*. 2008 Nov;46(11):3690-702
18. Catarino R, Ferreira MM, Rodrigues H, Coelho A, Nogal A, Sousa A, Medeiros R. Quantification of free circulating tumor DNA as a diagnostic marker for breast cancer. *DNA Cell Biol*. 2008 Aug;27(8):415-21
19. Resnick KE, Alder H, Hagan JP, Richardson DL, Croce CM, Cohn DE. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecol Oncol*. 2009 Jan;112(1):55-9
20. Wu W, Lin Z, Zhuang Z, Liang X. Expression profile of mammalian microRNAs in endometrioid adenocarcinoma. *Eur J Cancer Prev*. 2009 Feb;18(1):50-5
21. Du XL, Jiang T, Wen ZQ, Li QS, Gao R, Wang F. Differential expression profiling of gene response to ionizing radiation in two endometrial cancer cell lines with distinct radiosensitivities. *Oncol Rep*. 2009 Mar;21(3):625-34
22. Li J, Makrigiorgos GM. COLD-PCR: a new platform for highly improved mutation detection in cancer and genetic testing. *Biochem Soc Trans*. 2009 Apr;37(Pt 2):427-32
23. Picchiassi E, Coata G, Fanetti A, Centra M, Pennacchi L, Di Renzo GC. The best approach for early prediction of fetal gender by using free fetal DNA from maternal plasma. *Prenat Diagn*. 2008 Jun;28(6):525-30
24. Guan H, Yang K. RNA isolation and real-time quantitative RT-PCR. *Methods Mol Biol*. 2008;456:259-70
25. Bödör C, Schmidt O, Csernus B, Rajnai H, Szende B. DNA and RNA isolated from tissues processed by microwave-accelerated apparatus MFX-800-3 are suitable for subsequent PCR and Q-RT-PCR amplification. *Pathol Oncol Res*. 2007;13(2):149-52
26. Lyon E, Wittwer CT. LightCycler technology in molecular diagnostics. *J Mol Diagn*. 2009 Mar;11(2):93-101
27. Sieuwerts AM, Kraan J, Bolt-de Vries J, van der Spoel P, Mostert B, Martens JW, Gra-

- tama JW, Sleijfer S, Foekens JA. Molecular characterization of circulating tumor cells in large quantities of contaminating leukocytes by a multiplex real-time PCR. *Breast Cancer Res Treat.* 2008 Dec 30
28. Sevestre H, Mention J, Lefebvre JF, Eb F, Hamdad F. Assessment of Chlamydia trachomatis infection by Cobas Amplicor PCR and in-house LightCycler assays using PreservCyt and 2-SP media in voluntary legal abortions. *J Med Microbiol.* 2009 Jan;58(Pt 1):59-64
29. Huang GL, Zhang XH, Guo GL, Huang KT, Yang KY, Shen X, You J, Hu XQ. Clinical significance of miR-21 expression in breast cancer: SYBR-Green I-based real-time RT-PCR study of invasive ductal carcinoma. *Oncol Rep.* 2009 Mar;21(3):673-9
30. Bengtsson M, Hemberg M, Rorsman P, Ståhlberg A. Quantification of mRNA in single cells and modelling of RT-qPCR induced noise. *BMC Mol Biol.* 2008 Jul 17;9:63
31. Ball TB, Plummer FA, HayGlass KT. Improved mRNA quantitation in LightCycler RT-PCR. *Int Arch Allergy Immunol.* 2003 Jan;130(1):82-6.
32. Purwosunu Y, Sekizawa A, Okai T. Detection and quantification of fetal DNA in maternal plasma by using LightCycler technology. *Methods Mol Biol.* 2008;444:231-8
33. Lee JW, Choi CH, Choi JJ, Park YA, Kim SJ, Hwang SY, Kim WY, Kim TJ, Lee JH, Kim BG, Bae DS. Altered MicroRNA expression in cervical carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2008 May 1;14(9):2535-42
34. Lattuada D, Colleoni F, Martinelli A, Garretto A, Magni R, Radaelli T, Cetin I. Higher mitochondrial DNA content in human IUGR placenta. *Placenta.* 2008 Dec;29(12):1029-33
35. Jacobsson B, Aaltonen R, Rantakokko-Jalava K, Morken NH, Alanen A. Quantification of *Ureaplasma urealyticum* DNA in the amniotic fluid from patients in PTL and pPROM and its relation to inflammatory cytokine levels. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2009;88(1):63-70
36. Witchell J, Varshney D, Gajjar T, Wangoo A, Goyal M. RNA isolation and quantitative PCR from HOPE- and formalin-fixed bovine lymph node tissues. *Pathol Res Pract.* 2008;204(2):105-11
37. Li J, Wang L, Jänne PA, Makrigiorgos GM. Coamplification at lower denaturation temperature-PCR increases mutation-detection selectivity of TaqMan-based real-time PCR. *Clin Chem.* 2009 Apr;55(4):748-56
38. Smith GD, Chadwick BE, et al. Detection of epidermal growth factor receptor gene mutations in cytology specimens from patients with non-small cell lung cancer utilising high-resolution melting amplicon analysis. *J Clin Pathol* 2008;61(4): 487-93
39. Kang BY, Tsoi S, Zhu S, Su S, Kay HH. Differential gene expression profiling in HELLP syndrome placentas. *Reprod Sci.* 2008 Apr;15(3):285-94