



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE  
FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA

---

Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico

**DIAGNOSI SU DNA CON TEST ARRAY-CGH**

Relatore: Dott.  
GIANCARLO DISCEPOLI

Tesi di Laurea di:  
SARA SCREPANTI

A.A. 2019/2020

## Indice

|                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------|----|
| <b>1. INTRODUZIONE</b> .....                                 | 1  |
| Le Malattie Genetiche.....                                   | 1  |
| Come ricercare le cause delle malattie genetiche. ....       | 1  |
| Il Cariotipo Convenzionale e le patologie cromosomiche ..... | 1  |
| La FISH e le alterazioni subcromosomiche .....               | 5  |
| L'Array-CGH, indagine genomica ad alta risoluzione .....     | 7  |
| Genoma: organizzazione, variabilità e CNVs.....              | 10 |
| L'Analisi di Sequenza e le patologie monogeniche.....        | 13 |
| <b>2. SCOPO DELLA TESI</b> .....                             | 17 |
| <b>3. MATERIALI E METODI</b> .....                           | 18 |
| Casi valutati .....                                          | 18 |
| La tecnica Array-CGH.....                                    | 19 |
| Fase preanalitica.....                                       | 19 |
| Estrazione del DNA .....                                     | 19 |
| Misurazione del DNA .....                                    | 21 |
| Elettroforesi su gel .....                                   | 22 |
| Fase analitica.....                                          | 24 |
| Pretrattamento al calore e marcatura.....                    | 24 |
| Purificazione e combinazione .....                           | 25 |
| Ibridazione e lavaggi.....                                   | 27 |
| Fase di acquisizione .....                                   | 29 |
| Scansione, acquisizione ed elaborazione dei dati .....       | 29 |
| Parametri di valutazione dei risultati.....                  | 30 |
| Analisi delle CNVs .....                                     | 32 |
| Analisi genetico-molecolare per Fibrosi Cistica .....        | 34 |
| <b>4. RISULTATI E DISCUSSIONE</b> .....                      | 39 |
| Aspetti tecnici .....                                        | 39 |
| Aspetti clinici generali .....                               | 41 |
| Osservazioni sui casi positivi e incerti .....               | 42 |
| Osservazioni sui casi negativi .....                         | 46 |
| <b>5. CONCLUSIONI</b> .....                                  | 47 |
| <b>6. BIBLIOGRAFIA</b> .....                                 | 49 |
| <b>7. RINGRAZIAMENTI</b> .....                               | 51 |

# 1. INTRODUZIONE

## Le Malattie Genetiche

Le malattie genetiche sono patologie causate da alterazioni del genoma di un individuo e possono essere classificate in base al tipo di alterazione genetica che si verifica. Una classificazione piuttosto semplice prevede le seguenti categorie:

- Patologie cromosomiche, in cui l'alterazione è macroscopica ed interessa i cromosomi.
- Patologie monogeniche a eredità mendeliana, le quali dipendono da un singolo gene e possono essere trasmesse di generazione in generazione, così come aveva dimostrato con diversi esperimenti il biologo Gregor Mendel con lo studio di caratteri monogenici.
- Patologie genetiche a eredità non mendeliana, che a differenza delle precedenti hanno un comportamento non regolare dal punto di vista della trasmissione da un individuo all'altro e da una generazione alla successiva.
- Patologie mitocondriali. Si ricordi che all'interno dei mitocondri si trova un DNA che codifica per una trentina di proteine e che in quanto tale può essere caratterizzato anch'esso da mutazioni e/o alterazioni.
- Patologie multifattoriali, la cui causa può derivare dall'alterata attività di più geni, e che possono anche essere influenzate da fattori ambientali.

## Come ricercare le cause delle malattie genetiche.

Le diverse classi di patologie genetiche necessitano di strumenti di indagine differenti che vengono riassunti nelle pagine seguenti.

## Il Cariotipo Convenzionale e le patologie cromosomiche

L'analisi citogenetica classica nasce negli anni '60 come strumento di studio dei cromosomi cellulari e delle patologie ad essi correlate. Le tecniche di bandeggio,

proprie di questa analisi, hanno infatti permesso l'identificazione di ogni singolo cromosoma che ha portato alla realizzazione del cariotipo umano o cariogramma.

Il cariotipo è definito come la sistemazione ordinata di tutti i cromosomi, i quali sono ottenuti in seguito all'esecuzione di preparati cromosomici in metafase. Infatti una volta ottenute le metafasi, ogni cromosoma viene individuato, esaminato e accoppiato al suo cromosoma omologo tenendo conto di determinate caratteristiche come lunghezza e posizione del centromero, in accordo con la classificazione di Denver, (Congresso di Genetica Umana, Colorado, 1960). Successivamente le coppie di cromosomi vengono disposte in ordine crescente dall'1 al 22, aggiungendo infine anche i cromosomi sessuali.

I cromosomi sono strutture costituite da DNA e proteine e nella loro forma condensata acquistano una forma generica ad *X*. Sono localizzati all'interno del nucleo della cellula e in essi sono contenute tutte le informazioni genetiche necessarie allo sviluppo di un organismo.

In un cariotipo normale di un individuo sano, troviamo in totale 46 cromosomi: 23 di origine materna e 23 di origine paterna. Questa normalità viene espressa attraverso la seguente formula: *46,XY* o *46,XX*. Nel primo caso si evince che il soggetto è un individuo di sesso maschile e possiede 44 cromosomi detti *autosomi* a cui si aggiunge una coppia di cromosomi sessuali *X* e *Y*, quest'ultimo responsabile del differenziamento verso il sesso maschile. Il sesso femminile, invece, viene conferito dalla coppia cromosomica *XX*.

----

Per circa 50 anni è stato impiegato il Cariotipo Convenzionale come strumento di individuazione delle patologie cromosomiche. L'analisi cromosomica può essere condotta su cellule in metafase che possono essere ottenute da diversi campioni. Infatti la procedura per la realizzazione di un cariotipo standard, dà la possibilità di utilizzare campioni di sangue periferico venoso, campioni di liquido amniotico e campioni di villi coriali. Il sangue periferico venoso è necessario per espletare una diagnosi post natale, mentre il liquido amniotico e i villi coriali permettono di eseguire delle indagini prenatali con l'obiettivo, qualora ci fosse necessità, di installare una terapia, che può avvenire sia in utero o programmata appena si sarà svolto il parto.

L'ottenimento di un cariotipo costituzionale si articola su diverse fasi, che sono le stesse per tutte e tre le tipologie di campioni, fatta eccezione per alcuni dettagli. L'allestimento delle colture cellulari è la prima fase, si prosegue con il blocco colchicinico delle metafasi e con la processazione delle colture. Successivamente si allestiscono i preparati sul vetrino e lo si colora per garantire la comparsa del bandeggio cromosomico. Il vetrino pronto viene osservato al microscopio. In questa fase si osservano tutte le metafasi presenti su di esso e valutandole si acquisiscono le immagini di quelle repute idonee allo studio. Le immagini catturate sono cariotipizzate ed una volta ordinati tutti i cromosomi si può osservare la presenza o l'assenza di anomalie.

In riferimento alle anomalie che possono essere diagnosticate con il cariotipo convenzionale, dobbiamo specificare che questa tecnica consente di vedere tutto il genoma ed è per tale ragione utile soprattutto per la rilevazione di anomalie numeriche e strutturali. Tali alterazioni devono essere grandi ed evidenti e devono coinvolgere perdite o duplicazioni oppure spostamenti di materiale genetico intorno alle 5-10 Megabasi. Questo è il limite fondamentale del cariotipo standard, il quale rimane confinato ad una risoluzione di bandeggio di 350-400 bande per corredo aploide.

Un altro limite che caratterizza sempre tale metodica è la possibilità di insuccesso della coltura cellulare, poiché a volte può accadere che le cellule in coltura non crescano adeguatamente.

La necessità di superare questi limiti è stata la spinta per lo sviluppo di tecniche di bandeggio cromosomico ad alta risoluzione. Partendo sempre da cellule in coltura, si è appurata l'opportunità di sfruttare cromosomi in prometafase per aumentare la risoluzione del cariotipo. L'obiettivo è quello di allungare i tempi di condensazione dei cromosomi per poterli ottenere meno condensati e più lunghi. La differenza tra questo approccio e il precedente riguarda quindi il rallentamento della condensazione e la capacità di realizzare cromosomi con un numero maggiore di bande, le quali sono anche più sottili. Ciò permette di poter analizzare regioni più piccole e di conseguenza controllare con più accuratezza se queste regioni sono assenti, presenti, duplicate o spostate in altri cromosomi.

Quando il cariotipo presenta delle anomalie che determinano l'insorgenza di patologie di natura genetica, si parla di cariotipo patologico.

L'individuazione delle patologie cromosomiche è oggi possibile grazie alle tecniche di bandeggio, che sono state introdotte e raffinate a partire dal 1970 e che consentono sia di esaminare il corretto numero dei cromosomi, sia di evidenziare la presenza di alterazioni cromosomiche strutturali.

Un primo gruppo di patologie cromosomiche è rappresentato dalle anomalie numeriche, le quali si caratterizzano per l'acquisto o la perdita di uno o più cromosomi. All'interno di queste alterazioni si differenziano le Poliploidie, in cui l'intero corredo cromosomico aploide di 23 cromosomi è presente, invece che in doppia copia (46 cromosomi totali), in tre (triploide) o in quattro (tetraploide) copie; e le Aneuploidie contraddistinte da un'alterazione numerica che riguarda un solo cromosoma.

Nel caso delle Poliploidie l'errore che ha portato alla formazione di tale aberrazione, si genera durante la fecondazione, perciò è rintracciabile in tutte le cellule dell'organismo. Questa condizione, la maggior parte delle volte, compromette lo sviluppo dell'embrione e l'esito della gravidanza è solitamente un aborto spontaneo. Una formula generalmente utilizzata per descrivere un individuo affetto da triploidia è la seguente: 69, XXY.

Nel secondo caso, ossia le Aneuploidie, distinguiamo le Trisomie, patologie dovute alla presenza di un cromosoma soprannumerario, ovvero un corredo cromosomico  $2n + 1$ . Le più frequenti sono quelle che interessano i cromosomi 13, 18 e 21, rispettivamente causa della "*Sindrome di Patau*", "*Sindrome di Edwards*" e "*Sindrome di Down*". Sempre in riferimento alle Aneuploidie, osserviamo anche una condizione patologica chiamata Monosomia, caratterizzata dall'assenza di un cromosoma e per tale motivo si ha un corredo cromosomico del tipo  $2n-1$ . La Monosomia non è compatibile con la vita, fatta eccezione per la Monosomia X chiamata "*Sindrome di Turner*", in cui il soggetto è una femmina di bassa statura, con insufficienza ovarica ed amenorrea.

Il secondo gruppo di patologie cromosomiche è quello delle anomalie strutturali, che riguardano cambiamenti della struttura e possono coinvolgere uno, due o più cromosomi. I cambiamenti strutturali derivano da rotture e conseguenti

ricongiungimenti errati di porzioni cromosomiche. Le anomalie strutturali più importanti sono:

- le Traslocazioni: determinate da uno scambio di segmenti tra cromosomi diversi. In presenza di una Traslocazione bisogna valutare la quantità di materiale genetico scambiato. Se il riarrangiamento non altera il contenuto genetico dei cromosomi interessati, allora si parla di traslocazione bilanciata e non si hanno effetti sul fenotipo. Qualora invece la traslocazione causi uno sbilanciamento del corredo cromosomico dei gameti, si avranno gravi sindromi polimalformative nella prole;

- le Duplicazioni: si verificano quando avviene un raddoppiamento di un tratto di un cromosoma. Esistono diversi tipi di duplicazioni: in tandem, tandem inverse e tandem terminali, le quali sono causate da un crossing over ineguale tra cromatidi durante la meiosi;

-le Delezioni: dovute alla perdita di segmenti cromosomici. Distinguiamo le delezioni terminali, in cui vi è una sola rottura all'estremità del cromosoma, e le delezioni interstiziali, causate da due rotture all'interno dello stesso cromosoma. La perdita di materiale genetico determina sempre uno sbilanciamento genomico che comporta nella maggior parte dei casi una patologia. La sua gravità dipende dalla quantità di materiale perso;

-le Inversioni: si originano in seguito alla formazione di due rotture sulle braccia del cromosoma con rotazione di  $180^\circ$  del segmento compreso tra le due rotture. Le inversioni si classificano in Inversioni Pericentriche, così chiamate in quanto all'interno del segmento è compreso il centromero, e Inversioni Paracentriche, che diversamente dalle prime non includono il centromero.

### La FISH e le alterazioni subcromosomiche

La FISH, Fluorescence In Situ Hybridization, è una metodica introdotta negli anni '80 e perfezionata nei decenni successivi e grazie alle sue peculiarità ha permesso di rilevare alterazioni cromosomiche non visibili con il cariotipo convenzionale.

L'introduzione del cariotipo ad alta risoluzione infatti non ha eliminato il limite di risoluzione e per tale motivo, a partire dagli anni '80 la Biologia Molecolare ha

consacrato la FISH come una delle tecniche citogenetiche più utilizzate, in quanto permette un notevole miglioramento nella ricerca di alterazioni molto piccole arrivando ad avere una risoluzione  $\geq 0,1$  Mb.

La FISH è una tecnica in grado di identificare sequenze target di DNA genomico, in modo da valutarne la presenza e la localizzazione ed è possibile utilizzarla per studiare sia le metafasi che i nuclei interfasic.

Lo strumento cardine sono le sonde, costituite da sequenze di DNA cromosoma-specifiche e marcate con molecole fluorescenti, che permettono di localizzare un gene o una qualsivoglia sequenza genomica di interesse.

La procedura prevede inizialmente la denaturazione del DNA bersaglio e delle sonde attraverso l'esposizione di entrambi ad agenti chimico-fisici che determinano l'apertura delle doppie eliche. La fase successiva ovvero l'ibridazione, prevede che le sonde si appaiano alle loro sequenze omologhe presenti sul DNA target. Terminata l'ibridazione, il preparato è lavato per allontanare le sonde in eccesso. Nella fase finale avviene l'osservazione al microscopio a fluorescenza, con il quale è possibile visualizzare i segnali luminosi in corrispondenza della posizione in cui la sonda si è legata.

Esistono differenti tipi di sonde:

- Sonde locus-specifiche: costituite da sequenze specifiche per singoli tratti di DNA presenti su un unico cromosoma;
- Sonde centromero-specifiche: caratterizzate da un tipo di sequenze ripetute, dette alfoidi, presenti nei centromeri;
- Sonde cromosoma-specifiche: formate da un insieme di sonde di DNA ognuna delle quali è omologa all'intero cromosoma considerato.

Per le sue specifiche caratteristiche la FISH viene impiegata molto frequentemente sia per la definizione di alterazioni rilevate con il cariotipo convenzionale sia nella diagnosi di sindromi malformative note, dovute a microdelezioni cromosomiche in siti specifici del DNA.

Questo è il principale limite della FISH: essa non consente di visualizzare l'intero genoma ma solo segmenti cromosomici prescelti dall'operatore; è, infatti



strettamente orientata dal sospetto clinico, come se fosse un' "indagine mirata" verso una o poche determinate regioni trascurando quelle in cui potrebbero trovarsi riarrangiamenti submicroscopici causativi di patologia.

### L'Array-CGH, indagine genomica ad alta risoluzione

Un ulteriore progresso per le indagini citogenetiche si ebbe integrando la necessità di una visione completa del genoma ad una risoluzione elevata, unire perciò le caratteristiche del cariotipo ai vantaggi delle indagini molecolari. Fissata questa necessità, nella prima decade degli anni 2000 è stata messa a punto una nuova tecnica denominata CGH, Comparative Genomic Hybridization, che è in grado di identificare la presenza di alterazioni cromosomiche a livello dell'intero genoma, senza ricorrere all'allestimento di colture cellulari e senza prediligere alcune regioni piuttosto che altre.

A partire dal 2004 l'introduzione del CGH e successivamente dell'array-CGH ha permesso la trasformazione della citogenetica classica. Per merito di queste nuove metodiche, sono stati fatti grandi passi in avanti, come il rilevamento a livello del genoma delle Variazioni del Numero di Copie (CNV) in alta risoluzione, l'approfondimento della comprensione dei cambiamenti genomici nel cancro e la possibilità di identificare piccoli sbilanciamenti cromosomici in pazienti con ritardo mentale.

È stato dimostrato con diversi studi che l'array-CGH riesce a rilevare il 10% – 20% di anomalie cromosomiche nei bambini con ritardo mentale e ritardo dello sviluppo e solo il 3% -5% di queste anomalie sarebbe rilevabile con altri mezzi.

Il principio dell'array-CGH è basato sull'ibridazione contemporanea di un DNA campione e di un DNA genomico di riferimento, marcati entrambi con fluorocromi differenti. La fase di co-ibridazione è effettuata su un supporto solido, l'array, ricoperto da frammenti di DNA noti come sonde o cloni. Al termine di tale incubazione il preparato viene osservato da un apposito scanner che rileva l'emissione di segnali di fluorescenza da parte di entrambi i fluorocromi. Un software andrà infine ad effettuare un'analisi comparativa tra le intensità di

fluorescenza emesse dai due DNA con l'obiettivo di identificare le possibili variazioni del numero di copie del DNA campione rispetto a quello di riferimento.

I supporti solidi, su cui avviene la co-ibridazione, hanno subito nel corso degli anni un'evoluzione, che ha reso possibile un ulteriore miglioramento del livello di risoluzione dell'array-CGH.

La risoluzione della piattaforma array dipende, infatti, dalla distanza media delle sonde rispetto al genoma standard di riferimento (spacing) e dalla lunghezza delle sonde. Tanto maggiore è il numero delle sonde presenti nell'array tanto più piccole sono le dimensioni delle anomalie che possono essere identificate.

All'inizio la risoluzione media era di di 0,8 Mb, relativamente bassa, in quanto le sonde erano costituite da 20.000 cloni di grandi dimensioni come BAC (cromosomi batterici artificiali) o PAC (cromosomi artificiali di fago P1) che hanno una lunghezza compresa tra le 150 e le 200 Kb. Utilizzando un sistema robotizzato, queste sonde venivano depositate sulla matrice e fissate ad essa mediante luce UV.

Lo svantaggio più significativo nell'impiego delle sonde BAC o PAC era collegato alla mancata rilevazione di duplicazioni o delezioni di dimensioni ridotte.

Successivamente alcuni laboratori hanno migliorato la matrice per array-CGH inserendo molecole di DNA. Questa modifica ha permesso di affiancare ai risultati ottenuti utilizzando solo i BAC e i PAC, la possibilità di misurare i cambiamenti del numero di copie cromosomiche.

Il limite nell'utilizzo degli array-cDNA era la sensibilità, che rimaneva ancora troppo bassa e benché questa tecnologia abbia consentito la rilevazione di significative informazioni, tuttavia è stata largamente superata da una nuova tipologia di piattaforma, ossia quella con oligonucleotidi. L'uso di queste nuove piattaforme ha dato l'opportunità di incrementare, ancora una volta, la risoluzione dell'array-CGH che ora è compresa tra 1 Mb e 100 kb.

Le piattaforme per questa tipologia di array si possono ottenere o mediante sintesi diretta degli oligonucleotidi sul supporto, oppure per deposizione degli stessi sotto forma di goccia. Un esempio di piattaforma costituita da oligonucleotidi è stata

realizzata da Affimetrix. Gli oligonucleotidi, lunghi circa 25 bp, sono sintetizzati in situ su un substrato in posizioni predefinite. Questo array è a canale singolo, il che significa che solo il DNA del test deve essere etichettato e ibridato. È un array in cui la complessità viene ridotta grazie all'utilizzo di enzimi di restrizione, i quali effettuano la marcatura del DNA. Inoltre sono richiesti solo 250ng di campione di partenza e ciò permette l'uso di campioni di DNA con una qualità non troppo alta.

In generale i principali vantaggi che si ottengono con l'impiego dell'array-CGH possono essere riscontrati, non solo nella maggiore risoluzione rispetto al cariotipo, con la quale è possibile rilevare contemporaneamente delezioni, duplicazioni, aneuploidie e amplificazioni di ogni locus rappresentato sull'array, ma anche nell'automazione, nella velocità di esecuzione del test, nell'utilità della diagnosi di malattia genetica. E ancora, non ha bisogno di cellule in coltura, ma il DNA viene estratto direttamente dalle cellule nucleate presenti nel sangue intero.

Sebbene la metodica presenti vantaggi sicuramente indispensabili per le indagini citogenetiche, in ogni modo sono presenti anche degli svantaggi che pongono alla tecnica dei limiti. Tra questi vi è l'impossibilità di vedere riarrangiamenti strutturali bilanciati come traslocazioni e inversioni; l'impossibilità di individuare traslocazioni reciproche e robertsoniane; l'incapacità di rilevare modifiche del numero di copie delle regioni del genoma che non si trovano sulla piattaforma array. Non è in grado di evidenziare livelli di mosaicismo inferiori al 25% ed inoltre le modifiche al numero di copie possono essere riscontrate solo se più del 50% delle cellule analizzate contiene un guadagno o una perdita cromosomica. Un altro aspetto che deve essere considerato quando viene impiegato l'array-CGH è quello economico. Si tratta di una metodica che, utilizzando materiali e reagenti particolari, richiede un costo considerevole e sicuramente superiore rispetto al cariotipo standard e alla FISH.

Tenendo conto di tutto ciò è chiaro che l'array-CGH non ha soppiantato totalmente tutte le precedenti tecniche citogenetiche. Ci può essere la necessità, a tutt'oggi, di affiancare a questa metodica anche l'esecuzione del cariotipo standard e della FISH. Infatti la presenza di alterazioni cromosomiche non

rilevabili dall'array, non può essere trascurata, ma deve essere rilevata con l'impiego di altre tecniche.

Cariotipo Convenzionale, FISH e CGH-array non devono essere impiegate singolarmente, bensì integrate l'una all'altra per permettere alla citogenetica di ottenere diagnosi sempre più dettagliate ed inequivocabili.

### *Genoma: organizzazione, variabilità e CNVs*

Le informazioni genetiche di un organismo, organizzate nelle molecole di DNA dei cromosomi, costituiscono il genoma, il quale rappresenta il patrimonio genetico di una determinata specie. Nell'ultimo decennio, grazie allo sviluppo delle tecnologie molecolari diversi studi si sono concentrati sul sequenziamento del genoma e grazie ad essi è stato possibile comprendere in modo più accurato la sua organizzazione.

Il genoma della specie *Homo sapiens* è lungo 3.2 miliardi di paia di basi e contiene circa 20.000 geni, ma esaminando le sue dimensioni totali, si può notare la presenza di un grande eccesso di DNA non codificante. Una parte significativa di queste regioni extrageniche e non codificanti si manifesta sotto forma di sequenze di DNA ripetute molte volte nel genoma. Le diverse regioni del DNA si possono classificare in base al numero di copie presenti nel genoma. La maggior parte dei geni trascritti in mRNA codificanti per proteine, è presente in singola copia; mentre alcuni geni trascritti in altri tipi di RNA, sono presenti in copie multiple e ripetute nel genoma da alcune centinaia a poche migliaia di volte. Sono presenti anche altre sequenze di DNA che sono ripetute tra  $10^5$  e  $10^7$  copie, che non contengono geni, ma coincidono al DNA altamente ripetitivo.

La rilevazione della differenza della ripetitività delle regioni del DNA, è stata permessa mediante il sequenziamento completo del genoma, di cui il 20% circa corrisponde a geni e solo l'1% corrisponde a regioni codificanti per proteine. Il resto del genoma contiene invece elementi ripetuti molte volte.

La variabilità genomica si esprime come diversità che distingue un individuo dall'altro ed è rappresentata sia dalle differenze di sequenze nucleotidiche tra i genomi degli individui, sia dalle diversità alleliche degli stessi geni. Tali

differenze, che riguardano il genotipo di un soggetto, causano differenze sul fenotipo ed infatti quest'ultime sono correlate, ad esempio, alle caratteristiche fisiche e alla tendenza a sviluppare determinate patologie piuttosto che altre. In verità, la quasi totalità di queste diversità influisce molto poco o per niente sul fenotipo, ma allo stesso tempo ha la capacità di determinare una variabilità genomica interindividuale.

La diversità genetica è dovuta maggiormente al verificarsi delle mutazioni, che vengono definite come cambiamenti nella sequenza del DNA. Quando nei cromosomi di una popolazione la mutazione promuove l'esistenza di due o più alleli con una frequenza superiore all'1%, il locus viene considerato polimorfico e le variazioni sono chiamate polimorfismi genetici.

Nell'insieme dei polimorfismi si possono distinguere cinque tipologie differenti, in base alla loro estensione, frequenza nel genoma e stabilità.

I primi che si possono citare sono i polimorfismi di singolo nucleotide, SNP, che rappresentano la differenza più semplice tra le sequenze di DNA, in quanto si osserva un cambiamento di una singola base con un'altra.

Sono evidenziabili anche i polimorfismi di numero variabile di ripetizioni in tandem, VNTR, i quali consistono in una ripetizione in tandem di una breve sequenza di DNA che si ripete in modo testa a coda in un locus cromosomico specifico. Ogni VNTR è costituito da unità ripetitive composte da 10 a 100 nucleotidi e denominate "minisatelliti".

Simili ai VNTR sono gli Short Tandem Repeats, STR, che descrivono sempre sezioni di DNA altamente ripetitive, ma differentemente dalle precedenti, queste sono formate da due, tre o quattro nucleotidi e per tale motivo chiamati "microsatelliti". VNTR e STR vengono entrambi utilizzati in biologia molecolare, particolarmente in genetica forense, come potenti marcatori genetici per l'identificazione individuale.

Riferendosi sempre ai polimorfismi, si può anche individuare la presenza o l'assenza di elementi trasponibili, come le sequenze Alu e le alterazioni strutturali, quali delezioni, inserzioni o duplicazioni.

L'ultima tipologia di polimorfismi è rappresentata dalle Copy Number Variations, CNVs, ossia variazioni che coinvolgono sequenze di DNA costituite da più di 1000 paia di basi e che possono essere cancellate o duplicate. Nel primo caso sono definite Copy Number Loss (Deletion), nel secondo sono invece chiamate Copy Number Gain (Duplication). Il Database of Genomic Variants, DGV, che studia tali mutazioni da dieci anni, ha raccolto e curato 2.291.408 CNVs che globalmente mappano in 202.431 regioni cromosomiche. Il 70% delle CNVs sono interessate da Copy Number Loss, mentre il 13% da Copy Number Gain.

Circa il 12% del genoma è caratterizzato dalle CNVs, che vengono distinte in due gruppi. Il primo è costituito dalle CNVs “ricorrenti”, che sono situate in regioni con elevata instabilità genomica rispetto alle regioni adiacenti. I «breakpoint» tendono a ricadere nella stessa area e hanno sempre la stessa estensione. Si originano a causa di una ricombinazione omologa non allelica (NAHR) fra duplicazioni segmentali localizzate ai lati della CNV.

Il secondo gruppo è invece formato dalle CNVs “non ricorrenti”; che presentano «breakpoint» differenti e hanno dimensioni ed estensioni diverse. Le CNVs non ricorrenti si possono originare mediante: meccanismi di riparazione non omologa (NHEJ), Fork Stalling and Template Switching (FoSTeS) e Micro-omology-mediated break-induced replication (MMBIR). Trattandosi di mutazioni genetiche alcune CNVs vengono ereditate, mentre altre insorgono spontaneamente de novo e nonostante la maggior parte di esse sia “benigna” e non implichi alcun effetto fenotipico, altre possono condizionare l'espressione genica con la conseguente insorgenza di una patologia. Per tale motivo è di fondamentale importanza distinguere le CNVs “benigne”, che non includono geni ma sono sufficientemente ampie da essere segnalate, dalle CNVs “patologiche”, che possono, ad esempio, coinvolgere geni sensibili al dosaggio o distruggere regioni regolatorie.

Fare tale distinzione è possibile grazie al recente sviluppo di tecniche di indagine, come l'array-CGH, che hanno consentito l'identificazione di varianti di sequenza presenti soltanto in parte delle cellule e il conteggio di copie di DNA. Queste tecnologie, sempre più avanzate, permettono mediante il continuo confronto con i database genomici, di avere una conoscenza completa della funzione di una determinata CNV e dell'effetto fenotipico che essa implica.

## L'Analisi di Sequenza e le patologie monogeniche

Le tecniche citogenetiche fin ora descritte permettono di diagnosticare patologie cromosomiche causate da mutazioni genomiche che coinvolgono ampi tratti di DNA. Differentemente da ciò, le patologie monogeniche insorgono in seguito al verificarsi di mutazioni geniche, ovvero cambiamenti di un singolo gene. Tali mutazioni, poiché determinano modificazioni molto piccole, sono chiamate anche mutazioni puntiformi.

Più precisamente, le mutazioni puntiformi sono causate dalla delezione, inserzione, sostituzione o duplicazione di un nucleotide nella sequenza del DNA. Si possono anche originare successivamente ad errori nella replicazione del DNA, non corretti dal sistema di riparazione della cellula, o all'esposizione ad agenti mutageni di natura chimica o fisica.

Le mutazioni puntiformi producono sempre un cambiamento nella sequenza dell'mRNA, ma solo in determinate circostanze si manifestano sul fenotipo. Per questo motivo sono classificate in quattro tipologie a seconda dell'effetto che provocheranno sulla proteina codificata.

- Mutazioni silenti: grazie alla degenerazione del codice genetico che permette a più triplette di codificare per lo stesso amminoacido, questa mutazione non causerà cambiamenti nella sequenza amminoacidica della proteina;
- Mutazioni di senso o missenso: un codone viene sostituito con un altro, pertanto il messaggio genetico viene alterato;
- Mutazioni non senso: provocano la formazione di un codone di stop all'interno della sequenza. A causa di ciò c'è un'interruzione precoce della sintesi della proteina;
- Mutazioni frameshift o di scorrimento della cornice di lettura: determina l'eliminazione o l'aggiunta di un nucleotide che altera l'ordine di lettura di tutti i codoni successivi.

Le malattie dovute a mutazioni puntiformi, come è stato precedentemente anticipato, prendono il nome di malattie monogeniche. Un esempio di queste è la Fibrosi Cistica, che non è diagnostica mediante l'impiego delle tecniche di

bandeggio, della FISH o dell'array-CGH, bensì attraverso l'utilizzo di test specifici che ricercano le sequenze mutate.

La Fibrosi Cistica, conosciuta anche come FC o Mucoviscidosi, è una malattia multiorgano, ereditaria, cronica, evolutiva ed attualmente inguaribile, che provoca la formazione di secrezioni dense e viscosi. Viene definita multiorgano, in quanto può colpire diversi distretti, ma i problemi più gravi sono a carico dei polmoni e dell'apparato digerente. Nei polmoni, le piccole vie aeree vengono ostruite dalla produzione di muco estremamente denso, che tende a ristagnare causando infezioni ed infiammazioni. Ciò che ne deriva è un graduale deterioramento dei polmoni che porterà, inevitabilmente, all'insufficienza respiratoria.

La Fibrosi Cistica è la malattia genetica ereditaria grave più diffusa, infatti è caratterizzata da una prevalenza di 1-9 casi su 100.000 e da una incidenza di 1 su 2.500-3.000 nati vivi. Nonostante ad oggi non sia possibile la guarigione completa, tuttavia nell'ultimo secolo le aspettative di vita sono migliorate sensibilmente. Attualmente infatti gran parte dei pazienti affetti da fibrosi cistica arriva all'età adulta ed almeno la metà supera i 30-35anni.

La Fibrosi Cistica è una malattia monogenica, che viene trasmessa con modalità autosomica recessiva e determinata da mutazioni che interessano entrambe le copie del gene CFTR, Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator.

Una malattia si definisce autosomica recessiva, quando è espressa solo in condizioni di omozigosi, ovvero è richiesta l'eredità di entrambi i geni mutati, derivati uno dal padre e uno dalla madre. Tenendo conto di ciò, la fibrosi cistica insorge solo negli individui in cui ambedue le copie del gene CFTR sono alterate. I soggetti che invece possiedono una copia del gene mutato e una copia normale, sono definiti "portatori sani" e non manifestano alcun sintomo.

Il gene CFTR è localizzato sul cromosoma 7 a livello della banda q 31.2, è lungo circa 250Kb ed ha 27 esoni. CFTR codifica per una proteina costituita da 1480 amminoacidi e in condizioni normali è situata sulla membrana apicale delle cellule epiteliali che rivestono dotti e cavità dei vari organi. Tale proteina costituisce un canale deputato al passaggio del cloro e regola anche la velocità del suo flusso.



Nella Fibrosi Cistica, la mutazione del gene determina una disfunzione della proteina che interrompe il trasporto degli ioni. A causa di ciò le cellule, in cui si genera quest'alterata secrezione, provocano uno squilibrio ionico e inducono un maggior riassorbimento di sodio e acqua. La conseguenza è quindi la produzione di muco denso e viscoso che ostruisce i dotti principali.

In realtà oggi si conoscono oltre 2000 mutazioni del gene CFTR e in base al tipo di mutazione che si verifica si hanno effetti diversi sulla proteina. Alcune mutazioni causano la totale mancanza di produzione della proteina; in altre la produzione c'è, ma la proteina è poco funzionante; in altre ancora la quantità di proteina prodotta è ridotta rispetto alla normalità.

Sono state individuate cinque classi di mutazioni del gene CFTR e la più frequente in tutte le popolazioni è la mutazione F508del, che costituisce circa il 70% degli alleli CFTR nei pazienti con FC e che provoca l'eliminazione dell'amminoacido fenilalanina situato in posizione numero 508 della proteina. La mancanza di tale amminoacido è dovuta alla delezione di tre basi nella sequenza nucleotidica del gene corrispondente. Questa mutazione appartiene alla seconda classe ed è caratterizzata dall'alterata maturazione della proteina. La prima classe, descritta dalla mutazione G542X che causa una ridotta produzione, la terza classe, definita dalla mutazione G551D che provoca un'alterata regolazione, e la seconda classe sono quelle che alterano maggiormente il destino della proteina. La quarta classe, dove si verifica la mutazione R347P, consente invece la sintesi di una proteina difettosa ma capace di svolgere, seppure in piccola misura, la sua funzione. La quinta ed ultima classe, determinata dalla mutazione 3949+10KbC>T, permette la produzione di una certa quota, anche se minima, di proteina normale.

Il test genetico per la ricerca delle mutazioni della fibrosi cistica può essere impiegato per confermare la diagnosi clinica nei soggetti malati, per la diagnosi prenatale, per identificare i portatori sani nelle famiglie di un individuo affetto.

Il test genetico si esegue effettuando una ricerca delle mutazioni del gene CFTR su DNA estratto da sangue periferico; si esegue un test di primo livello che si basa su una genotipizzazione qualitativa. Tale metodica sarà spiegata e commentata in ogni sua fase nel capitolo successivo "Materiali e Metodi".

Si utilizzano tecniche che permettono, in primo luogo di ricercare la mutazione familiare, qualora si conosca, e secondariamente le mutazioni più frequenti nell'area geografica presa in esame. L'analisi può risultare complicata, in quanto esistono numerose mutazioni e molte di esse sono rare. Il test genetico ovviamente non è in grado di identificarle tutte. Per tale motivo un risultato negativo non indica per forza una totale assenza di mutazioni, ma bisogna tener conto di un rischio residuo che il soggetto sia comunque un portatore di altre mutazioni non incluse nel pannello ricercato.

Ordinariamente il test che viene eseguito prevede l'impiego di un pannello che tiene conto di 30-200 mutazioni, le più frequenti, e nel 90% dei casi i portatori vengono individuati.

Di fronte ad un risultato negativo, se il genetista lo ritiene opportuno, il soggetto può sottoporsi ad un ulteriore test genetico che prevede l'analisi delle mutazioni dell'intero gene, con conseguente ricerca di tutte le mutazioni finora scoperte. In ogni modo, quest'ultimo test rimane un esame di terzo o secondo livello, da usufruirne quando i test di primo livello non hanno rilevato alcuna alterazione.

-----

Al termine di questa panoramica va sottolineato con le prime due metodiche, il Cariotipo Convenzionale e la FISH, siano essenzialmente degli esami citologici, anche se molto particolari, e richiedano tessuti vitali, colture cellulari, cromosomi di buona qualità, osservazione al microscopio e specifiche conoscenze di citogenetica, mentre le seconde due, array-CGH e Analisi di Sequenze, richiedano DNA estratto e specificamente trattato, strumentazione e software dedicati. In entrambi i casi è fondamentale un'esperienza specifica degli operatori.

## **2. SCOPO DELLA TESI**

Questa tesi è stata elaborata in collaborazione con gli specialisti del Laboratorio di Genetica Medica dell'Ospedale "G.Salesi" di Ancona per valutare la validità del test molecolare dell'ibridazione genomica comparativa (Array-CGH) su DNA.

Questo test si utilizza nella diagnostica di pazienti pediatrici affetti da malformazioni, dismorfismi e disabilità intellettive o altri disordini del neurosviluppo non inquadrabili in sindromi note.

I peculiari aspetti tecnici del test sono stati evidenziati con la revisione delle singole fasi del test e con il confronto con un'altra metodica di studio del DNA che viene applicata nella diagnosi delle mutazioni che causano la Fibrosi Cistica.

L'analisi dei risultati ottenuti su un gruppo di casi clinici per i quali il test è stato richiesto nel periodo Giugno-Settembre 2020 e la descrizione di un caso completano la valutazione del test.

### **3. MATERIALI E METODI**

#### Casi valutati

Per la realizzazione di questo progetto sono stati valutati 28 campioni di sangue di pazienti inviati dalla Clinica Pediatrica e dalla Neuropsichiatria Infantile dell'Ospedale G.Salesi di Ancona e pervenuti al Laboratorio di Genetica Medica nel periodo Giugno-Settembre 2020.

La scelta dei pazienti da sottoporre al test è stata effettuata dai medici specialisti sulla base di quadri clinici caratterizzati da malformazioni congenite, dismorfismi e vari tipi di disabilità intellettive.

Le indicazioni segnalate dagli specialisti sono state le seguenti:

- disabilità intellettiva o ritardo mentale o ritardo psicomotorio
- ritardo dello sviluppo generale
- dismorfismi facciali, cranio-facciali, ossei scheletrici, iperaccrescimento
- malformazioni strutturali maggiori di organi interni (cardiache, renali)
- disturbo dello spettro autistico, problemi comportamentali, epilessia

Nello stesso periodo sono pervenuti al Laboratorio anche altri 16 campioni per l'esecuzione dello stesso test ma, trattandosi di test effettuati sui consanguinei sani dei soggetti in studio (genitori e fratelli), non sono stati considerati in questa casistica. Questi test restano comunque essenziali per comprendere il ruolo più o meno patogenetico di una CNV e l'origine, familiare-ereditata o di nuova insorgenza, delle alterazioni stesse.

## La tecnica Array-CGH

I campioni da analizzare mediante la tecnica Array-CGH sono stati sottoposti alle procedure che seguono.

### Fase preanalitica

#### *Estrazione del DNA*

Il DNA è estratto da campioni di sangue intero prelevato per via endovenosa in provetta contenenti EDTA o eparina sodica. La procedura è svolta interamente in modo manuale servendosi del kit Puregene Blood Core Kit A (QIAGEN).

Per effettuare la lisi dei globuli rossi, in una provetta Eppendorf sono stati dispensati 900 $\mu$ L di RBC Lysis Solution a cui sono stati aggiunti 300 $\mu$ L di sangue intero. La provetta è stata incubata per 4 minuti a temperatura ambiente (15-25°C) e contemporaneamente invertita delicatamente per 10 volte per favorire la lisi dei globuli rossi.

Successivamente la provetta è stata centrifugata per 35 secondi a 15000 x g ed è stato rimosso quanto più sovrantante possibile avendo cura di lasciare il pellet visibile di globuli bianchi e circa 10-20 $\mu$ L di liquido residuo.

Per facilitare la lisi dei globuli bianchi nella fase seguente, la provetta è stata sottoposta al vortex vigorosamente per 10 secondi. Questo passaggio permette inoltre di risospendere le cellule nel liquido residuo e di non rendere più visibile il pellet di globuli bianchi.

Vengono aggiunti 300 $\mu$ L di Cell Lysis Solution alle cellule che sono state risospese delicatamente per aiutare la loro lisi.

Il Cell Lysis Solution è una soluzione costituita da un detergente anionico e da uno stabilizzatore di DNA che limita l'attività delle DNAasi intracellulari impedendone la sua degradazione. Tale reagente, lisando i globuli bianchi, permette la fuoriuscita del DNA, ma anche delle DNAasi intracellulari che devono essere immediatamente inattivate affinché il DNA nucleare non venga deteriorato.

Nello step successivo sono stati dispensati 1,5 $\mu$ L di RNase A Solution ed in seguito il campione è stato mescolato per inversione 25 volte. La provetta è stata poi lasciata incubare per 15 minuti a 37°C. L'incubazione viene fatta a tale temperatura poiché l'RNasi, essendo un enzima che degrada l'RNA, lavora ad una temperatura ottimale di 37°C ed in questo modo ci si assicura che l'acido nucleico ottenuto alla fine sia solo DNA.

In seguito il campione è stato posto in ghiaccio per 1 minuto per poterlo raffreddare rapidamente. 100 $\mu$ L di Protein Precipitation Solution sono stati aggiunti nella provetta e, affinché potesse avvenire la precipitazione delle proteine, il campione è stato sottoposto al vortex ad alta velocità per 20 secondi.

Il Protein Precipitation Solution, per mezzo di precipitazione salina, rimuove i contaminanti come le proteine che, dopo centrifugazione per 1 minuto a 15000 x g, formano un pellet compatto e marrone. È stato ripetuto il passaggio al vortex ed in seguito la provetta è stata incubata in ghiaccio per 5 minuti e centrifugata per 1 minuto sempre a 15000 x g.

La precipitazione del DNA caratterizza la fase successiva ed è stata espletata dispensando 300 $\mu$ L di 100% isopropanolo (2-propanolo) in una nuova provetta Eppendorf nella quale è stato aggiunto il sovrnatante contenente il DNA della Eppendorf precedentemente centrifugata. Il campione è stato mescolato invertendo delicatamente la provetta per 50 volte, accertando che il DNA fosse in sospensione. Per osservare il DNA sotto forma di pellet bianco la provetta è stata centrifugata per 1 minuto a 15000 x g. Facendo attenzione che il pellet rimanesse nella provetta, il sovrnatante è stato eliminato rovesciando prudentemente l'Eppendorf la quale è stata poi lasciata asciugare capovolta su carta assorbente. Successivamente nella provetta sono stati aggiunti 300 $\mu$ L di 70% etanolo e la stessa è stata invertita diverse volte con lo scopo di lavare il pellet di DNA. Il campione, poi, è stato centrifugato per 2 minuti a 15000 x g e si è ripetuta la procedura per eliminare il sovrnatante. Quindi l'Eppendorf è stata posizionata dritta e aperta e posta sotto cappa spenta per 1,5 ore affinché l'etanolo potesse evaporare.

La fase conclusiva dell'estrazione del DNA è rappresentata dalla sua idratazione che prevede l'utilizzo del DNA Hydration Solution. 50 $\mu$ L di questo reagente sono stati dispensati nella provetta, la quale, in seguito, è stata passata al vortex

eseguendo 3 impulsi a media velocità. Per velocizzare l'idratazione il campione è stato incubato per 10 minuti a 65°C e poi tenuto sotto cappa a temperatura ambiente per tutta la notte.

Il DNA ottenuto può essere conservato a 4°C per una settimana, mentre per una conservazione di lungo periodo deve essere posto a -20°C o a -80°C.

### *Misurazione del DNA*

La misurazione del DNA rappresenta lo step successivo all'estrazione e viene eseguita il giorno seguente.

È stata valutata la concentrazione e la purezza del DNA estratto impiegando lo strumento Spettrofotometro Nanodrop e il software Nanodrop 2000, impostando l'opzione predefinita del DNA-50, poiché questa è relativa al DNA a doppio filamento.

Inizialmente le superfici ottiche dello strumento sono state pulite e prima di procedere con la quantizzazione del DNA, sono stati dispensati sulla postazione inferiore 1,5µL di buffer DNA Hydratation Solution. Questo step coincide con la misurazione del bianco ed è necessario per calibrare lo Spettrofotometro. Comunemente, la soluzione di bianco coincide con il buffer in cui la molecola d'interesse è sospesa o dissolta, in tale caso il DNA Hydratation Solution.

Una volta effettuato il comando a “vuoto” si è proceduto prelevando dalla provetta 1,5µL di DNA che sono stati depositati sul piedistallo dello strumento. Successivamente il braccio della testina è stato abbassato ed il Nanodrop ha misurato l'assorbanza a diverse lunghezze d'onda utilizzando la legge di Lambert-Beer e ha calcolato automaticamente anche il rapporto di concentrazione e purezza del campione.

Le lunghezze d'onda relative all'acido nucleico sono le seguenti: 230, 260 e 280nm. I rapporti tra di esse conferiscono indicazioni sulla qualità e purezza del DNA precedentemente estratto.

Il rapporto tra le due assorbanze 260/280 deve avere un valore di ~1,8. Se il rapporto risulta essere molto più basso può essere indice della presenza di proteine o altri contaminanti che assorbono fortemente attorno ai 280nm.

È valutato anche un secondo rapporto di purezza tra le due assorbanze 260/230 e questo deve essere compreso tra 1,8 e 2,2. Se il rapporto è considerevolmente più basso può essere il segnale della presenza di contaminanti quali EDTA, carboidrati o solventi.

Nella stessa seduta lo Spettrofotometro ha quantificato anche la concentrazione dell'acido nucleico. Solitamente dall'estrazione si devono ottenere circa 18μL di DNA con una concentrazione di almeno 55ng/μL.

Per ogni campione esaminato è stato realizzato un foglio di lavoro in cui sono stati inseriti il nome e il cognome del paziente e, successivamente alla misurazione del DNA, sono stati riportati i valori di purezza e di concentrazione.

### *Elettroforesi su gel*

In seguito alla determinazione della concentrazione e della purezza, si è verificato che il DNA non fosse degradato attraverso una corsa elettroforetica su gel di agarosio. Se alla fine della seduta risulta esserci un'unica banda per ogni campione, allora l'integrità dell'acido nucleico è confermata.

Per procedere con la corsa elettroforetica è stato preparato il gel di agarosio all'1%, sciogliendo 0,5g di agarosio in 50mL di TBE, Tris-Borato-EDTA. La soluzione è stata portata ad ebollizione ponendola sopra ad un agitatore al massimo della potenza e della temperatura. Successivamente sono stati aggiunti alla soluzione di agarosio 2,5μL di Gel Star, facendo attenzione a non esporlo a luce diretta. Tutto questo è stato poi lasciato raffreddare su di uno scaffale metallico fino al raggiungimento di una temperatura tale da permettere di tenerlo in mano. Infine la soluzione ottenuta è stata versata in una camera elettroforetica ed è stata lasciata solidificare per 1 ora in presenza di un pettine, necessario per la formazione dei pozzetti.



Dopo la solidificazione del gel, il pettine è stato rimosso e si è proceduto con il caricamento dei campioni nei rispettivi pozzetti. Ogni campione è stato caricato utilizzando provette Eppendorf da 1,5mL che sono state numerate. I campioni sono stati ottenuti mescolando in una provetta 2 $\mu$ L di DNA con 2 $\mu$ L di Loading Buffer e in seguito posti nei pozzetti del gel.

Questa fase della metodica è terminata chiudendo la camera del gel, posizionando correttamente gli elettrodi (il rosso per il polo positivo e il nero per il polo negativo) e applicando un campo elettrico di 120V per 40 minuti. Durante la corsa elettroforetica il DNA, poiché è caricato negativamente, è migrato verso il polo positivo. Trascorsi i 40 minuti il gel è stato rimosso dalla camera e osservato attraverso un transilluminatore a UV grazie al quale è stato possibile visualizzare la banda relativa al DNA.

## Fase analitica

### *Pretrattamento al calore e marcatura*

Per la realizzazione di questa fase sono state utilizzate provette da 0,2mL. Poiché ogni campione deve avere un controllo dello stesso sesso e poiché sono stati utilizzati i vetrini 8x60, che contengono in tutto 8 posti, sono stati trattati contemporaneamente 8 campioni e 8 controlli.

Per ogni campione è necessario avere un quantitativo di DNA pari a 1000ng, quindi utilizzando la formula  $V_C=1000/C$ , dove C è la concentrazione del campione in ng/ $\mu$ L, è stato calcolato il DNA in  $\mu$ L.

Poi è stato calcolato il volume di acqua milliQ occorrente per ottenere un volume finale pari a 18 $\mu$ L, secondo la formula  $V_A= 18 - V_C$ .

Successivamente si è posto il  $V_A$  calcolato per ogni campione in ogni provetta e si è aggiunto il  $V_C$  calcolato.

Ad ogni provetta sono stati aggiunti 10 $\mu$ L di Reaction Primer e 10 $\mu$ L di Reaction buffer, precedentemente scongelati, raggiungendo dunque un volume finale di 38 $\mu$ L.

Ogni provetta è stata mescolata manualmente e con uno spin di centrifuga e poi caricata nel termociclatore, il quale è stato preriscaldato a 99°C. Una volta posizionati tutti i campioni nello strumento è stato impostato il programma array4.cyc e sono stati lasciati incubare a 99°C per 20 minuti.

Nell'attesa è stata preparata la mix di marcatura dispensando, in una provetta Eppendorf, i seguenti componenti: 82,4 $\mu$ L di dCTP labelling mix, 8,24 $\mu$ L di CY3 dUTP o CY5 dUTP (a seconda che si trattasse dei campioni o dei controlli) e 8,24 $\mu$ L di Klenow per un volume totale di 98,88 $\mu$ L per ogni campione ed ogni controllo.

CY3 e CY5 sono due diversi fluorocromi e sono necessari nella tecnica dell'array-CGH in quanto marcano rispettivamente i campioni di DNA e i controlli. Questi fluorocromi sono coloranti sintetici ed appartengono alla categoria dei polimetini. Sono dotati di un carattere fluorescente che copre lo spettro che va da IR a UV, in

basa alla struttura chimica. Grazie ad essa sono in grado di marcare e quindi di legarsi a proteine, acidi nucleici, anticorpi e peptidi. La preparazione della mix deve essere fatta in penombra affinché le cianine non si deteriorino.

Trascorsi i 20 minuti e ultimata la mix di marcatura, le provette sono state poste in ghiaccio per 5 minuti aggiungendo ai 38 $\mu$ L, i 12 $\mu$ L di mix ottenendo un volume totale di 50 $\mu$ L di soluzione di marcatura.

In seguito ogni provetta è stata mescolata prima manualmente e poi centrifugata ad alta velocità. Al termine le provette sono state caricate nel termociclatore ed è stato impostato il seguente programma: 2 ore a 37°C, 10 minuti a 65°C e stop a 4°C. Infine le provette sono state poste in ghiaccio per 5 minuti.

### *Purificazione e combinazione*

In questa fase il DNA appena marcato deve essere purificato da tutti i componenti che sono serviti per la marcatura.

Lavorando sempre in penombra sono state preparate e numerate 16+16 provette Amicon da 2mL e sono state disposte su due file. I campioni precedentemente inseriti nel termociclatore e poi posti in ghiaccio, sono stati centrifugati a 6000giri per 1 minuto. Successivamente in tutte le provette della fila 1 (16 provette) sono stati inseriti 430 $\mu$ L di Tris-EDTA buffer solution. Tutto ciò che c'era nelle provette, ovvero i 50 $\mu$ L, è stato prelevato e dispensato nelle Amicon della fila 1 raggiungendo un totale di 480 $\mu$ L. Questi sono stati mescolati e aspirati con una pipetta. Nelle provette della fila 1 è stato poi posto un filtro sul quale è stato versato tutto il contenuto precedentemente aspirato con la pipetta. Dopodiché sono stati chiusi i tappi delle Amicon e si è centrifugato il tutto a 14000 giri per 10 minuti.

Terminata la centrifugazione la provetta è stata svuotata, mentre il filtro è stato tenuto e riposto poi nella stessa. Sono stati aggiunti di nuovo 480 $\mu$ L di Tris-EDTA buffer solution e ripetuta una centrifugazione sempre a 14000 giri per 10 minuti. Le provette con l'eluito ottenuto sono state eliminate ed i filtri sono stati trasferiti, mantenendoli capovolti, sulle nuove Amicon della fila 2. Queste sono

state centrifugate a 1000 giri per 1 minuto, quindi i filtri sono stati buttati e le provette contenenti circa 20 $\mu$ L sono state recuperate. Si deve fare attenzione al volume finale ottenuto e controllare se è stato rispettato.

Durante la centrifugazione è stato acceso l'evaporatore centrifugo per un preriscaldamento, impostando il tempo a 15 minuti, la temperatura a 60°C e la modalità V-AQ.

Le provette centrifugate sono state posizionate con il tappo aperto nell'evaporatore centrifugo per 20 minuti a 60°C. Una volta assicurato che il pellet si fosse asciugato, lo si è ricostituito con 9,5 $\mu$ L di TE. I campioni sono stati infine posti in ghiaccio.

Utilizzando lo Spettrofotometro Nanodrop sono state eseguite le letture dei campioni e dei controlli selezionando l'opzione "microarray-type DNA (bianco con TE). In questa fase si sono misurate le concentrazioni del DNA e delle cianine, e i valori ottenuti devono essere compresi entro i seguenti range:

- Per i campioni ed i reference: da 300 a 400ng/ $\mu$ L;
- Per CY3: da 7 a 15pmoli/ $\mu$ L;
- Per CY5: da 5 a 13pmoli/ $\mu$ L.

Successivamente ogni campione è stato abbinato ad un controllo dello stesso sesso e con una concentrazione di DNA marcato comparabile. Infatti la differenza tra le due concentrazioni deve essere <100ng/ $\mu$ L. Unito il campione ad il suo controllo è stata effettuata una centrifugazione veloce, in seguito alla quale è stata ottenuta una mix di colore viola.

Si è proceduto poi con un'ulteriore centrifugazione ed infine i campioni ed i controlli combinati sono stati avvolti nella carta stagnola e posti freezer a -20°C. Questo step li rende stabili per un massimo di 24 ore.

Sono stati inoltre accesi il forno ad ibridazione a 65°C e il bagnomaria a 37°C, i quali saranno utilizzati il giorno successivo nella fase di ibridazione.

## *Ibridazione e lavaggi*

Facendo attenzione a lavorare in penombra, è stato scaldato il termoblocco a 94°C.

I reattivi quali, DNA cot, 10X Blocking Agent e 2X HI-RPM Hybridization Buffer, ed i campioni sono stati tirati fuori dal congelatore.

Per eseguire l'ibridazione, ad ogni campione sono stati addizionati: 2µL di DNA cot, 4,5µL di 10X Blocking Agent e 22,5µL 2X HI-RPM Hybridization Buffer. Tali reagenti sono stati aggiunti nelle provette uno alla volta a cominciare dal DNA cot che, essendo arricchito in sequenze altamente ripetute, è in grado di bloccare gli elementi ripetitivi e prevenire fenomeni di ibridazione aspecifici. Le provette sono state centrifugate ed ogni tappo è stato avvolto nel parafilm per evitare la loro apertura durante lo step successivo. I campioni sono stati quindi caricati nel termoblocco a 94°C per 3 minuti e poi trasferiti nel bagnomaria a 37°C per 30 minuti, al buio.

Successivamente è stato preparato il vetrino coprioggetto posizionandolo, con le guarnizioni e il barcode verso l'altro, su uno dei settori della cameretta. Poi, aprendo la confezione, è stato prelevato il vetrino agilent spottato. I campioni sono stati rimossi dal bagnomaria, centrifugati e ordinati sul vetrino a partire dal barcode secondo uno schema preimpostato. In seguito sono stati prelevati 45µL di campione utilizzando una pipetta da 100µL e dispensati negli spazi specifici presenti nel vetrino coprioggetto. Su quest'ultimo è stato appoggiato il vetrino agilent spottato e le viti della cameretta sono state chiuse al punto tale da non far fuoriuscire i campioni, ma allo stesso tempo permettere al liquido di muoversi all'interno della camera. Una volta fatto ciò la cameretta è stata inserita nel forno a 65°C e a 20rpm per tutta la notte. Nel forno la cameretta è stata controbilanciata da un'altra cameretta vuota. Durante questa fase il campione e il controllo competono per legarsi alle sonde complementari spottate sul vetrino.

Per il giorno successivo sono state preparate le seguenti soluzioni da inserire nel bagnomaria a 37°C:

- La soluzione Agilent Stabilization Dry;
- La soluzione Wash Buffer 2.

Trascorse 24 ore, la cameretta è stata tirata fuori dal forno ed aperta. Poi il vetrino e il coprioggetto sono stati separati all'interno di una vaschetta contenente la soluzione di disassemblaggio e utilizzando delle pinzette. Rapidamente e minimizzando l'esposizione all'aria sono stati effettuati i lavaggi. Il vetrino microarray è stato trasferito nel portavetrini già posizionato nella vaschetta contenente la Wash 1 ed il tutto è stato posto in agitazione su piastra magnetica per 5 minuti. Nell'attesa è stato controllato che la temperatura della soluzione Wash 2 restasse a 37°C. Terminato il primo lavaggio, il vetrino è stato spostato nella Wash 2 per 1 minuto. Questo lavaggio è più stringente rispetto al primo, per tale motivo il vetrino deve restare immerso il tempo giusto; in caso contrario si rischia di staccare le cianine dal DNA.

In seguito il vetrino è stato posto in Acetonitrile per 45 secondi sotto cappa spenta e poi trasferito per altri 45 secondi nella soluzione Agilent Stabilization Dry. L'Acetonitrile è una soluzione che protegge i fluorocromi dalla degradazione causata dall'ozono, mentre la soluzione stabilizzante è acetonitrile modificato capace di asciugare immediatamente il vetrino una volta esposto all'aria, impedendo la formazione di goccioline o aloni.

Infine il vetrino asciutto è stato posizionato nello scanner con il barcode in basso e la scritta agilent in alto.

## Fase di acquisizione

### *Scansione, acquisizione ed elaborazione dei dati*

L'ultima fase dell'array-CGH è rappresentata dalla lettura del vetrino e dall'analisi dei dati rilevati. Tutto ciò è effettuato grazie all'impiego di uno scanner chiamato InnoScan 710 (Innopsys), il quale è collegato ad un software di acquisizione delle scansioni, ovvero il Mapix. Questo software permette di calibrare i laser, che eccitano i fluorocromi, e i fotomoltiplicatori, i quali misurano l'intensità di luce emessa da i due fluorocromi.

Inserito il vetrino nello scanner, la scansione è stata eseguita mediante laser verdi e rossi, rispettivamente alla lunghezza d'onda di circa 532nm e 633nm. Le immagini ottenute sono state infine importate nel software CytoSure Interpret in grado di compiere diverse azioni come: elaborare automaticamente un grafico corrispondente a ciascun cromosoma, gestire facilmente tutti i dati dell'array-CGH, archiviare i dati di ogni esperimento e rendere disponibili i collegamenti on-line con le principali banche dati.

## Parametri di valutazione dei risultati

La valutazione dei risultati in seguito alla realizzazione di un array-CGH, rappresenta una delle fasi più critiche e decisive dell'intera metodica. Tutt'ora infatti, definire il ruolo delle CNVs risulta piuttosto complesso e per tale motivo ogni laboratorio deve necessariamente seguire le linee guida emesse dall'American College of Medical Genes, per poter interpretare correttamente i risultati ottenuti mediante il test array-CGH.

Tra gli aspetti più importanti dell'analisi dei microarrays vi è la verifica dei "QC metrics", ovvero parametri di controllo della qualità, utilizzati per garantire l'affidabilità e la riproducibilità del test. Tuttavia prima di eseguire un'analisi approfondita è doveroso assicurarsi che i dati ottenuti non siano stati alterati da fattori esterni alla metodica. Da ciò si capisce quanto sia fondamentale accertarsi che le aberrazioni rilevate siano proprie del campione analizzato e non relative a errori riconducibili al modo in cui è stata eseguita la metodica. Questi errori possono essere causati dalla fonte o dalla qualità del DNA, dal protocollo adottato, ma anche dalla funzionalità dello scanner e dall'affidabilità del software impiegato nell'elaborazione delle immagini.

Utilizzando il protocollo Agilent, le linee guida adottate richiedono la valutazione di diversi parametri, tra cui vi sono:

- DLRSpread: è considerato il parametro chiave in quanto è un'indicazione del rumore attorno al segnale medio della matrice. Il Derivate Long Ratio e la Deviazione Standard misurano in modo leggermente diverso quanto sono dispersi i cloni dell'array intorno allo zero. Il valore ottenuto dovrebbe essere  $<0,3$  e questo è indice di un array buono, poiché segnala la presenza di cloni strettamente raggruppati intorno allo zero. D'altra parte se il valore che si ricava è più alto, il DNA è di scarsa qualità. In realtà un array eccellente dovrebbe avere un valore DLRS  $<0,1$ , ciò nonostante avere un valore  $<0,2$  consente comunque di rilevare aberrazioni molto piccole, permettendo un'identificazione più accurata delle regioni cromosomiche moltiplicate o cancellate, riducendo così la necessità di ripetizioni sperimentali.



- Signal Intensity: è il parametro che indica l'intensità media del segnale ed è relativa ai due fluorocromi impiegati. Non esiste un limite superiore per tale valore, comunque normalmente il fluorocromo verde ha un valore > 350 mentre quello rosso > 250. Un segnale troppo basso potrebbe essere causato o da un problema che si verifica durante la reazione di marcatura relativa alle sonde o dalla scarsa qualità del DNA oppure dall'aggiunta di una quantità errata di DNA. Questi ultimi due problemi possono essere identificati ed eliminati prima di terminare la metodica utilizzando lo Spettrofotometro Nanodrop, il quale misura accuratamente la concentrazione di DNA e il livello di incorporazione delle molecole di colorante.
- Background Noise: questo parametro definisce il rumore di fondo ed è calcolato osservando i punti di controllo negativo sull'array. I valori che si ottengono dovrebbero essere compresi tra 5 e 10. Un valore inferiore a 5 è valutato come eccellente. Valori di rumore di fondo elevati sono invece, nella maggior parte delle volte, causati dalle fasi di lavaggio. Durante queste è infatti necessario verificare che la velocità dell'agitatore sia corretta. Se tali valori persistono, è consigliato lavare i piatti con acetonitrile per rimuovere l'accumulo di molecole di colorante non incorporate.
- Signal to Noise Ratio: tale valore viene determinato dividendo l'intensità del segnale per il rumore di fondo e indica con quanta chiarezza è possibile rilevare i punti al di sopra del livello di fondo. I valori per essere definiti ottimali devono essere superiori a 100. Se sono compresi tra 30 e 100 sono accettabili-buoni, ma se non superano 30 vengono classificati come scarsi. Solitamente quest'ultimi sono riconducibili all'efficacia delle fasi di marcatura e lavaggio dei campioni.

## Analisi delle CNVs

Un altro aspetto fondamentale nell'analisi dei microarrays è la valutazione delle CNVs e del loro contenuto genomico.

Utilizzando il software CytoSure ogni campione viene esaminato e i 60000 spot letti e valutati. In ciascuno spot le situazioni che possono verificarsi sono tre:

- Se lo spot ha assunto una colorazione gialla, la sonda nel grafico è posizionata vicino allo zero. Ciò indica l'equivalenza tra il DNA campione e il DNA controllo, quindi l'assenza di alterazioni;
- Se lo spot ha assunto una colorazione verde, la sonda nel grafico è posizionata sopra la linea di equilibrio. In questo caso il DNA campione è maggiore del DNA controllo ed è indice della presenza di una duplicazione;
- Se lo spot ha assunto una colorazione rossa, la sonda nel grafico è posizionata sotto la linea di equilibrio. In quest'ultima circostanza il DNA campione è minore del DNA controllo e ciò è sintomo della presenza di una delezione.

Tutte le aberrazioni rilevate devono essere analizzate per poter comprendere il legame tra esse e le patologie presenti nel soggetto in esame. Per fare ciò il software consente di spiegare il valore di ogni CNVs individuata mediante la consultazione di database interni o esterni. Grazie a questa competenza è quindi possibile effettuare un confronto tra i dati raccolti di un determinato paziente e le informazioni archiviate nel tempo di individui già studiati. Tuttavia se i dati conservati non sono sufficienti a chiarire l'identità dell'alterazione, allora il confronto viene eseguito con altri archivi online, i quali consentono uno studio più approfondito.

Al termine dell'analisi, la natura di ogni CNVs deve essere chiarita assegnando a ciascuna di essa un preciso significato clinico. Infatti le Copy Number Variations possono essere classificate in:

- *Patologiche*: è certo che l'anomalia sia associata a sindromi conosciute ed è responsabile del fenotipo patologico del paziente;

- *Incerte*: queste si possono suddividere in due gruppi: *probabilmente patologiche* e *probabilmente benigne*. Le prime comprendono microdelezioni o microduplicazioni che in letteratura non sono ricorrenti, ma descritte in solo articolo. Per tale motivo la loro associazione con fenotipi clinici non è ancora stata chiarita precisamente. Le seconde invece includono aberrazioni ereditate da un genitore apparentemente sano e presenti in quantità minima da non costituire un polimorfismo;
- *Benigne*: le CNVs che vengono classificate come tali non hanno alcun significato patologico ed infatti costituiscono varianti polimorfiche presenti in molti individui sani e ripetutamente riscontrati nella popolazione normale;
- *Varianti ad incerto significato clinico (VOUS)*: rappresentano un ampio gruppo di CNVs che non sono state descritte, o se lo sono, non ci sono prove sufficienti per chiarire il loro significato clinico. È possibile che queste aberrazioni contengano geni di cui non si conosce perfettamente la funzione e la sensibilità al dosaggio. Inoltre la loro interpretazione risulta difficoltosa quando nei database si trovano informazioni contrastanti che non giungono a conclusioni utili. In ogni modo rimane importante riclassificare le VOUS come patologiche o benigne, in quanto grazie all'evoluzione della competenza scientifica e all'esperienza è possibile approfondire ed ampliare la conoscenza delle CNVs.

## Analisi genetico-molecolare per Fibrosi Cistica

Per evidenziare le peculiarità della metodica impiegata per l'array-CGH, sono di seguito descritte le fasi per la ricerca delle mutazioni della Fibrosi Cistica. Tale descrizione sarà poi utilizzata per effettuare un confronto tra le due tecniche.

La metodica utilizzata è una multiplex PCR allele-specifica e si articola attraverso le fasi che seguono.

### *Estrazione del DNA*

Il DNA è stato estratto da campioni di sangue intero in EDTA utilizzando il NucleoSpin Blood Kit, un sistema veloce e semplice di estrazione e purificazione del DNA con colonnine di silice.

Prima di procedere con la seduta analitica sono stati preparati tutti i reagenti necessari.

- Proteinasi K stock solution: è stata ottenuta aggiungendo il solvente proteasi PB (3,35mL) alla proteasi liofilizzata;
- Buffer B3: è stato allestito trasferendo il Buffer B1 nel reagente B2 e mescolando;
- Buffer B5: è stato preparato aggiungendo 80ml di etanolo (96-100%) al buffer B5;
- Buffer BW: è pronto all'uso.

Successivamente è stato acceso il bagnomaria e una volta raggiunti i 70°C è stato inserito il Buffer BE per equilibrarlo.

Nella fase seguente sono state preparate e numerate provette Eppendorf da 1,5mL corrispondenti al numero dei campioni da trattare ed in ognuna di queste sono stati dispensati 200µL di sangue.

La lisi delle cellule è stata eseguita aggiungendo in ogni provetta 25µL di Proteinasi K ed in seguito 200µL di Buffer B3. Le Eppendorf sono state poi sottoposte al vortex per 10 secondi e trasferite nel bagnomaria dove sono state incubate a 70°C per 15 minuti.

Terminata l'incubazione, per far cadere le gocce dal tappo, i campioni sono stati centrifugati ad impulso nella microcentrifuga.

Sempre nelle provette sono stati inseriti 210 $\mu$ L di etanolo (96-100%) e le stesse sono state centrifugate per 15 secondi con il vortex.

Per effettuare la purificazione del DNA si sono impiegate le spin-column con resina, le quali sono state preparate e numerate. Avendo cura di non bagnare il bordo delle spin-column, il contenuto delle Eppendorf è stato trasferito in esse ed il tutto centrifugato a 11000 x g per 1 minuto.

Trascorso il minuto le spin-column sono state poste all'interno di un tubo pulito da 2ml fornito dal kit. Il filtrato ottenuto e raccolto nel fondo del tubo è stato poi eliminato.

Affinché il DNA estratto fosse purificato nel modo corretto, sono stati effettuati diversi lavaggi dispensando nelle colonnine 500 $\mu$ L di Buffer BW. È susseguita una centrifugazione a 11000 x g per 1 minuto e poi è stato ripetuto il passaggio nel tubo da 2ml. Ancora una volta si è proceduto con l'eliminazione del filtrato.

Nello step successivo, facendo attenzione a non bagnare il bordo, sono stati aggiunti 600 $\mu$ L di Buffer 5 e successivamente le spin-column sono state centrifugate a 11000 x g per 2 minuti. Rovesciando delicatamente le provette è stato allontanato il filtrato e ripetuta la centrifugazione.

La fase finale dell'estrazione del DNA è caratterizzata dalla sua eluizione, la quale ha previsto sia il posizionamento delle spin-column in provette Eppendorf da 1,5mL e sia l'eliminazione del filtrato residuo. Dopodiché sono stati aggiunti 100 $\mu$ L di Buffer BE. Tutto ciò è stato poi incubato a temperatura ambiente per 3 minuti e centrifugato a 11000 x g per 1 minuto. Infine le spin-column sono state rimosse, mentre il filtrato contenente il DNA appena estratto è stato recuperato.

### *Misurazione del DNA*

La misurazione del DNA ottenuto è stata eseguita impiegando lo strumento Fluorimetro Qubit 3.0, il quale legge fluorescenze specifiche emesse dopo il legame del DNA ad un determinato target.

In primo luogo in una provetta sterile da 10mL è stata preparata la mix dispensando 199 $\mu$ L di Buffer e 1 $\mu$ L di Reagent.

Successivamente la mix appena allestita è stata trasferita in una provetta da 1,5mL nella quale sono stati aggiunti anche 5 $\mu$ L di DNA estratto. Il tutto è stato sottoposto al vortex e ad un'incubazione di 3 minuti a temperatura ambiente.

Per effettuare la misurazione del DNA è stato necessario preparare anche due standard, aggiungendo in una provetta da 1,5mL, 190 $\mu$ L di mix e 10 $\mu$ L di standard 1 e 2. Anche questi sono stati vortexati ed incubati.

Ultimato il trattamento dei campioni e degli standard, è stato acceso il Quibit 3.0 ed è stata selezionata l'opzione ds DNA impostando la seguente unità di misura: ng/ $\mu$ L.

In sequenza sono stati letti gli standard 1 e 2 e i campioni dopo aver posizionato ciascuna provetta nell'apposita sede e aver chiuso il coperchietto.

La fase successiva è rappresentata dalla PCR, ma prima di procedere è stato effettuato un calcolo della concentrazione di DNA da utilizzare nella reazione di amplificazione. Tale calcolo si basa sulla seguente formula:  $C_i V_i = C_t V_t$ , in cui  $C_i$  è la concentrazione di DNA letta;  $C_t$  è la concentrazione di DNA che serve per la PCR;  $V_t$  è il volume totale necessario per la metodica;  $V_i$  è la quantità di DNA da cercare. Da ciò si evince che  $V_i$  può essere calcolato attraverso questa formula:  $V_i = C_t V_t / C_i$ .

### *Amplificazione mediante PCR*

La PCR, Polymerase Chain Reaction, ovvero la reazione a catena della polimerasi è una tecnica di biologia molecolare che consente la moltiplicazione in vitro di frammenti di DNA utilizzando Oligonucleotidi di innesco e TAQ polimerasi.

Sulla base di ciò è stata effettuata un'amplificazione utilizzando delle microamp contenenti le 4 mix di PCR (10 $\mu$ L ciascuna) necessarie per ogni campione.

Una volta che le microamp sono state scongelate, in ognuna di esse (C1, C2, It1 e It2) sono stati miscelati 2,5 $\mu$ L della diluizione di DNA estratto.

In seguito le microamp sono state sottoposte al vortex e poi inserite nel termociclature già impostato:

- 95°C per 15 minuti;
- 94°C per 30 secondi, 62°C per 60 secondi, 72°C per 60 secondi. Tutto questo ripetuto per 29 cicli;
- 72°C per 15 minuti;
- 4°C infinito.

È stato necessario impostare anche il volume di reazione a 13µL.

La durata approssimativa dell'intera procedura è stata di 2,5 ore ed una volta conclusa, la reazione di PCR è stata spinnata per poter raccogliere il contenuto.

### *Corsa Elettroforetica*

La fase finale dell'analisi genetico-molecolare per la Fibrosi Cistica è rappresentata da una corsa elettroforetica su capillari realizzata mediante l'impiego dello strumento Abi Prism 310, un sequenziatore automatico a tecnologia fluorescente.

Prima di caricare i campioni amplificati nello strumento è stato necessario realizzare una mix in una provetta Eppendorf. In questa sono stati dispensati 2µL di size standard e 100µL di Hi-Di Formamide. L'Eppendorf è stata poi sottoposta al vortex e spinnata.

Successivamente in provette da 0,5mL per Genetic Analyzer sono stati aggiunti 15µL di mix e 1,5µL di prodotto PCR. Il tutto è stato agitato, vortexato e spinnato.

I campioni una volta allestiti sono stati caricati nell'Abi Prism 310 e sottoposti ad una corsa elettroforetica all'interno di capillari. Durante la corsa i frammenti di DNA fluorocromati hanno raggiunto la finestra, posta all'estremità del capillare, per il rilevamento della fluorescenza. Qui i raggi laser hanno eccitato i fluorocromi dei marcatori, i quali hanno emesso radiazioni luminose ad una specifica lunghezza d'onda. Successivamente queste sono state raccolte da uno spettrografo, separate a seconda della loro lunghezza d'onda e convogliate ad una CCD Camera, Charge Coupled Device Camera.

### *Acquisizione ed elaborazione dei dati*

Conclusa la corsa elettroforetica, due software, chiamati Genoscan e Genotyper, hanno elaborato automaticamente i dati raccolti. Il risultato ricavato da ciò è stato un elettroferogramma i cui picchi rappresentano i diversi alleli. La genotipizzazione è avvenuta confrontando le dimensioni degli alleli del campione con le dimensioni degli alleli della sequenza di riferimento precedentemente inserita nel software evidenziando quindi le eventuali differenze.

Al termine dell'esame i risultati ottenuti sono stati tre:

- L'analisi individua nel DNA del paziente la presenza di mutazioni in entrambe le copie del gene CFTR. Il soggetto è perciò omozigote, le due mutazioni sono uguali, o eterozigote composto, le due mutazioni sono diverse. In entrambi i casi l'individuo è affetto da fibrosi cistica.
- L'analisi individua nel DNA del paziente la presenza di mutazioni in una sola copia del gene CFTR. Il soggetto è dunque eterozigote, ovvero portatore sano e non mostra alcun sintomo.
- L'analisi non individua alcuna mutazione nel DNA del paziente. Ciò però non conferma la totale mancanza di qualsiasi mutazioni, ma il soggetto ha solo una probabilità diminuita, rispetto a prima dell'analisi, di essere un portatore. Non è possibile escludere in assoluto e con certezza la probabilità di essere portatore, in quanto è verosimile la presenza di mutazioni non incluse nel pannello impiegato nel test.



## 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

### Aspetti tecnici

Il test Array-CGH richiede protocolli di preparazione, esecuzione ed elaborazione piuttosto complessi. Ogni fase del test infatti implica estrema precisione e particolare attenzione, entrambe volte all'ottenimento di un prodotto ottimale, idoneo all'esecuzione e alla riuscita del test.

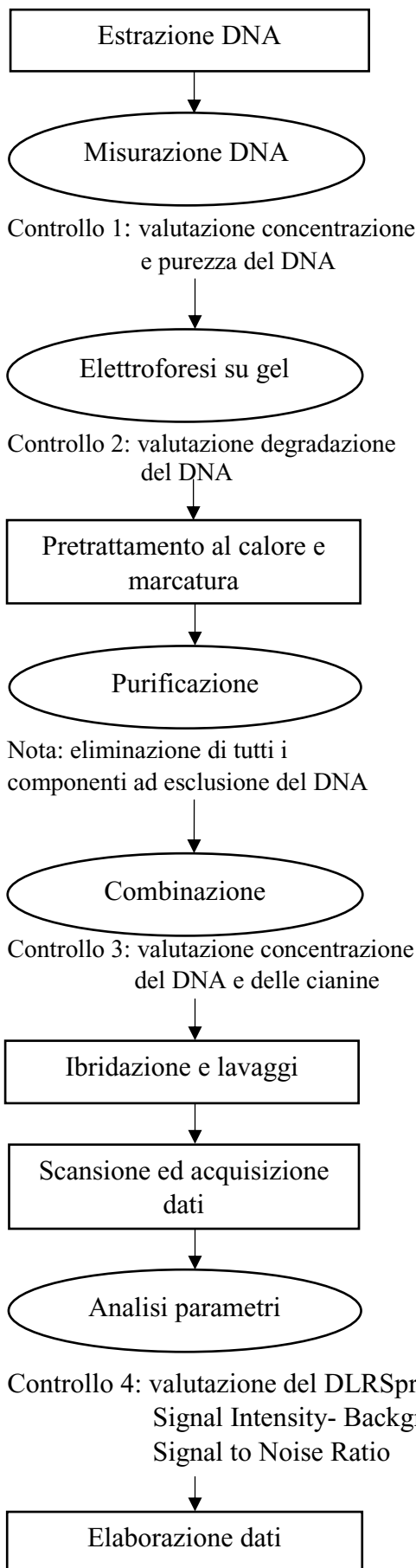
L'estrazione del DNA deve fornire un acido nucleico che abbia una quantità e una purezza molto elevate.

La quantità del DNA estratto deve essere elevata in quanto esso viene sottoposto alle fasi successive intero e senza essere mai amplificato in nessuna sua parte. La purezza del DNA estratto deve essere elevata e mantenuta tale in ogni fase della lavorazione poiché la presenza di contaminanti e di residui di reattivi può interferire con le fasi di preparazione e di analisi dei campioni.

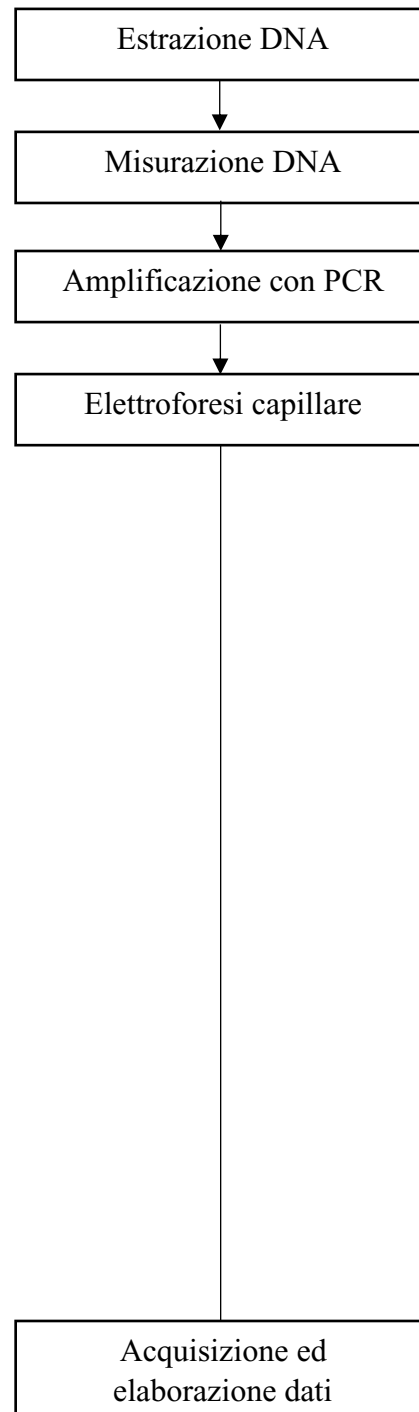
A questo scopo la procedura stessa prevede fasi e step di controllo. Nello schema proposto di seguito sono riassunte le varie fasi di lavorazione e gli step di controllo, avendo come confronto la procedura dell'analisi genetico-molecolare per la Fibrosi Cistica.

Va ricordato che le finalità dei due tipi di test sono differenti. L'Array-CGH ha come scopo la rilevazione e l'analisi delle CNVs (Copy Number Variations) cioè alterazioni quantitative, quali delezioni e duplicazioni, causa di patologie genetiche e che la rilevazione è basata sul confronto con un DNA standardizzato normale. Diversamente, l'obiettivo dell'indagine genetico-molecolare è la ricerca e l'identificazione di eventuali mutazioni geniche, specifiche per le patologie monogeniche, evidenziate per amplificazione e identificazione di predefinite regioni critiche.

## ARRAY-CGH



## ANALISI PER FIBROSI CISTICA



## Aspetti clinici generali

Dei 28 test array-CGH analizzati, 4 sono risultati positivi, 1 è stato ritenuto incerto e 23 sono stati valutati come negativi.

La tabella sottostante riporta i risultati ottenuti.

| Esito del test          | Numero Casi | Percentuale |
|-------------------------|-------------|-------------|
| Positivo o Patogenetico | 4           | 14%         |
| Incerto                 | 1           | 4%          |
| Negativo o Benigno      | 23          | 82%         |
| TOTALE CASI             | 28          | 100%        |

Tabella 1: risultati generali dello studio

I risultati ottenuti, anche nella nostra ridottissima casistica, con particolare riferimento all'esito positivo, sono in accordo con il detection rate dell'array-CGH riportato in letteratura, che, in studi su larga scala, risulta essere pari al 10-20%.

Questo è un risultato generale che riflette la buona conduzione del test in ogni sua fase. I risultati ottenuti su una casistica dipendono infatti non solo dall'esecuzione dei test nel laboratorio, ma anche dalla selezione dei casi per i quali il test viene richiesto e che non è, almeno nel nostro caso, una fase gestita dal laboratorio stesso. Maggiore è l'adesione degli specialisti clinici alle indicazioni previste per l'esame, migliore è la resa del test in percentuale di casi positivi.

## Osservazioni sui casi positivi e incerti

I 4 casi definiti “positivi” sono relativi a pazienti in cui è stato individuato uno sbilanciamento genomico che correla con il quadro clinico. Nella fattispecie, lo sbilanciamento è noto in letteratura per essere causativo di patologia.

Sono definiti “incerti” i casi “non diagnostici”, in quanto non viene identificata con sicurezza la causa genetica del quadro clinico. In questi casi i risultati pongono dubbi interpretativi di vario genere.

Nella tabella 2 sono riassunte le indicazioni cliniche dei 5 casi positivi e incerti.

| Caso | Sesso Età | Indicazioni                                                                                                          |
|------|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 ST | M 6       | Ritardo psicomotorio, dismorfismi.                                                                                   |
| 2 PL | M 12      | Ritardo psicomotorio, problemi comportamentali, dismorfismi.                                                         |
| 3 KL | F 19      | Ritardo psicomotorio, dismorfismi, ipoacusia monolaterale e malformazioni strutturali maggiori.                      |
| 4 FE | F 8       | Ritardo psicomotorio, problemi comportamentali, epilessia, dismorfismi facciali, malformazioni strutturali maggiori. |
| 5 RA | M 1       | Dismorfismi e anomalie ossee in cardiopatia congenita.                                                               |

Tabella 2.

Le indicazioni segnalate in questi 5 casi non si discostano in modo significativo da quelle dell'intera coorte di pazienti analizzati: non descrivono casi più gravi della media né consentono intrinsecamente di presumere che alla base dei quadri clinici ci sia un tipo particolare di alterazione genetica.

Nella tabella 3 sono riassunte le alterazioni rilevate nei 5 casi positivi e incerti e la loro interpretazione finale.

| Caso | CNV        | Regione       | Ampiezza           | Geni interessati                       | Interpretazione e Commento                                                                                                                                     |
|------|------------|---------------|--------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1    | del        | 16p13.5       | 1,69 Mb            | 54 geni                                | <b>Patogenetica.</b> Sindrome nota: Sindrome da delezione 16p. Origine “de novo”. Compatibilità con il fenotipo.                                               |
| 2    | dup        | 17p13.3       | 488 Kb             | 3 geni                                 | <b>Patogenetica.</b> Compatibilità con il fenotipo. Origine Paterna. Sindrome nota con penetranza incompleta ed espressività variabile.                        |
| 3    | del        | 13q12         | 6,5 Mb             | 35 geni                                | <b>Patogenetica.</b> Origine “de novo”. Compatibilità con il fenotipo. Grandi dimensioni e contenuto genico elevato.                                           |
| 4    | del<br>dup | 6q27<br>16q24 | 3,96 Mb<br>4,16 Mb | 21 geni<br>43 geni                     | Due CNV <b>Patogenetiche.</b> Grandi dimensioni e contenuto genico elevato. Compatibilità con il fenotipo. Sbilanciamento di traslocazione bilanciata materna. |
| 5    | dup<br>dup | 10p12<br>Xp22 | 11 Kb<br>83 Kb     | NEBL esoni 3-4-5<br>Regolatori di SHOX | Due CNV <b>Incerte.</b> Valore intrinseco incerto. Scarsa concordanza con il fenotipo. Genitori non disponibili per test di controllo.                         |

Tabella 3.

Generalmente i casi positivi sono identificati come tali già alla risposta del test: sono i casi in cui è rilevata una alterazione nota, già descritta in letteratura come causativa di patologia compatibile con il quadro clinico del paziente.

Altri casi, invece, in particolare quelli in cui l'alterazione rilevata appare di valore intrinsecamente incerto, sono inquadrati come positivi dopo la rivalutazione ed il confronto con altri dati clinici del paziente e del relativo albero genealogico, oltre che degli altri portatori dell'alterazione, presenti o meno tra i consanguinei del paziente stesso.

Di seguito è riportata la descrizione in dettaglio di un caso positivo per evidenziare l'utilità clinica del test.

#### **Caso 4**

Si tratta di una bambina di 8 anni con un quadro clinico grave e complesso: ritardo psicomotorio, problemi comportamentali, epilessia, dismorfismi facciali, malformazioni strutturali maggiori. La possibilità che questo quadro dipenda da una alterazione genetica è elevata ma il cariotipo convenzionale, già eseguito in passato, è normale.

L'analisi del DNA con Array-CGH evidenzia 2 alterazioni:

- una delezione di circa 3,96 Mb del braccio lungo di un cromosoma 6 a livello della regione 6q27 che comprende 21 geni (figura 1),
- una duplicazione di circa 4,16 Mb del braccio lungo di un cromosoma 16 a livello della regione 16q24.1-24.3 che comprende 43 geni (figura 2).

Ciascuna delle due alterazioni, per la grandezza e per il contenuto genico sbilanciato, è di per sé stessa patogenetica.



Figura 1: rappresentazione grafica della **delezione** sul braccio lungo di un cromosoma 6 a livello della regione terminale 6q27. Il software fornisce la posizione del tratto alterato ed evidenzia la delezione con lo **slivellamento in basso** del segnale relativo al numero di copie.

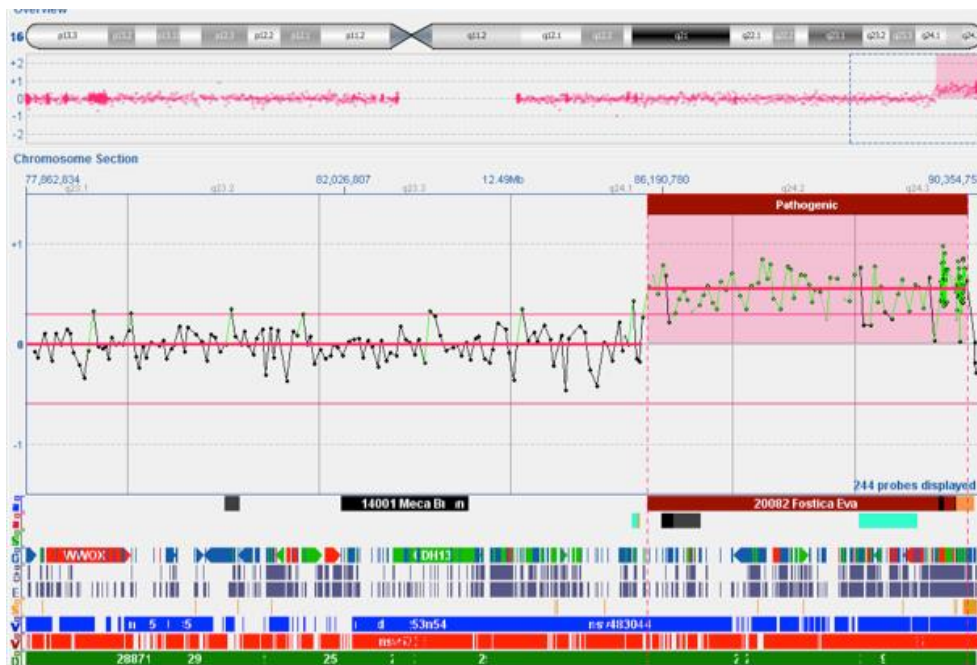


Figura 2: rappresentazione grafica della **duplicazione** sul braccio lungo di un cromosoma 16 a livello della regione terminale 16q24.1-24.3. Il software fornisce la posizione del tratto alterato ed evidenzia la duplicazione con lo **slivellamento in alto** del segnale relativo al numero di copie.

La presenza contemporanea di una delezione e di una duplicazione in posizione terminale su due cromosomi è riferibile alla presenza di una traslocazione bilanciata, non patogenetica, in uno dei genitori, che risulta quindi portatore sano.

Con l'impiego di una FISH con sonde subtelomeriche per i cromosomi 6 e 16 sono state confermate sia la traslocazione bilanciata nella madre che lo sbilanciamento nella paziente.

Lo sbilanciamento di una traslocazione cromosomica parentale può ripetersi in ogni successiva gravidanza con una probabilità del 50% e quindi averlo identificato consente anche una pianificazione familiare più sicura.

### Osservazioni sui casi negativi

Sono definiti “negativi” i casi in cui il test evidenzia solo CNV con accertato valore benigno, frequenti nella popolazione e prive di qualsiasi ruolo causativo.

Di regola, queste alterazioni non sono segnalate nei referti.

L'iter diagnostico dei pazienti risultati negativi al test non necessariamente termina con la definizione dell'esito dell'Array-CGH. Di regola viene ridefinito il quadro clinico e vengono intraprese altre indagini diagnostiche per la ricerca di alterazioni genetiche di tipo diverso.



## 5. CONCLUSIONI

L'array CGH è un metodo di analisi del DNA con caratteristiche peculiari. La tecnica è stata messa a punto negli anni 2000 unendo le conoscenze derivate dalla citogenetica convenzionale, dalla FISH e dalla biologia molecolare del DNA.

La finalità di questo test è di evidenziare la presenza nel genoma di delezioni e duplicazioni; è un test di tipo quantitativo basato su confronto tra il DNA del soggetto da testare ed un DNA di controllo.

Questa tecnica ha notevolmente migliorato l'efficienza diagnostica della citogenetica. L'array-CGH, infatti, rappresenta ad oggi l'unico test molecolare che consente di analizzare l'intero genoma umano con alta risoluzione.

La messa a punto di questo test ha consentito di ridurre i limiti della risoluzione delle indagini citogenetiche a 10-100 kb rispetto a 5-10 Mb del cariotipo convenzionale. Parallelamente il detection rate delle alterazioni causative nelle sindromi dismorfico-malformative è salito mediamente dal 5 a circa il 20%.

Il test richiede: una accurata preparazione dei campioni, l'impiego di strumenti e software specifici, una preparazione specifica degli operatori. La procedura è solo parzialmente automatizzata e richiede in ogni sua fase l'attività degli operatori.

Nelle fasi di preparazione dei campioni gli operatori devono garantire, con procedura rigorosa e con step di controllo, che il DNA sia estratto dal tessuto in quantità elevata e con un grado elevato di purezza, e che la marcatura fluorescente sia ottimale.

Nella fase di elaborazione dei dati e della formulazione della diagnosi sono richieste agli operatori competenze di informatica, di genetica e di clinica.

Nella nostra casistica, a conferma della conduzione ottimale della procedura ci sono anche i risultati ottenuti: la percentuale di casi positivi rilevati è del 14% in accordo con il detection rate dell'array-CGH riportato in letteratura, che, in studi su larga scala, risulta oscillare dal 10 al 20%.

Nei casi positivi le informazioni ottenute con il test hanno consentito di comprendere e giustificare con maggior precisione il quadro clinico dei pazienti,

di concludere l'iter diagnostico e di fornire alla famiglia una consulenza genetica appropriata.

In considerazione di questi aspetti la diagnosi genetica con Array-CGH è da considerare come la metodica di riferimento per la diagnosi di quadri sindromici che comprendano disordini del neurosviluppo associati a dismorfismi e malformazioni congenite, eventualmente integrata dalle tecniche citogenetiche convenzionali o dalle nuove tecniche di sequenziamento di singoli geni o di pannelli genici più o meno ampi.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Vermeesch J.R. et al. Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis. *European Journal of Human Genetics*; 15: 1105-1114, (2007).

Theisen A. Microarray-based Comparative Genomic Hybridization (aCGH). *Nature Education* 1(1):45, (2008).

Freeman J.L. et al. Copy number variation: New insights in genome diversity. *Genome Research*, 16: 949- 961 (2006).

Miller D. T. et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. *Am J. Hum Genet.* 86(5):749-764, (2010).

Elementi di Biologia e Genetica, P. Bonaldo-P. Defilippi-F. Majone-S. Minucci-P. Piomboni-G. B. Principato- M. G. Romanelli

[https://www.cell.com/ajhg/pdf/S0002-9297\(07\)62843-2.pdf](https://www.cell.com/ajhg/pdf/S0002-9297(07)62843-2.pdf)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1876176/>

<https://www.nature.com/scitable/topicpage/microarray-based-comparative-genomic-hybridization-acgh-45432/>

<http://www.diagnosiprenatale.com/diagnosi-prenatale/analisi-prenatali-cariotipo-molecolare-tecnica-array-cgh.aspx>

[https://www.laboratoriogenoma.eu/prestazioni\\_sottocategoria.asp?IdCat=37&IdSubCat=940](https://www.laboratoriogenoma.eu/prestazioni_sottocategoria.asp?IdCat=37&IdSubCat=940)

<http://bios-project.blogspot.com/2010/01/cgh-array.html>

file:///D:/Users/Utente/Downloads/magri\_PRESENTAZIONE.pdf

<https://www.nature.com/articles/gim200842>

<https://slideplayer.it/slide/607468/>

<https://academic.oup.com/nar/article/34/2/445/2401660>

[https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-88-470-1512-8\\_2](https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-88-470-1512-8_2) →LIBRO

file:///D:/Users/Utente/Downloads/magri\_PRESENTAZIONE.pdf

[https://www.laboratorigenoma.eu/prestazioni\\_sottocategoria.asp?IdCat=18&IdSubCat=110](https://www.laboratorigenoma.eu/prestazioni_sottocategoria.asp?IdCat=18&IdSubCat=110)

<https://www.doveecomemicro.it/malattie-rare/fibrosi-cistica>

[https://air.unimi.it/retrieve/handle/2434/170508/169572/phd\\_unimi\\_R08246\\_1.pdf;jsessionid=A3A6AC3B65808700E5F904B4134A9D1A.suir-unimi-prod-01](https://air.unimi.it/retrieve/handle/2434/170508/169572/phd_unimi_R08246_1.pdf;jsessionid=A3A6AC3B65808700E5F904B4134A9D1A.suir-unimi-prod-01)

<http://tesi.cab.unipd.it/44198/1/Tesi.pdf>

[https://www.ogt.com/resources/literature/399\\_understanding\\_array\\_quality\\_control\\_qc\\_metrics\\_for\\_cytosure\\_arrays](https://www.ogt.com/resources/literature/399_understanding_array_quality_control_qc_metrics_for_cytosure_arrays)

## **7.RINGRAZIAMENTI**

Vorrei dedicare questo spazio a chi ha contribuito alla realizzazione di questo elaborato.

In primis devo ringraziare il mio relatore, il Dottor Giancarlo Discepoli, che mi ha guidata con estrema disponibilità e professionalità durante questi cinque mesi, nonostante tutte le difficoltà causate dall'emergenza sanitaria dovuta al Covid-19.

Grazie ai tecnici e ai biologi del Laboratorio di Genetica Medica dell'Ospedale "G.Salesi" di Ancona, i quali mi hanno seguita con impegno e dedizione durante tutto il tirocinio e mi hanno fatto sentire parte integrante.

Un doveroso grazie va alla mia famiglia, in particolare a mia madre e mio padre, che, con il loro sostegno e i loro sacrifici, mi hanno permesso di intraprendere gli studi universitari e di portarli a termine. Grazie anche a mia sorella, che è stata presente in ogni mio traguardo importante e che, seppur da lontano, mi ha sempre spinto a migliorarmi e a concentrarmi sugli obiettivi da raggiungere. Grazie perché mi hai trasmesso forza, determinazione, coraggio e un tocco di ambizione nell'intraprendere nuovi percorsi.

Ci tengo anche a ringraziare Caterina ed Asya. Abbiamo condiviso tre bellissimi anni, durante i quali ho scoperto in voi non solo delle compagne di università, ma di vita.

Grazie a tutti i miei amici, quelli che sono al mio fianco da sempre e quelli che ho incontrato da poco. Avete reso la mia vita spettacolare e continuate a farlo ogni giorno.

Infine un grazie lo dedico a me, per non aver mollato alla prima difficoltà e per aver affrontato tutto sempre con il sorriso.