

ANALISI DI MUTAZIONI PUNTFORMI NON NOTE

Margherita Vinciguerra

U.O. Ematologia II – Laboratorio per lo Studio e la Diagnosi Molecolare Prenatale di Talassemia
A.O. “V. Cervello”, Palermo.

- Ø Analisi di sequenza
- Ø Single Strand Conformation Polymorphisms
- Ø Denaturant Gradient Gel Electrophoresis
- Ø Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis
- Ø Denaturant High Performance Liquid Chromatography

- Ø Microarray
- Ø Real time

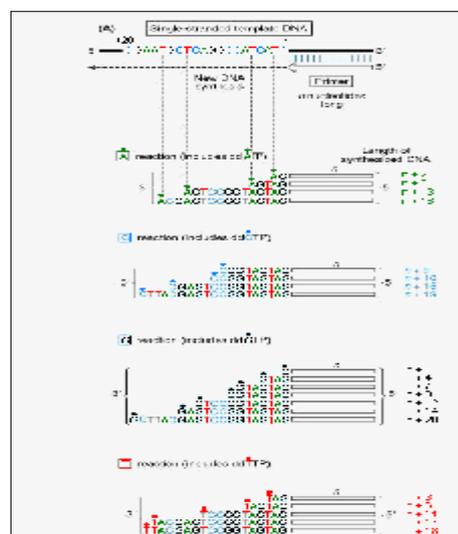
ANALISI DI SEQUENZA.

Sono stati sviluppati diversi metodi per determinare la sequenza di un frammento di DNA.

Il metodo di Maxam-Gilbert si avvale di specifici reagenti chimici per modificare e tagliare la catena di DNA a livello di nucleotidi specifici; è, però, scarsamente automatizzabile.

Il metodo dei didesossi o di Sanger, invece, si basa sulla sintesi enzimatica di una nuova catena di DNA su un'elica stampo, utilizzando, oltre ai normali d-NTPs, analoghi nucleotidi didesossi marcati con fluorocromi diversi: l'assenza di un 3'-OH impedisce la formazione di un legame fosfo-diesterico con il successivo precursore e, quindi, l'incorporazione di un nucleotide didesossi (“terminatore”) porta all'arresto della reazione polimerasica.

I prodotti che si ottengono sono frammenti che differiscono tra loro per una sola base e che vengono separati in funzione della loro lunghezza tramite elettroforesi capillare con sequenziatore automatico; le bande sono rilevate attraverso un sofisticato sistema ottico che permette l'identificazione dell'esatta successione delle basi nel segmento di DNA in esame.



FASI DELL'ANALISI DI SEQUENZA:

1. Amplificazione del DNA (PCR)
2. Purificazione
3. Reazione di sequenza
4. Purificazione
5. Denaturazione
6. Corsa elettroforetica
7. Lettura dei dati ottenuti

Prima della reazione di sequenza, il prodotto di PCR deve essere purificato per rimuovere l'eccesso di primers non

REAZIONE DI SEQUENZA PREMI X

ddA NT

ddC NT

ddG NT

ddT NT

dNTP +

+ PRIMER +

DNA

POLIMERASI

BUFFER

+ MgCl

Unico tubo

94° → 5'
94° → 10"
55° → 5"
60° → 2"
72° → 5'

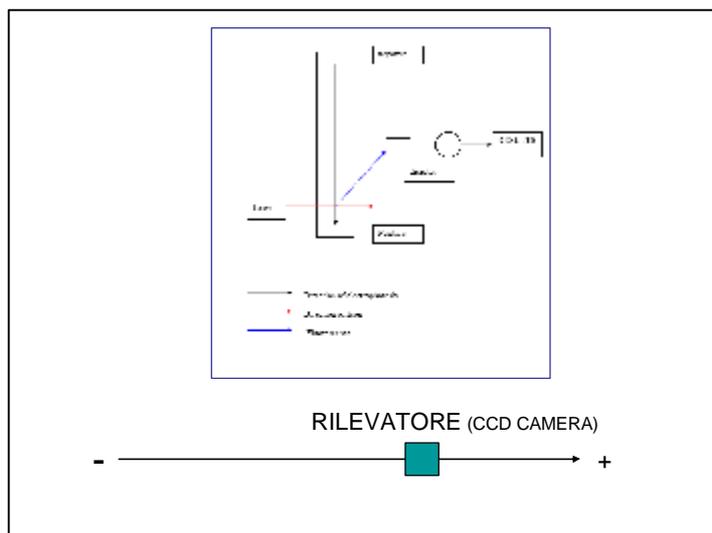
} 25 CICLI

incorporati ed i dNTPs; esistono diversi metodi per la purificazione. Uno di questi fa uso di enzimi di restrizione con attività esonucleasica che tagliano il DNA a singolo filamento ma non quello a doppio filamento; la fosfatasi alcalina catalizza, poi, la defosforilazione al 5' del DNA, impedendo l'estensione del filamento da parte della polimerasi.

Nella reazione di sequenza, la concentrazione dei ddNTPs deve essere circa 1/100 di quella dei dNTPs, in quanto l'incorporazione dei terminatori deve essere del tutto casuale e garantire, comunque, una certa sintesi di DNA; la probabilità che venga incorporato il didessosi invece del normale precursore nell'appropriata miscela di reazione deve essere, dunque, molto bassa.

Completata la reazione di sequenza, si procede con la purificazione del prodotto per rimuovere l'eccesso di ddNTPs marcati con fluorocromi. Esistono due metodi principali: uno chimico, attraverso l'utilizzo dell'enzima SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase) e l'altro fisico, il quale fa uso di colonnine a base di sephadex che trattiene i nucleotidi ma non i frammenti.

I prodotti di reazione purificati sono risospesi in formamide deionizzata e si procede con la denaturazione (96° per 5'); i campioni sono così pronti per la corsa elettroforetica con un sequenziatore automatico.



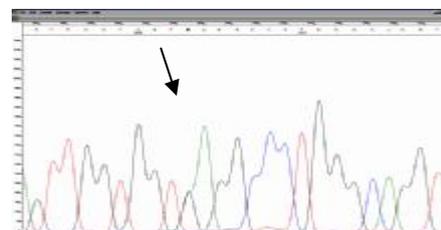
Quest'ultimo è un'evoluzione dell'elettroforesi classica: in questo caso, la migrazione avviene in un capillare ad una determinata corrente. Un sofisticato sistema ottico rileva la differenza tra le lunghezze d'onda emesse dai quattro fluorocromi legati ai ddNTPs..

ANALISI DEI DATI:

Ci sono tre modi per analizzare i dati di sequenza:

1. Ispezione visiva: possibile solo se il numero dei campioni da analizzare è ridotto; in tal caso, è necessario fare molta attenzione alle mutazioni in omozigosi che sfuggono ad una semplice ispezione visiva.
2. Base calling software: programmi che automaticamente riportano differenze tra la sequenza in esame e la sequenza standard.
3. Analisi comparativa di sequenza: forniscono comparazione diretta di tracciati di sequenza mutati e wilde-type.

Per una corretta interpretazione dei dati, i picchi devono essere ben definiti, con fondo scarso o nullo; la qualità dei dati deve essere buona e la linea di base bassa per evitare artefatti e picchi di mutazione meno intensi del normale.



PROBLEMATICHE:

- Linea di base alta: se l'altezza dei picchi è maggiore di 4000 unità di fluorescenza è preferibile diluire e far ricorrere i campioni.

- **Dye-blobs**: indicano la presenza di tutte e quattro le fluorescenze anche in sequenze ottime; dovuti per lo più ad artefatti della corsa elettroforetica nel capillare, scompaiono nella maggior parte dei casi se si fanno ricorrere i campioni.
- **PCR aspecifica**: si traduce in un fondo nell’elettroferogramma tanto maggiore quanto maggiore è la concentrazione dell’amplificato aspecifico; in tal caso è necessario ripetere l’amplificato, oppure ridisegnare i primers se si trovano all’interno di zone ripetute, o ancora ridiluire i primers se contaminati oppure, infine, aumentare la specificità del template (aumentando la temperatura di annealing o riducendo la concentrazione del magnesio).
- **Incompleta purificazione dei primers**: porta alla presenza di due popolazioni di primers, una completa e l’altra popolazione N-1 (dovuta alla rimozione di un nucleotide al 5’); pertanto, è preferibile richiedere primers di sequenza purificati dopo la sintesi con dHPLC.

VANTAGGI E SVANTAGGI:

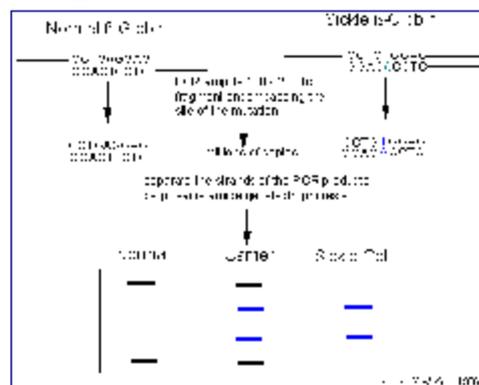
L’analisi di sequenza è per eccellenza la metodica di analisi diretta per la ricerca di mutazioni note e non note. I principali **vantaggi** di tale tecnica sono un’informazione completa su posizione e natura della mutazione, l’estrema sensibilità e l’estrema accuratezza; gli **svantaggi** sono molto ridotti e riguardano soprattutto il costo iniziale dell’acquisto e dell’avvio del sequenziatore, la mole di dati da analizzare ed il tempo leggermente maggiore per avere i risultati.

SSCP (Single strand conformation polymorphisms).

Si basa sull’alterazione della conformazione del DNA a singola elica, determinata da una sostituzione nucleotidica, che causa una diversa velocità di migrazione su gel di poliaccrilammide del frammento di DNA in cui è avvenuta la mutazione.

Il protocollo originario faceva uso di marcatura radioattiva, ma è stata messa a punto una metodologia basata sul riconoscimento delle bande di migrazione tramite colorazione con argento.

Il DNA a doppia elica (PCR) è denaturato con calore e formamide e raffreddato rapidamente per evitare la rinaturazione. Il DNA a singola elica assume conformazioni diverse: la migrazione su gel di poliaccrilammide non denaturante sarà determinata dalla conformazione piuttosto che dalle dimensioni. Il pattern di conformazioni è sequenza-dipendente: anche una singola sostituzione nucleotidica altera la conformazione.



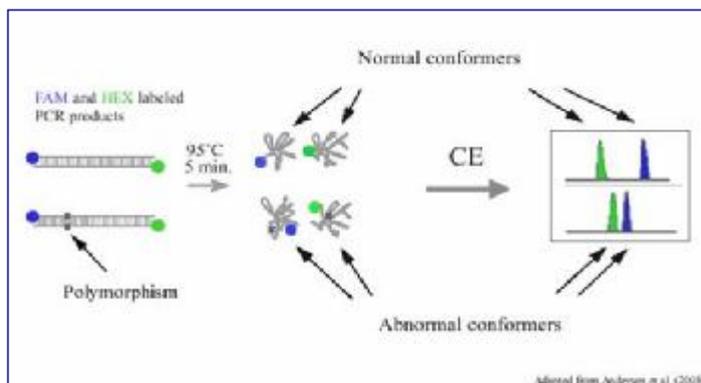
VANTAGGI E SVANTAGGI:

SSCP è una tecnica semplice da usare e l’analisi dei dati è agevole; è, però, estremamente suscettibile a piccole variazioni nelle condizioni standard.

SSCP FLUORESCENTE:

Si avvale di un sistema di elettroforesi capillare automatico.

- i primers di PCR (forward e reverse) sono marcati con fluorocromi;



- si denatura a ssDNA e si raffredda rapidamente per evitare la rinaturazione;
- si procede con elettroforesi capillare con polimero non-denaturante; un rilevatore elaborerà le fluorescenze emesse dai fluorocromi colpiti dal raggio laser e rileverà la diversa mobilità di ogni filamento marcato.

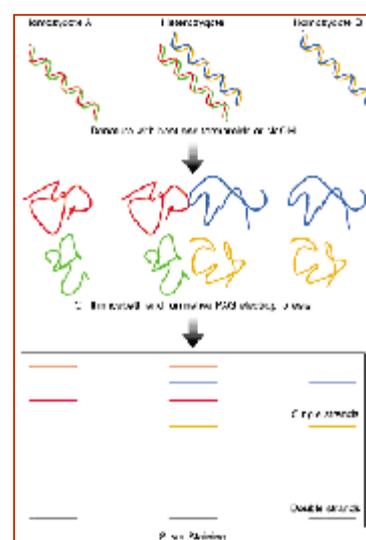
I vantaggi di tale metodica sono: la possibilità di usare temperature diverse, aumentando enormemente la sensibilità; il controllo preciso della temperatura; la grande riproducibilità; la possibilità di usare un controllo interno; la normalizzazione della mobilità con più accurata identificazione anche di mutazioni che causano solo una piccola alterazione della mobilità; la possibilità di usare anche prodotti di PCR più lunghi.

DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis)

E' una tecnica basata su una migrazione elettroforetica su gel di poliaccrilammide con gradiente di sostanze denaturanti (formamide e urea) di frammenti amplificati di DNA, i quali riducono la loro velocità di migrazione quando raggiungono una concentrazione di denaturante sul gel che corrisponda alla loro temperatura di fusione; la T_m è strettamente dipendente dalla composizione nucleotidica del DNA e, quindi, la presenza di una sostituzione di una coppia di basi in un segmento di DNA ne modifica il valore.

Di conseguenza, dopo corsa elettroforetica, “colorazione” con bromuro di etidio e rilevazione agli UV, si osserverà per il frammento recante la mutazione un pattern elettroforetico tanto più differente da quello normale quanto più la sostituzione nucleotidica avrà alterato la T_m del frammento stesso.

L'incorporazione tramite PCR di “GC-clamp” (sequenza di 40-90 coppie di basi ricche in GC ad altissima T_m) ad un'estremità del frammento di DNA in esame consente di individuare, usando un unico tipo di gradiente di denaturante, eventuali mutazioni situate in qualunque punto del frammento in esame, anche in domini ad alta T_m ; la “GC clamp”, infatti, costituendo sempre il dominio ad alta temperatura, altera il comportamento di denaturazione del frammento cui è stata



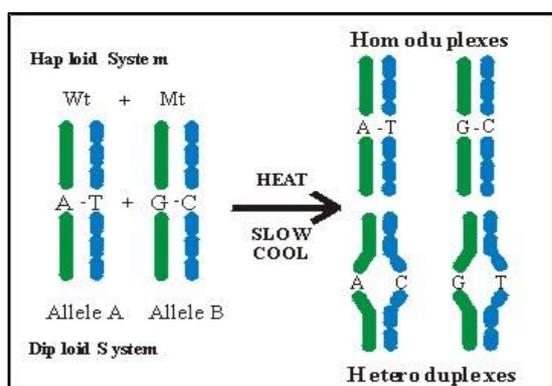
unita, rendendolo di conseguenza tutto dominio a bassa temperatura.

Il soggetto eterozigote per una mutazione o polimorfismo presenta quattro bande:

- 2 bande più veloci (omoduplex) → alleli normale e mutato;
- 2 bande più lente (eteroduplex) → alleli ibridi.

VANTAGGI E SVANTAGGI:

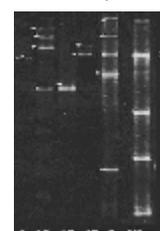
E' una tecnica laboriosa, ma utile soprattutto per geni molto lunghi, in quanto permette di restringere



la ricerca della mutazione a pochi frammenti.

TTGE (Temporal temperature gradient electrophoresis).

È una tecnica derivata dal DGGE; per ottenere la temperatura di fusione del frammento di DNA in esame, impiega un gradiente lineare e temporale di energia termica, anziché un gradiente di denaturante chimico.



DHPLC (Denaturing high-performance liquid chromatography).

Impiega il meccanismo di ripartizione in fase inversa ad accoppiamento ionico (IP-RP-HPLC) e separa e distingue le molecole di DNA in base alla loro dimensione; l'accoppiamento ionico è ottenuto con l'ausilio dello ione TEAA (tri-etil-ammonio-acetato), molecola con doppia funzionalità in grado di interagire sia con il campione da analizzare sia con il supporto cromatografico (colonna costituita da un copolimero di polistirene-divinilbenzene).

Durante l'amplificazione genica:

- 1) se il DNA non contiene mutazioni, nella fase di re-annealing si formano solo omoduplex;
- 2) nel caso in cui ci sia una mutazione in eterozigosi, oltre agli omoduplex si generano gli eteroduplex.

Nel caso dell'omozigote per la stessa mutazione non c'è la possibilità di formare direttamente gli eteroduplex; In tal caso si aggira l'ostacolo miscelando una quantità analoga di campione normale.

Come risultato cromatografico si avranno due situazioni:

- 1) il campione senza mutazione avrà un solo picco;
- 2) il campione con mutazione avrà due picchi dovuti alla formazione di omoduplex e due picchi dovuti alla formazione di eteroduplex.

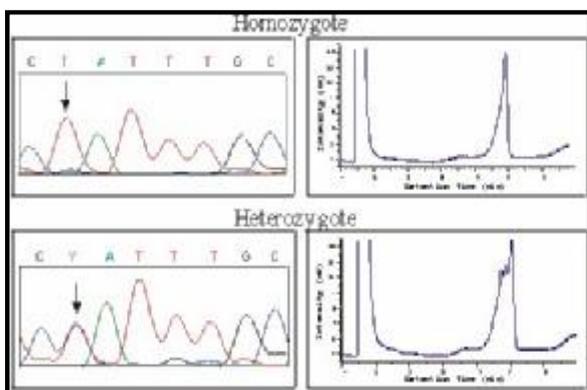
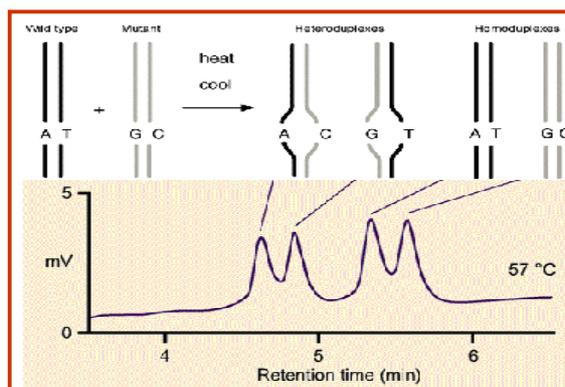
L'eluizione dei frammenti di DNA dalla colonna è ottenuta mediante un gradiente di un agente organico, l'acetonitrile, che rompe quest'interazione.

DHPLC parzialmente denaturante è capace di identificare singole sostituzioni nucleotidiche o piccole inserzioni/delezioni in regioni amplificate di un gene; si basa sul maggior tempo di ritenzione degli homoduplex rispetto agli eteroduplex all'interno di una miscela di DNA amplificato, denaturato e rinaturato. Necessita di buoni amplificati e di ottime condizioni di temperatura. Le molecole di DNA eluite possono essere rilevate attraverso gli UV o con monitoraggio fluorescente dopo il caricamento. Presenta specificità e sensibilità del 100%, ma non si presta alla tipizzazione di campioni omozigoti. È un metodo di rilevamento indiretto cui deve seguire una caratterizzazione definitiva con un metodo diretto (ARMS, sequenza).

DHPLC completamente denaturante è capace di separare corte molecole (70-80 bp) di DNA a singolo filamento che differiscono per una singola base e, quindi, può essere applicata per tipizzare campioni con mutazioni/polimorfismi noti; l'unica sostituzione non rilevata è C →G.

VANTAGGIE SVANTAGGI:

DHPLC è, dunque, un metodo efficace per rilevare mutazioni puntiformi del DNA, soprattutto per geni molto lunghi; è molto sensibile, si offre ad un alto grado di automazione ed ha costi relativamente bassi, fatta eccezione per l'acquisto e l'avvio dell'apparecchio. L'accuratezza e la sensibilità dipendono, però dalla temperatura; inoltre, DHPLC è un metodo di rilevamento indiretto cui deve seguire una caratterizzazione definitiva con metodo diretto (ARMS, sequenza).

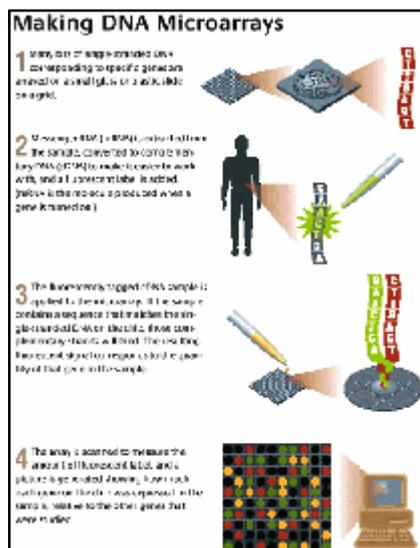


MICROARRAYS.

Gli array sono dei supporti solidi (vetro o plastica) sui quali vengono fissate da centinaia a migliaia di molecole di acidi nucleici di sequenza nota, disposte secondo una matrice di righe e colonne ordinata e definita; il principio biochimico alla base della tecnologia è il riconoscimento e l'ibridazione tra il frammento di acido nucleico fissato (detto “sonda”) ed il suo complementare (detto “target”) eventualmente presente nel campione in esame, seguiti poi dalla rilevazione del segnale fluorescente d'ibridazione.

MICROARRAY

- Ø Isolamento degli mRNA cellulari e eventuale retrotrascrizione in cDNA.
- Ø Marcatura con sostanze fluorescenti.
- Ø Ibridazione sul “ DNA microarray “
- Ø Rilevazione del segnale.
- Ø I microarrays possono misurare solo modifiche relative di espressione ma non i livelli assoluti.



Esistono due tecnologie per la produzione di microarray: spotting ed in situ.

I target, ovvero gli acidi nucleici da ibridare alle catene di cDNA ancorate al supporto solido, sono normalmente ottenuti dalla marcatura dell'mRNA proveniente da un dato organismo per mezzo di molecole fluorescenti.

Sonde e target sono messi a contatto per fare avvenire la reazione di ibridazione e, dopo alcuni lavaggi per rimuovere i prodotti aspecifici, l'array viene passato attraverso uno scanner per la misura dei segnali fluorescenti.

L'intensità dei pixel di ciascuna immagine è proporzionale al numero di molecole di tracciante presenti sullo spot e cioè al numero di probes che hanno ibridato le sonde ancorate al supporto; livelli diversi di fluorescenza indicano, pertanto, livelli diversi di ibridazione e, quindi, di espressione genica.

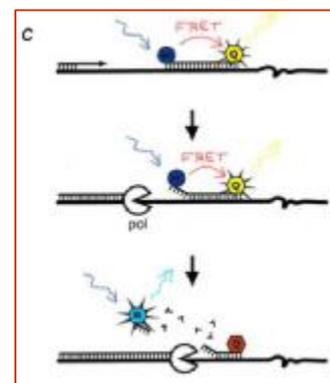
VANTAGGI E SVANTAGGI:

I microarray possono essere impiegati sia in studi di espressione genica per analizzare il profilo trascrizionale di un campione biologico sia in studi di analisi della variabilità genetica (identificazione di mutazioni o polimorfismi nella sequenza genomica target); possono, però, misurare solo modifiche relative di espressione e non i livelli assoluti.

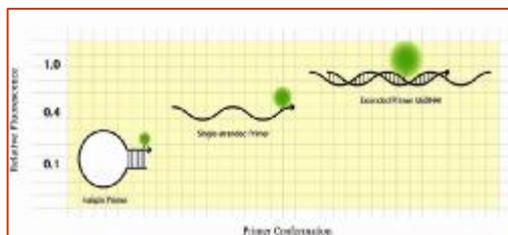
REAL-TIME PCR.

La chimica di reazione di questa tecnica prevede l'uso di sonde legate a molecole fluorescenti.

Le **sonde ad idrolisi** hanno una molecola “reporter” al 5' ed una molecola “quencher” al 3' che impedisce al reporter di emettere liberamente il segnale; quando la polimerasi sintetizza il filamento complementare al DNA stacca la sonda da quest'ultimo e la taglia; in questo modo il reporter passa in soluzione aumentando l'intensità della fluorescenza che sarà direttamente proporzionale alla concentrazione di amplificato specifico.

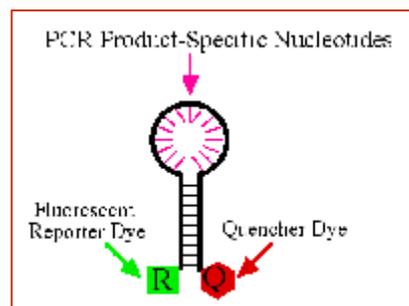


I **Light Upon Extension Primers (LUX)** hanno una chimica a fluorescenza che consente di



rilevare il segnale senza ricorrere a sonde; la fluorescenza del reporter al 3' è assorbita quando il primer non è esteso dalla presenza di una struttura secondaria a forcina introdotta artificialmente in 5' (il quencher è assente); l'estensione del primer apre la forcina e si ha l'emissione della fluorescenza.

Le **sonde LNA** sono una variante delle sonde ad idrolisi; l'introduzione di un legame fosfodiesterico intramolecolare a livello dello zucchero desossiribosio irrigidisce la struttura e si lega più stabilmente alla sequenza target. Ciò rende le sonde LNA fortemente indicate nell'analisi di mutazioni puntiformi, ovvero nella discriminazione allelica in multiplex.



La Real-time PCR può essere condotta in "**multiplex**", cioè in un singolo tubo di reazione può essere rilevato più di un prodotto di PCR; ogni prodotto di PCR è associato ad un particolare fluorocromo, la cui emissione è rilevata dall'amplificatore per la real-time PCR.

VANTAGGI E SVANTAGGI:

A differenza della PCR, consente di misurare la quantità di amplificato ad ogni ciclo; necessita, però, di una precisa determinazione di una curva standard di riferimento.