# Organizzazione tecnologica e aspetti metodologici di rivelazione molecolare nella trombofilia genetica

**S. Ursi, N. Ortolano, G. Tomei**

*Laboratorio di Patologia Clinica II, Centro F.C.S.A. n. 271, Chieti*

## Introduzione

Viene definita trombofilia la tendenza, determinata da cause congenite o acquisite, al tromboembolismo venoso e, meno frequentemente arterioso.
Si tratta di una condizione diatesica caratterizzata dalla comparsa di manifestazioni cliniche anche in età giovanile (prima di 40-45 anni), senza cause apparenti e con tendenza a recidivare.
La trombofilia implica, solitamente, una alterazione dell'equilibrio del sistema emostatico, legata o a un difetto degli anticoagulanti naturali o a una alterazione dei substrati degli stessi.
Tuttavia i numerosi meccanismi compensatori presenti nella "cascata coagulativa" rendono episodica la trombosi.
Questo, almeno, nelle condizioni di più comune osservazione.
Diversa è la situazione che si osserva nei deficit in omozigosi o nelle combinazioni di più difetti.
*Uno degli aspetti più interessanti nello studio della trombofilia, specialmente dal punto di vista laboratoristico molecolare, è rappresentato dalle condizioni eredofamiliari poste alla base dei difetti delle proteine della coagulazione.*

## Cause di trombofilia genetica: basi molecolari

1. ***Mutazioni geniche che inducono un difetto quantitativo o qualitativo delle proteine ad attività anticoagulante:***
   – *antitrombina* (ATIII) nella popolazione generale la prevalenza del deficit è stimata intorno a 1:2.000-1:5.000. La trasmissione del difetto è autosomica dominante. La maggior parte dei soggetti sono eterozigoti, con livelli di ATIII plasmatica fra 40%-70% del normale. Sono state identificate circa 100 mutazioni. In genere, le mutazioni (delezioni, inserzioni e mutazioni nonsense) agiscono in maniera da impedire la sintesi della proteina da parte dell'allele mutato. Vi sono anche mutazioni missense che non arrestano la sintesi della proteina ma producono alterazioni nella sua conformazione e stabilità.
   – *proteina C coagulatoria* nella popolazione generale la prevalenza del difetto è stimata intorno 1:500-1:1000. Sono state identificate circa 200 mutazioni. Sono frequenti le mutazioni che arrestano la sintesi della proteina (nonsense, delezioni), ma è possibile osservare anche mutazioni puntiformi a cui corrispondono sostituzioni aminoacidiche della proteina matura che alterano il corretto dimensionamento della proteina e la rendono più instabile.
   – *proteina S coagulatoria* nella popolazione generale la prevalenza è di più incerta determinazione esistendo dati non sempre concordanti. Approssimativamente, tuttavia, essa può essere stimata nell'ordine di quella già segnalata per la Proteina C. Finora, le mutazioni identificate non raggiungono il numero di 100 (inserzioni, delezioni, mutazioni aminoacidiche).
2. ***Mutazioni geniche che inducono un difetto dei substrati degli anticoagulanti naturali (Fattore V) o un eccesso di fattori procoagulanti (Fattore II: protrombina).***
   – La maggior parte dei casi di resistenza alla proteina C attivata è associata ad una sostituzione nucleotidica del gene del fattore V sito nel cromosoma 1 esone 10 (G1691 A), che porta al rimpiazzo della arginina sul residuo 506 della proteina matura con la glutamina che la rende parzialmente insensibile alla attività inattivante del complesso Proteina C-S. E' assai frequente (ca. 5%) nella popolazione di origine Caucasica. La trasmissione della mutazione è autosomica dominante.
   – La sostituzione nucleotidica di guanina con adenina nella posizione 20210 della regione 3' non trascritta del gene della protrombina ha una frequenza nella popolazione generale sovrapponibile, all'incirca alla precedente e tipica di un polimorfismo con un gradiente di frequenza geo-

grafica che appare inverso a quello del fattore V Leiden ( più frequente nel Sud Europa che nel Nord). Essa determina un eccesso di funzione della protrombina, maggiore reattività e aumentati livelli plasmatici della proteina. I portatori della mutazione hanno un aumento del rischio di tromboembolismo venoso che varia da 2 a 7 volte quello dei controlli senza mutazione, rischio simile o leggermente inferiore a quello riscontrato per il a fattore V mutato.

3. ***Iperomocisteinemia.*** L'omocisteinemia è un aminoacido solforato presente nel plasma dell'individuo normale in concentrazioni fra 5 e 15 $\mu$mol/L. Nel metabolismo dell'omocisteina sono coinvolti 3 enzimi: la metilentetraidrofolato reduttasi (MTHFR), la metionina sintetasi e la cistationina-ß-sintetasi. La carenza o anormalità funzionale di questi enzimi determina un difettoso metabolismo dell'aminoacido e quindi il suo accumulo nel plasma in elevate concentrazioni, che determinano uno stato trombofilico, con meccanismi non completamente noti. Va, tuttavia, detto che la reale utilità della indagine genetica riferita a questi enzimi è, tuttora, sub iudice.

**Organizzazione tecnologica**

L'organizzazione di un laboratorio di medicina molecolare finalizzato ad indagini genetiche di interesse trombofilico, comporta l'esame di almeno cinque parametri:

1. *Il numero di campioni da processare*
2. *La generazione tecnologica delle apparecchiature in dotazione e i relativi tempi tecnici d'esecuzione dell'indagine molecolare (anche in riferimento al numero dei campioni)*
3. *La necessità di razionalizzare i costi (apparecchiature, reattivi)*
4. *La qualificazione del personale, il quale dovrà essere :*
   – *Dedicato*
   – *Aggiornato*
   – *Capace di comunicare (genetic counseling).*
5. *VEQ e CQ interni (controlli qualità)*

Tutte le tecniche utilizzano la reazione polimerasica a catena (P.C.R.) per amplificare DNA genomico; introdotta nel 1983 la PCR (reazione a catena della polimerasi) è un metodo rapido e versatile per amplificare in vitro sequenze bersaglio presenti in un campione eterogeneo di molecole di DNA (DNA genomico o una popolazione complessa di cDna). Per ottenere questo tipo di amplificazione selettiva è necessario conoscere una sequenza di innesco (primer) che permetta avviare la reazione di polimerizzazione. La PCR è una reazione enzimatica in cui una DNA Polimerasi Termostabile in presenza di una coppia di Primers, di un mix dei quattro deossinucleotidi trifosfato (ATGC) e, per finire, di opportuni cofattori è in grado di copiare la sequenza bersaglio. La PCR viene definita come reazione a catena in quanto consiste nel susseguirsi ciclico di tre processi che si ripetono (30-35 volte nel caso dei markers trombofilici). Questi cicli sono composti da:
– denaturazione (separazione delle due emieliche DNA)
– annealing.( appaiamento dei Primers)
– estensione (sintesi di due nuove catene DNA)
Tuttavia, se le reazioni che portano alla amplificazione del DNA sono, sostanzialmente, sempre le stesse, l'elemento che, invece, distingue le varie metodiche è rappresentato dalla fase di rivelazione dell'amplificato finale che contempla numerose varianti. Sorvolando sulle tecniche che possono ritenersi, ormai, obsolete, di prima generazione, il sistema attualmente più diffuso utilizza tecniche di seconda generazione. La strategia di questo sistema può seguire due vie per giungere a rivelare le mutazioni di interesse per la trombofilia e sono riassunte nello schema che segue(3):

**1.** Amplifica, Esamina e Rivela
   – Amplifica in PCR il frammento del gene in esame
   – Esamina con un reagente allele-specifico
   – Rivela i risultati dell'indagine
**2.** Amplifica differenzialmente e rivela
   – Amplifica *differenzialmente* con primer allele-specifici
   – Rivela i risultati dell'indagine

Esaminate singolarmente le due strategie sopra descritte, possiamo osservare che:

**a)** nel caso della amplificazione differenziale la tecnica adoperata è sostanzialmente una e prevede l'utilizzo di primers per la PCR costruiti in modo tale che venga amplificato con successo solo l'allele desiderato (mutato o wt). Successivamente i prodotti della reazione della PCR vengono visualizzati attraverso l'elettroforesi su gel (anche di agarosio a bassa risoluzione), e la colorazione con etidio bromuro. Questa strategia può essere definita come Competitive Oligonucleotide Priming ovvero Mismatch Amplification Mutation Assay (Tempi tecnici circa 8 ore)

**b)** nel caso della differenziazione post amplificativa le varianti tecniche possono essere sottodivise in:
   – (RFLP) Polimorfismo della lunghezza dei frammenti di restrizione (Classica ovvero con primer fluorescente) (Tempi tecnici 7-8 ore)
   – (ASO) Ibridazione Indiretta con Sonde oligonucleotide Allele-Specifico nelle due possibili varianti di: -DOT-BLOT (su striscia ) (Tempi tecnici circa 6 ore) che si dimezzano con le multi-

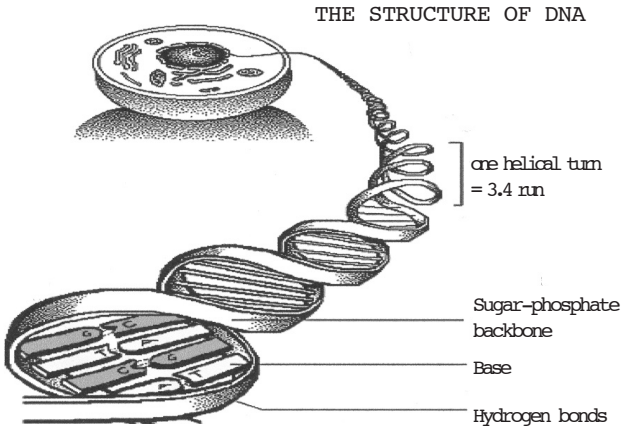
sonde precedute da metodologia PCR multiplex) -DEIA in micropiastra ELISA (Tempi tecnici 11-12 ore)

**La fase prenalitica**

Per ciò che attiene agli aspetti organizzativi preanalitici vanno rispettati i seguenti principi:
1. La tipologia del campione: Sangue intero in EDTA
2. Le condizioni di trasporto: A 2-8°C
3. La stabilità del campione:
   4 ore a temperatura ambiente
   3 giorni a 2-4°C
   2 mesi in congelatore a –20°C

**La fase estrattiva**

Sono disponibili in commercio numerosi sistemi standardizzati tra cui ricordiamo:
- Sistema con particelle solide di silice
- Sistema di precipitazione con solventi organici (termolisi alcalina e o enzimatica)
- Sistema a colonne filtranti a membrana silice
- Sistema di cattura con biglie magnetiche




**La fase amplificativa**

È rappresentata dai cicli termici (di riscaldamento e raffreddamento) "a catena" a cui abbiamo già fatto riferimento. Questi vengono svolti all'interno di specifici apparecchi programmabili (Thermal-Cycler) a seconda delle necessità.

**La fase rivelativa**

La più comune metodologia tecnologica della strategia che abbiamo definito come: Amplifica, Esamina e Rivela è il *polimorfismo della lunghezza di restrizione (RFLP)* nella quale la mutazione genica modifica il sito di riconoscimento di una specifica endonucleasi di restrizione che, pertanto agirà frammentando l'amplificato solo nel caso che la mutazione sia presente. I frammenti derivanti dalla digestione enzimatica produrrà frammenti di restrizione di dimensioni note, i quali possono essere rivelati tramite elettroforesi su gel di poliacrillamide al 10% o di agarosio al 4% (nusive) seguita da colorazione con etidio bromuro. Dunque l'enzima rappresenta lo strumento di esame, peraltro estremamente specifico, mentre l'elettroforesi su gel il sistema di rivelazione.
Nella tecnologia con *oligonucleotide allele-specifico (ASO)* il DNA in esame viene amplificato come di norma e, successivamente, fissato su una superficie solida (nitrocellulosa, nylon o pozzetti). In seguito si provvede a cimentare il prodotto della amplificazione, così fissato, con una sonda allele specifica. I risultati dell'eventuale legame sono rivelati con un sistema enzimatico. I prodotti di PCR, che al termine dei cicli amplificativi si ricostituiscono in doppio filamento, vengono separati in filamenti singoli con un tampone a pH alcalino e alla giusta temperatura. Per mezzo di una procedura di Dot blotting i prodotti di PCR provenienti da numerosi pazienti nonchè dai controlli possono essere messi su di un singolo filtro di nitrocellulosa o nylon. Alternativamente uno dei primer può essere marcato con biotina, permettendo alla streptavidina, legata preventivamente sulla striscia o sul pozzetto (DEIA), la cattura della catena prodotta con la PCR e la sua contemporanea rivelazione. Le sonde oligonucleotidiche si ibridano con le regioni complementari dei prodotti della PCR a singolo filamento. L'ibridazione ha tipicamente luogo in condizioni di alta forza ionica e alta concentrazione colloide per velocizzare l'associazione sonda bersaglio. Le superfici vengono lavate in condizioni di bassa forza ionica o di temperature più elevate per rimuovere la sonda legata in modo aspecifico.
Nella terza generazione tecnologica di rivelazione molecolare, spicca il sistema *Real-Time* inizialmente adoperato per determinazioni di tipo quantitativo in Virologia o Microbiologia con metodologia chimica di tipo intercalante (SYBR) o oligo-probe-assay.
Oggi con il sistema FRET è possibile rilevare genotipi o mutazioni puntiformi con l'ausilio di sonde di ibridazione e analisi delle curve di dissociazione, un potente mezzo per la caratterizzazione del prodotto PCR anche di tipo qualitativo. I tempi tecnici di un sistema completo si aggirano intorno alle 2 ore, poiché sono dotati di apparati termociclatori con "rumping time" fino a 20°C al secondo; inoltre gli apparecchi "Real Time" posseggono fluorimetro a microvolume e multicampione con un rapido controllo della temperatura. Il principio delle sonde di ibridazione è molto semplice, la sonda "sensore" copre la sequenza variabile e la sonda di "ancoraggio" vicina forma un legame sensibilmente più forte in modo tale che l'analisi dei punti di dissociazione considera solo la sonda "sensore". I prodotti ibridati vengono

lentamente riscaldati misurando la fluorescenza emessa in tempo reale. Ogni variazione di sequenza nella regione della sonda "sensore" determina un abbassamento della temperatura di dissociazione. Un campione omozigote determinerà un punto di dissociazione unico ad una temperatura inferiore. La sostituzione di una singola base determina una differenza di temperatura di dissociazione di 2-10°c a secondo della base sostituita e della sequenza ad essa vicina.
In commercio, tuttavia sono comparse alternative, sempre di terza generazione rappresentate, ad esempio, dal *Minisequencing*. La metodica del minisequencing, esegue una reazione di PCR in multiplex, praticamente consistente in una reazione di sequenza mediante la chimica del ddTerminator. Dopo l'annealing del primer nel templato, durante la fase di estensione avviene l'incorporazione di un singolo ddNTP marcato con un colorante fluorescente, che è complementare alla base sede della mutazione da ricercare.
Poiché il primer è disegnato in maniera tale da appaiarsi al DNA stampo immediatamente a monte del sito di mutazione, e poiché la SnaPshor ready Reaction Mix (Mix di reazione contenete la Taq, FS, Reaction Buffer e dideoxinucleotidi marcati con sostanza fluorescente) non contiene dNTP, l'incorporazione del ddNTP marcato avviene solamente a livello del sito di mutazione, con conseguente blocco della reazione di sequenza.
Questo processo viene ripetuto in cicli successivi di estensione e terminazione producendo, così, i frammenti amplificati marcati che verranno analizzati ed evidenziati dopo corsa elettroforetica al genescan e successiva lettura del cromatogramma finale da parte del software.

## Conclusioni

È, oggi, disponibile, una vasta gamma di soluzioni tecnologiche che consentono di organizzare un laboratorio di medicina molecolare che si occupi di trombofilia genetica.
Altresì le problematiche tecnologiche non rappresentano che uno degli aspetti da considerare alla base delle singole scelte che dovranno tenere conto anche:

- della domanda e della reale necessità delle indagini
- degli aspetti economici e di budget
- delle necessità formative e di expertise
- delle possibilità organizzative del laboratorio.

La scelta delle singole soluzioni, pertanto, non può essere commisurata alla volontà di fare "tutto a tutti" ma deve, al contrario, ispirarsi ad un principio che potremmo definire "fare quel che serve, a chi serve, nella maniera migliore e, ove possibile, più economica".
È, pertanto, auspicabile che, specie nel campo della diagnostica molecolare: per i suoi costi, per le sue implicazioni cliniche, per la sua complessità, prevalga sulla autoreferenzialità dei singoli laboratori la individuazione di strutture "di riferimento" secondo una logica di tipo dipartimentale o, ancora meglio, transdipartimentale.
Solo un approccio di questo tipo, allo stato delle cose, può rendere la diagnostica molecolare, anche quella applicata alla trombofilia, una procedura utile, efficace ed economicamente percorribile.

**Ringraziamenti**
*Ringraziamo, Gianfranco Vitullo, M.D., per la lettura critica del manoscritto.*

## Bibliografia

1. Marin MG. Diagnostica di laboratorio, tecniche di amplificazione genica dal laboratorio alla pratica clinica. Milano: SORBONA ed.;1999.
2. Verna R. La diagnostica di laboratorio con i metodi della biologia molecolare. Padova: Piccin Editore publ.;1998
3. Lutz CT. Dosaggi basati sul DNA per la rivelazione di genotipi del fattore V della trombosi. J Clin Ligand Assay 1997;19:230-9.
4. Tripodi A, Mannucci PM. Laboratory investigation of thrombophilia, Clin Chem 2001;47:1597-606.
5. www.clonit.it Principio del minisqencing applicato allo studio genetico della Trombofilia (ultimo accesso 13 settembre 2003).
6. www.roche.it Sistema Real-Time in trombofilia (ultimo accesso 13 settembre 2003).