



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DELLA BASILICATA  
- POTENZA -**

**\*\*\***

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE  
CORSO DI LAUREA IN BIOTECNOLOGIE**

**TESI DI LAUREA IN GENETICA GENERALE**

*Biotechnologie di base applicate alla diagnostica  
clinica: la Fibrosi Cistica*

**RELATORE:  
Chiar.ma Prof.ssa Maria Brigida Lioi**

**CORRELATORE:  
Dott. Domenico Dell'Edera**

**Laureanda:  
Laura Martorano  
Matr. 36619**

---

**ANNO ACCADEMICO 2011 – 2012**

A coloro con  
cui condivido  
soltanto il mio  
cuore o anche  
parte del mio  
DNA.



**Fryderyk Chopin**

<b>SOMMARIO</b>	
<b>INTRODUZIONE</b>	<b>4</b>
<b>CAPITOLO 1: LA FIBROSI CISTICA</b>	<b>5</b>
1.1 GENERALITÀ	5
1.2 EPIDEMIOLOGIA DELLA FIBROSI CISTICA	6
1.3 MECCANISMO FISIOLÓGICO E MANIFESTAZIONI CLINICHE	6
CELLULE EPITELIALI	6
IL TRASPORTO DEL CLORO: CANALE CFTR	7
CONSEGUENZE DEL MAL FUNZIONAMENTO DI CFTR	9
1.4 IL MECCANISMO PATOGENETICO DELLA FC	10
IL GENE E LA PROTEINA CFTR	10
CLASSIFICAZIONE DELLE MUTAZIONI	13
CORRELAZIONE GENOTIPO FENOTIPO	14
1.5 LA DIAGNOSI	15
IL TEST DEL SUDORE	15
LO SCREENING NEONATALE	17
TECNICHE DI ANALISI GENETICA MOLECOLARE	18
1.6 TRATTAMENTO DELLA FIBROSI CISTICA	18
NUOVE STRATEGIE TERAPEUTICHE	19
<b>SCOPO DELLA TESI</b>	<b>22</b>
<b>CAPITOLO 2: TECNICHE DI ANALISI GENETICA MOLECOLARE</b>	<b>23</b>
2.1 METODICHE PER ESTRAZIONE DEL DNA	23
2.1a Estrazione del DNA con metodica fenolo-cloroformio	23
2.1b Estrazione del DNA	26
2.1c Estrazione di DNA da sangue intero con il kit NUCLEAR LASER MEDICINE®	27
2.1d Estrazione di DNA da tampone buccale	33
2.4 DETERMINAZIONE DELLA PUREZZA DEL CAMPIONE ESTRATTO	34
2.3 AMPLIFICAZIONE DEL DNA ESTRATTO MEDIANTE PCR	35
2.3a Protocollo di amplificazione	35
2.3b Preparazione delle mix per la PCR	35
2.4 VERIFICA DEI PRODOTTI DI AMPLIFICAZIONE: ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO AL 3%	37
2.4a Preparazione del tampone TBE1X	37
2.4b Preparazione del gel di agarosio al 3%	38
2.4c Preparazione dell'amplificato e corsa elettroforetica	40
2.5 RILEVAZIONE DELLE MUTAZIONI:	
REVERSE DOT BLOT	42
2.5a Procedura del RDB	43
2.5b Interpretazione dei risultati	50
2.6 AMPLIFICAZIONE E RILEVAZIONE DELLE 20 MUTAZIONI REGIONE SPECIFICHE	52
2.6a Procedura di amplificazione	52
2.6b Visualizzazione su gel di agarosio al 2%	53
2.6c Procedura per l'ibridazione inversa	54
<b>CAPITOLO 3: ESEMPIO DI CASO CLINICO RICONTRATO DURANTE IL TIROCINIO</b>	<b>56</b>
3.1 PRESENTAZIONE DEL CASO IN OGGETTO	56
3.2 ALBERO GENEALOGICO DELLA FAMIGLIA IN ESAME	57
<b>BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA</b>	<b>58</b>

## INTRODUZIONE

Il genoma umano, al pari di quello degli altri esseri viventi, è un'entità dinamica che nel corso dell'evoluzione è andata, e va tutt'ora, incontro a variazioni delle sequenze nucleotidiche.

La costituzione genetica di un individuo viene denominata genotipo, mentre le manifestazioni osservabili derivanti dall'interazione del genotipo con l'ambiente vengono definite fenotipo.

I cambiamenti della sequenza del DNA possono essere “privi di effetti fenotipici”: in tal caso si tratta di **varianti non patologiche** dette polimorfismi se si presentano nella popolazione in esame con una frequenza superiore all'1%. Se la frequenza è inferiore all'1% esse sono classificate come “**varianti private**”.

Quando la variazione causa un mal funzionamento del gene interessato, questa viene definita **mutazione patologica**, in quanto influenza la funzione e/o la quantità del prodotto genico con conseguenze cliniche sul fenotipo.

I progressi esponenziali compiuti negli ultimi anni nel campo della genetica molecolare hanno consentito l'identificazione di numerosi meccanismi patologici alla cui base vi sono alterazioni genetiche.

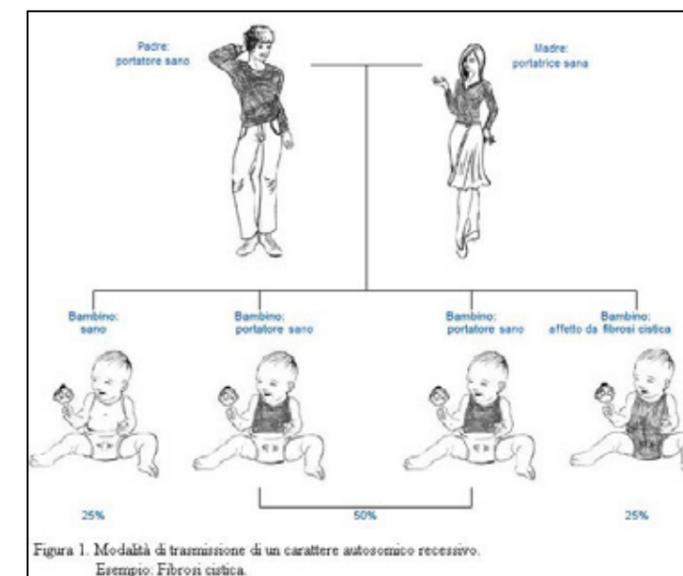
Da quanto detto si evince che è fondamentale correlare il dato molecolare ottenuto con il dato clinico (genotipo-fenotipo), vale a dire prevedere le conseguenze fenotipiche di una specifica mutazione in un dato gene (prognosi).

## CAPITOLO 1

### LA FIBROSI CISTICA

#### 1.1 GENERALITÀ

La Fibrosi Cistica (FC) è una malattia ereditaria a trasmissione autosomica recessiva. Individui affetti (omozigoti recessivi: aa) sono figli di genitori entrambi portatori sani (eterozigoti: Aa) del “gene malattia” (fig.1).



Tra le malattie congenite ereditarie, la FC è sicuramente una delle più serie e comporta un impegno assistenziale e terapeutico che si protrae per tutta la vita. Lo sviluppo delle conoscenze sulla causa e sulle manifestazioni della FC ha consentito un miglioramento della qualità e della durata della vita dei malati, ma per molti aspetti la patologia risulta ancora poco conosciuta e, a volte, sottodiagnosticata o diagnosticata tardivamente. Ogni anno vengono fatte oltre 150 nuove diagnosi e l'età mediana alla diagnosi è di circa 9 mesi<sup>3</sup>.

## 1.2 EPIDEMIOLOGIA DELLA FIBROSI CISTICA

La Fibrosi Cistica è la malattia autosomica recessiva più comune nella popolazione italiana. È verosimile che i dati raccolti nel registro italiano della fibrosi cistica<sup>1</sup> sottostimino il numero degli affetti poiché il potenziale diagnostico della malattia è soggetto ad un'ampia variabilità regionale. Sembra perciò più affidabile fare riferimento a programmi di *screening* neonatale che riportano un'incidenza compresa tra 1/2.730 e 1/3.170 nati<sup>2</sup>. Da questi dati si può desumere una frequenza di portatori compresa tra 1/26 e 1/30. Nelle popolazioni asiatiche la frequenza dei pazienti affetti da FC è bassa<sup>3</sup>.

Ogni anno vengono fatte oltre 150 nuove diagnosi e l'età mediana alla diagnosi è di circa 9 mesi<sup>4</sup>.

L'aspettativa di vita rimane poco prevedibile individualmente; mediamente è ridotta rispetto a quella della popolazione generale, ma va progressivamente aumentando. Dai dati del Registro Nazionale emerge che nei primi anni '80 il 50% dei malati non superava i 14 anni, mentre nel 1997 la stessa quota supera i 20 anni, con qualità di vita soddisfacente tranne che negli stadi di acutizzazione o terminali della malattia.

## 1.3 MECCANISMO FISIOLOGICO E MANIFESTAZIONI CLINICHE

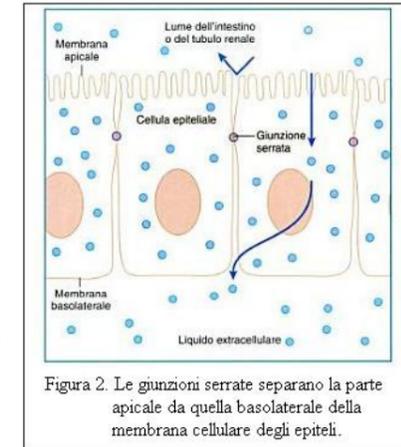
### CELLULE EPITELIALI

Le cellule epiteliali rappresentano una barriera continua tra l'interno dell'organismo e l'ambiente esterno.

Esse sono caratteristicamente POLARIZZATE, poiché le giunzioni serrate, che collegano tra loro cellule adiacenti, suddividono la membrana di ogni cellula epiteliale in una parte apicale e una parte basolaterale (fig.2).

La membrana delle cellule epiteliali contiene proteine di trasporto specializzate, le quali regolano gli scambi di sostanze fra l'interno e

l'esterno della cellula. I tessuti epiteliali, pur appartenendo ad organi differenti, presentano medesime proteine di trasporto. Per esempio, nell'epitelio delle ghiandole salivari, delle ghiandole sudoripare, dei dotti pancreatici e dei dotti biliari si riscontrano identici canali di trasporto del cloro. Difetti genetici a carico di queste proteine di trasporto (come per es. il canale CFTR) si ripercuotono su tutti gli organi in cui esse sono presenti.

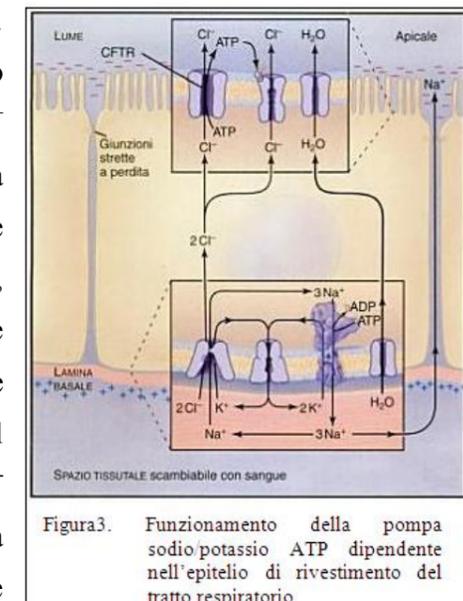


### IL TRASPORTO DEL CLORO: CANALE CFTR

Il **trasporto del cloro** ha un compito cruciale nel determinare lo stato fisico delle secrezioni degli epitelii e lo stato di idratazione della superficie dei rivestimenti epiteliali degli organi cavi o tubolari del nostro organismo. Il passaggio del cloro, attraverso la superficie apicale delle cellule, avviene mediante un meccanismo di trasporto attivo (ATP-dipendente)<sup>5</sup>.

Normalmente, le cellule di rivestimento del tratto polmonare e gastrointestinale utilizzano un sistema di pompe e trasportatori comuni per secernere Cloruro di sodio (NaCl) ed acqua (H<sub>2</sub>O) nelle loro superfici apicali (fig.3).

Le pompe sodio/potassio ATP dipendenti (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasi), presenti sulla membrana basolaterale delle cellule epiteliali, instaurano un gradiente elettrochimico di Na<sup>+</sup>, che viene sfruttato dal sintrasportatore Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> della membrana basolaterale per prendere



Na<sup>+</sup> insieme agli ioni K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup>. Il movimento verso l'interno del Na<sup>+</sup> secondo il suo gradiente elettrochimico porta all'ingresso di K<sup>+</sup> e Cl<sup>-</sup> contro i loro gradienti, provocando un eccesso di Cloruro di potassio (KCl) nella cellula. Il Cl<sup>-</sup> in eccesso rimane nella cellula. La proteina transmembrana CFTR si comporta come un canale Cl<sup>-</sup>. Quando la protein-chinasi fosforila il dominio regolatore e l'ATP si lega ai domini citoplasmatici, un cambio conformazionale apre il canale del Cl<sup>-</sup> attraverso la membrana. Il Cl<sup>-</sup> si muove secondo il suo gradiente elettrochimico fuori dalla cellula, portando una carica all'esterno. L'intero epitelio si polarizza, con il lume elettricamente negativo in relazione al compartimento extracellulare fluido. Questa forza elettrica trainante permette al Na<sup>+</sup> di spostarsi tra le cellule, dal compartimento extracellulare fluido, attraverso giunzioni a perdita (*leaky*), alla superficie dell'epitelio. Il Cloruro di sodio sulla superficie apicale crea una forza osmotica che trascina l'acqua secondo il suo gradiente di concentrazione attraverso le cellule verso l'esterno grazie ai canali acquosi. Sembra anche che il CFTR inibisca i meccanismi di trasporto che riassorbono i fluidi dal lume dell'epitelio. Un equilibrio tra questa secrezione e il riassorbimento dei fluidi, di norma, mantiene la superficie dell'epitelio adeguatamente idratata, permettendo alle ciglia di liberare i polmoni da batteri e secrezioni ed ai dotti del pancreas di secernere enzimi digestivi<sup>6</sup>.

L'alterato controllo del movimento del cloro attraverso questa pompa fa diminuire l'idratazione delle mucose (la quantità di ioni ed acqua sulla superficie cellulare e nelle varie secrezioni epiteliali).

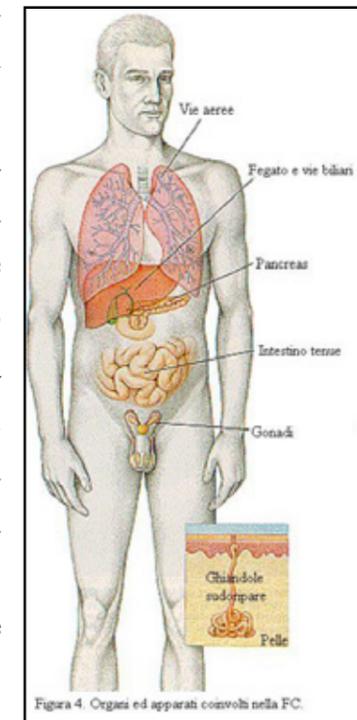
## CONSEGUENZE DEL MAL FUNZIONAMENTO DI CFTR

Un'alterazione del canale CFTR causa **danni** importanti in vari distretti del nostro organismo (fig.4). Tuttavia, esistono alcune forme della patologia atipiche o criptiche, con una sintomatologia lieve, eventualmente limitata ad un solo organo. Sono considerate **forme atipiche** sia l'infertilità maschile da assenza dei dotti deferenti (CBAV), sia una forma di pancreatite cronica ricorrente priva di insufficienza pancreaticata.

La **forma clinica classica** è caratterizzata da:

1. Broncopneumopatia cronica ostruttiva.
2. Sinusite cronica.
3. Insufficienza pancreaticata.
4. Azoospermia.
5. Alterata concentrazione di elettroliti nel sudore<sup>7</sup>.

I sintomi più comuni si manifestano a livello respiratorio (tosse persistente e catarro), a livello intestinale (feci frequenti ed abbondanti, addome gonfio, occlusioni intestinali e mancanza di appetito) ed a livello sistemico (arresto della crescita e perdita di peso) (tab.1).



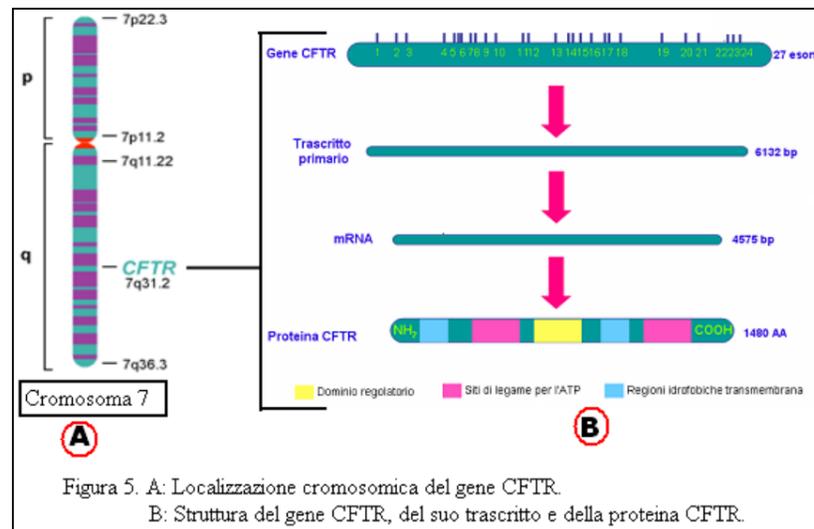
ORGANO	ANOMALIA	SINTOMI
Ghiandole sudoripare	Ipersalinit� sudorale	Collasso da calore
Pancreas	Alterazione secrezione enzimi e insulina	Maldigestione Diabete
Intestino	Muco intestinale molto denso	Occlusione intestinale
Fegato e vie biliari	Bile estremamente densa	Cirrosi biliare Calcolosi biliare
Naso/seni paranasali	Secreti densi	Sinusite cronica Poliposi nasale
APPARATI	ANOMALIA	SINTOMI
Apparato broncopolmonare	Muco denso Infezioni respiratorie ricorrenti Infiammazione	Broncopneumopatia cronica
Apparato riproduttivo maschile	Ostruzione vasi deferenti	Infertilit� Sessualit� normale
Apparato riproduttivo femminile	Muco cervicale denso	Ridotta fertilit� Sessualit� normale

Tabella 1. Organi ed apparati coinvolti nella Fibrosi Cistica

## 1.4 IL MECCANISMO PATOGENETICO DELLA FC

### IL GENE E LA PROTEINA CFTR

Il gene che codifica per la proteina CFTR   stato mappato nel 1989 e sequenziato nel 1991. Esso   localizzato sul cromosoma 7, in posizione q31.2;   composto da 27 esoni e produce un mRNA di 6,5 Kb (fig.5).



Il prodotto genico di CFTR   una proteina di 1480 aminoacidi, che ha sede all'interno della membrana apicale delle cellule degli epitelii e funge da canale transmembrana degli ioni Cl<sup>-</sup>.

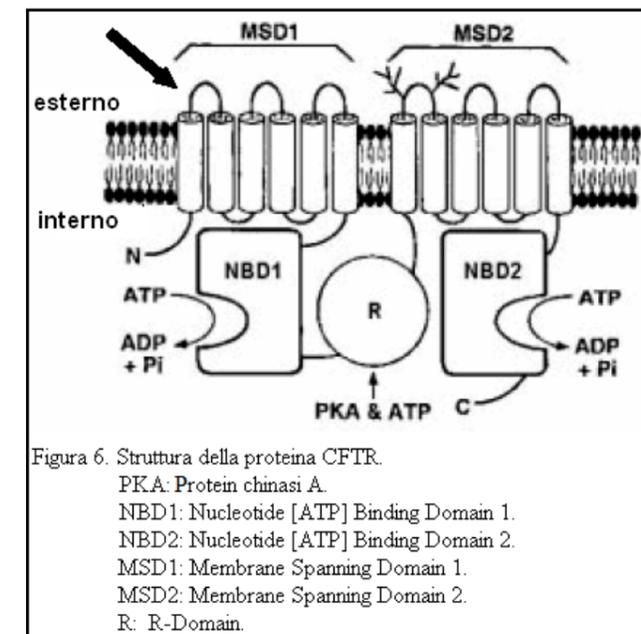
Durante lo sviluppo fetale, l'espressione del gene CFTR   stata accertata dalla 18<sup>a</sup> settimana nel pancreas, nei dotti genitali, nel

polmone e nell'intestino<sup>8</sup>: segno dell'importanza del suo prodotto finale e della variet  di funzioni che quest'ultimo svolge.

Tale polipeptide   fondamentale al fine di regolare gli scambi elettrolitici tra l'interno e l'esterno delle cellule ed   formato da 2 regioni simili, ognuna delle quali contenente una regione nucleotide-legante (**NBD**: Nucleotide [ATP] Binding Domain), che idrolizza ATP, ed un dominio di legame di membrana (**MSD**: Membrane Spanning Domain), in aggiunta ad una quinta regione, denominata dominio di regolazione (**R-Domain**).

L'R-Domain   codificato dall'esone 13 e contiene al suo interno substrati di legame multipli per la Proteinchinasi A e la Proteinchinasi C, peculiarit  esclusiva di questa proteina rispetto alle altre componenti della superfamiglia di proteine di trasporto ABC (ATP Binding Cassette).

Il canale ionico risulter  aperto ogni volta che una molecola di ATP legher , rispettivamente, il dominio NBD1 e quello NBD2, mentre si chiuder  se avverr  l'idrolisi di almeno uno dei 2 nucleotidi (fig.6).



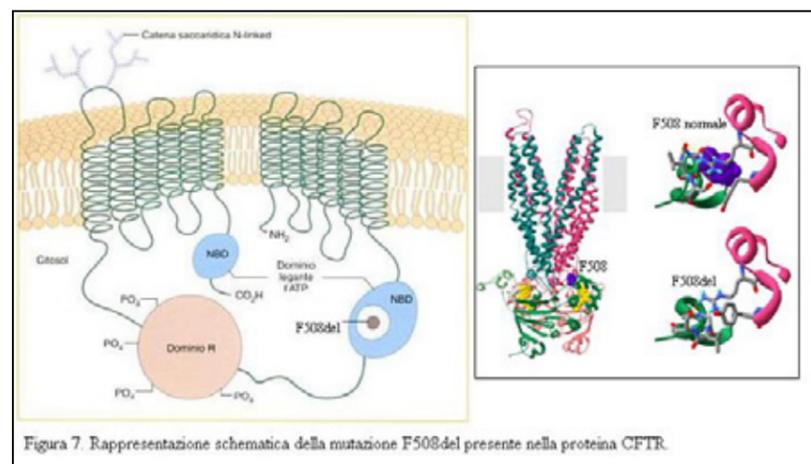
Sono state identificate oltre 1800 mutazioni differenti a livello del locus FC.

Esse interessano principalmente una o poche basi nucleotidiche e sono distribuite per lo più nella parte codificante del gene e nelle sequenze di giunzione tra esoni ed introni, più raramente negli introni.

La frequenza delle mutazioni è diversa nelle varie nazioni e anche nelle regioni di una singola nazione, data la diversa origine delle popolazioni che vi si sono insediate.

La mutazione F508del (dove "del" sta per delezione e "F" per fenilalanina) causa la perdita di 3 paia di basi codificanti per l'aminoacido fenilalanina in posizione 508, all'interno di uno dei domini leganti l'ATP. Questa mutazione rappresenta il **35-55%** delle mutazioni nell'Europa meridionale (Italia, Spagna, Grecia) e l'**85%** circa nelle popolazioni del Nord-Europa (Danimarca, Olanda, Regno Unito)<sup>9</sup>. La mutazione F508del rappresenta, quindi, la mutazione maggiormente diffusa.

La proteina CFTR con la mutazione F508del non acquisisce la corretta struttura tridimensionale e quindi non può essere trasportata attraverso il reticolo endoplasmatico fino all'apparato del Golgi dove normalmente sarebbe andata incontro a maturazione post-traduzionale (fig.7).



Probabilmente la mutazione F508del si è affermata nei paesi europei in quanto i portatori sani presentano un vantaggio evolutivo rispetto ai wild type. La proteina CFTR è indispensabile per l'ingresso del batterio *Salmonella Typhi* nelle cellule epiteliali. Nei soggetti eterozigoti il mal funzionamento della proteina CFTR ostacolerebbe parzialmente l'ingresso del microorganismo nelle cellule epiteliali, rendendoli resistenti alla febbre tifoide<sup>10</sup>.

### CLASSIFICAZIONE DELLE MUTAZIONI

Pur essendo molto eterogenee, le mutazioni nel gene CFTR sono state raggruppate in 6 classi in base all'alterazione funzionale della proteina CFTR di cui sono responsabili (fig.8).

La classe 1 contiene le mutazioni che inducono un difetto della produzione della proteina.

La classe 2 include le mutazioni che alterano il "processing" della proteina.

Le classi 3 e 4 comprendono mutazioni che non influiscono sulla produzione, maturazione e, quindi, sulla presenza della proteina sulla membrana delle cellule epiteliali interessate, ma provocano un deficit nell'attivazione del canale oppure un'alterazione della conduttanza. Le mutazioni di classe 3 interessano le regioni codificanti per i siti di legame per l'ATP e si manifestano con una mancata attivazione della proteina con conseguente deficit della conduttanza dell'anione cloro. La classe 4 annovera le mutazioni che determinano un difetto della permeabilità ionica. Queste mutazioni coinvolgono i domini transmembrana e provocano una diminuzione del flusso ionico ed una riduzione del tempo di apertura del canale.

La classe 5 include le mutazioni nei siti di "splice", che riducono la quantità ma non la funzionalità della proteina CFTR.

Nella classe 6 la proteina CFTR è normalmente espressa ed attiva, ma va incontro a degradazione precoce.

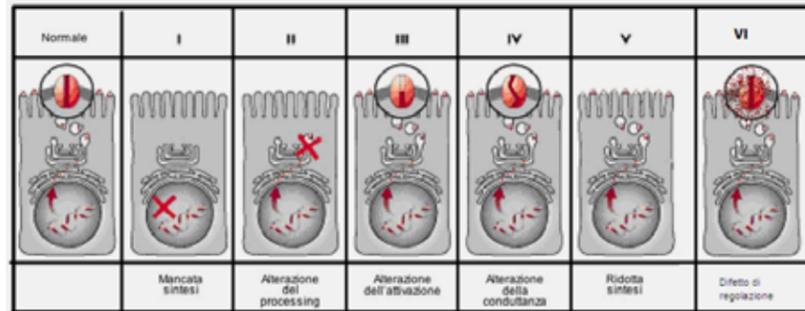


Figura 8. Classificazione delle mutazioni presenti nel gene CFTR e loro conseguenze sul prodotto proteico.

### CORRELAZIONE GENOTIPO FENOTIPO

Non esiste una chiara correlazione genotipo-fenotipo, in quanto nella estrinsecazione della FC concorrono anche i cosiddetti geni modificatori ed i fattori epigenetici. Pertanto, è difficile costruire un iter prognostico riguardo alla severità della malattia in base alla particolare mutazione individuata nel genoma di un paziente affetto da fibrosi cistica.

La relazione tra genotipo FC e manifestazioni cliniche si può ricondurre al livello di espressione della proteina CFTR in forma attiva (tab.2).

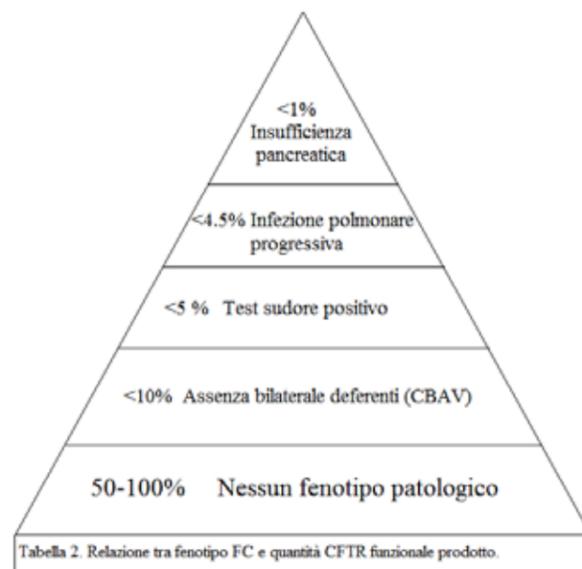


Tabella 2. Relazione tra fenotipo FC e quantità CFTR funzionale prodotto.

C'è una buona correlazione tra il genotipo del paziente e la funzionalità del pancreas: basta un allele con mutazione lieve per dare sufficienza pancreatica, ce ne vogliono due gravi per dare insufficienza pancreatica (tab.3).

FUNZIONE	TIPO di MUTAZIONI	ESEMPI
INSUFFICIENZA	grave/grave	F508del/F508del F508del/R1162X
SUFFICIENZA	grave/lieve lieve/lieve	F508del/ <u>R117H-5T</u> <u>3849+10kbC-</u> <u>T/R334W</u>

Tabella 3. Correlazione fra genotipo e funzionalità pancreatica.  
 ■ Le mutazioni "lievi" sono sottolineate.

### 1.5 LA DIAGNOSI

La diagnosi si basa sulla presenza di manifestazioni cliniche o biochimiche compatibili con la malattia, in associazione alla positività di almeno uno tra i test diagnostici validati. Questi comprendono il test del sudore (con cloro e sodio in concentrazioni superiori alla norma), lo studio della differenza di potenziale elettrico transepiteliale nelle mucose respiratorie o intestinali<sup>11</sup> e l'analisi genetica che si considera positiva quando identifica due mutazioni che causano la malattia<sup>12</sup>.

In alcune forme atipiche, nelle quali l'espressione clinica è modesta oppure limitata ad un solo organo o apparato, la diagnosi di Fibrosi Cistica è talora giudicata eccessiva e inappropriata<sup>13</sup>, ma manca ancora un consenso generalizzato sulla definizione nosologica da utilizzare.

Nelle forme classiche della malattia di solito la diagnosi è semplice, ma in quelle atipiche può essere molto complessa.

### IL TEST DEL SUDORE

Il test del sudore è oggi considerato il test fondamentale per la diagnosi della Fibrosi Cistica, malattia che un tempo era denominata "malattia dal bacio salato", a causa delle elevate concentrazioni di Cloruro di sodio (NaCl) nel sudore del paziente affetto.

Questo esame può essere eseguito a partire dalle 2 settimane di vita ed è necessario raccogliere una quantità di sudore sufficiente per

eseguire l'analisi: almeno 75 mg su carta da filtro o 15 mg con capillare. Esistono vari metodi, ma il più affidabile è quello di Gibson e Cooke (fig.9), il quale prevede:

1. Posizionamento sull'avambraccio di speciali tamponi imbevuti di pilocarpina, una sostanza chimica che favorisce la produzione di sudore.
2. Attraversamento dei tamponi da parte di un piccolo flusso di corrente, generato da una batteria, che induce la penetrazione della pilocarpina nell'epidermide.
3. Rimozione, dopo circa 5 min, dei tamponi.
4. Lavaggio della cute con H<sub>2</sub>O sterile.
5. Raccolta, nel corso di 30 min, del sudore prodotto nella zona interessata, attraverso carta da filtro o tubo capillare.
6. Rimozione della carta da filtro e determinazione degli elettroliti presenti all'interno.

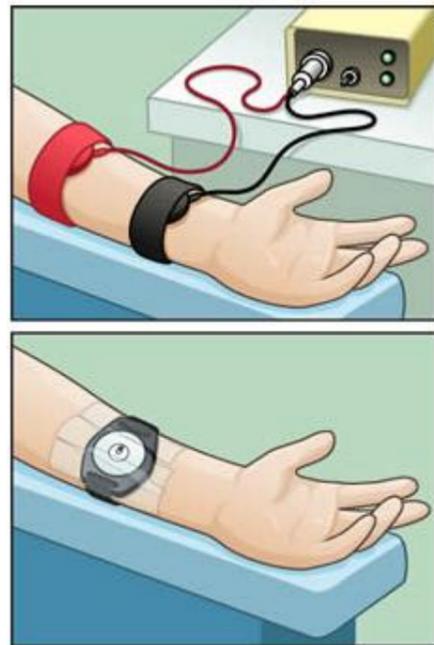


Figura 9. Test del sudore.

Per l'interpretazione dei risultati del test, vengono utilizzati intervalli di riferimento, nelle diverse fasce di età (tab.4 e 5).

Intervallo di riferimento	Interpretazione
<30 mEq/L	Normale, bassa probabilità di FC
30-60 mEq/L	Intermedia, suggestiva ma non diagnostica per FC
>60 mEq/L	Elevata, supporta la diagnosi di FC

Tabella 4. Intervalli di riferimento fino a 6 mesi di vita.

Intervallo di riferimento	Interpretazione
<40 mEq/L	Normale, bassa probabilità di FC
40-60 mEq/L	Intermedia, suggestiva ma non diagnostica per FC
>60 mEq/L	Elevata, supporta la diagnosi di FC

Tabella 5. Intervalli di riferimento dopo i 6 mesi di vita.

#### LO SCREENING NEONATALE

Lo screening neonatale è oggi eseguito nella maggior parte delle regioni italiane e mira ad identificare alcune malattie che, se individuate precocemente, possono essere curate con ottimi risultati.

Nella Regione Basilicata lo screening neonatale per la FC è attivo da diversi anni; in questo modo l'individuazione precoce dei soggetti FC indirizza verso cure e controlli che, nonostante non permettano una guarigione, migliorano le aspettative e la qualità della vita.

Lo screening per la Fibrosi Cistica, o test per la tripsina immunoreattiva (IRT), si basa sul dosaggio della tripsina, un enzima pancreatico, all'interno di una goccia di sangue prelevata dal tallone del neonato in 3<sup>a</sup> - 4<sup>a</sup> giornata dalla nascita e raccolta su carta assorbente.

In caso di positività accertata del test di dosaggio della tripsina, si procede con il test del sudore.

## TECNICHE DI ANALISI GENETICA MOLECOLARE

È possibile distinguere vari livelli di analisi molecolare che si caratterizzano per diversi tempi di esecuzione, tecnologie e costi.

- **Analisi di I livello**: kit commerciale o preparato in laboratorio che include l'analisi delle mutazioni più frequenti. Le tecniche più utilizzate sono: Reverse Dot Blot, Amplification Refractory Mutation Systems, Oligonucleotide Specific Allele ed Oligonucleotide Ligation Assay.
- **Analisi di II livello**: scanning di tutti gli esoni e delle regioni limitrofe, riconoscimento di variazioni di sequenza, sequenziamento della specifica regione del gene. Le tecniche più utilizzate sono: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis e Denaturing High Performance Liquid Chromatography. I tests di II livello permettono un tasso di individuazione (*detection rate*) migliore, ma il significato fenotipico del risultato molecolare può essere di difficile interpretazione.
- **Analisi di III livello**: ricerca di delezioni e/o di inserzioni. Si fa ricorso in questo caso alla Quantitative Multiplex Polymerase Chain Reactions of Short Fluorescent Fragments.

Vale la pena sottolineare che i tests di I livello possono vantare una *detection rate* di circa il 90% e consentono l'identificazione delle mutazioni più frequenti. I tests di II e III livello hanno una maggiore sensibilità, ma portano a risultati di più difficile interpretazione perché possono individuare sia mutazioni che determinano la malattia sia varianti che non sono patologiche.

## 1.6 TRATTAMENTO DELLA FIBROSI CISTICA

Con i mezzi oggi disponibili la FC si può curare, anche se ancora non è possibile guarire. Un elevato numero di pazienti affetti da FC raggiunge l'età adulta in buone condizioni e, grazie al progresso delle cure, l'attesa di vita, che nel 1955 era di 5 anni e nel 1985 era di 25 anni, ha superato oggi i 40 anni<sup>2</sup>. Data la varietà della

sintomatologia, il trattamento di questa patologia è alquanto complesso ed è necessario agire su molti fronti, sebbene le terapie più impegnative siano richieste dalle manifestazioni polmonari della malattia. Al fine di mantenere stabile la situazione respiratoria del malato, vengono somministrati periodicamente antibiotici contro le infezioni polmonari; viene effettuata una terapia aerosolica, in modo da fluidificare le secrezioni, assieme ad una fisioterapia respiratoria, per mantenere i polmoni liberi da quest'ultime, ed è fortemente consigliata l'attività fisica all'aria aperta. In età adulta è frequente l'insorgenza di complicanze respiratorie, come l'enfisema, trattato con terapia antiinfiammatoria (ad esempio l'ibuprofene) e broncodilatante, e l'insufficienza respiratoria, curata con ossigenoterapia, ventilazione o, in fase avanzata, con il trapianto polmonare.

Importante è, allo stesso tempo, mantenere una buona situazione digestiva, attraverso la somministrazione di enzimi pancreatici nei primi anni di vita, ed un adeguato stato nutrizionale, mediante la promozione di una dieta varia, integrata da vitamine, scarsamente assorbite a livello intestinale dal paziente, e supplementata con Cloruro di sodio.

## NUOVE STRATEGIE TERAPEUTICHE

### Terapia genica

Dopo la scoperta della mutazione del gene CFTR, ci fu un entusiasmo generale per la possibilità dell'utilizzo della terapia genica<sup>14</sup>. Questa consiste nel trasferimento di copie del gene CFTR normale nelle cellule bersaglio malate. Sono stati analizzati molti possibili vettori nei diversi trials clinici come l'utilizzo di vettori virali o liposomi.

I primi studi in vitro e in vivo sembravano abbastanza promettenti, il gene era infatti trasferito con successo nelle vie aeree, ma nella maggior parte dei casi solo per un breve periodo di tempo<sup>15</sup>. Il problema maggiore è che non si conosce la percentuale di funzionalità che il gene CFTR deve recuperare per ottenere un

miglioramento della situazione clinica del paziente<sup>16</sup>. Inoltre la terapia genica richiede somministrazioni ripetute e questo crea problemi nell'utilizzo dei vettori virali che, se somministrati ripetutamente, stimolano la produzione anticorpale da parte dell'ospite<sup>17</sup>.

La terapia con adenovirus associato sembrava promettente in una fase precoce di sperimentazione. E' stato, infatti, inizialmente dimostrato da Moss e Coll che il trasferimento del gene determina un aumento dei valori di FEV1 (FEV1: Forced Expiratory Volume in the 1st second) e dei livelli di IL-8 nell'espettorato del paziente<sup>18</sup>. Una successiva rivalutazione dello studio, da parte degli stessi autori, non ha mostrato gli stessi risultati<sup>19</sup>.

#### **Farmacoterapia del difetto di base**

Altra prospettiva terapeutica promettente riguarda la correzione farmacologica del difetto CFTR.

Come già visto sopra, le mutazioni CFTR sono suddivise in 6 classi a seconda degli effetti che la mutazione produce sull'espressione e sulla funzionalità della proteina. I farmaci che mirano alla correzione del difetto di base sono rivolti ognuno verso una singola classe di mutazione. Essi quindi non vengono utilizzati in tutti i pazienti ma sono specifici per i singoli gruppi che presentano la stessa classe di mutazione.

Le mutazioni di prima classe sono "mutazioni di stop" che determinano una riduzione della produzione di mRNA.

Le mutazioni G542X e R553X, appartenenti a questa classe, possono essere sopresse mediante trattamento con piccole dosi degli aminoglicosidi G418 e gentamicina<sup>20</sup>. Tali composti sono stati usati nel trattamento di pazienti FC in alcuni studi pilota<sup>21</sup>.

Le mutazioni di seconda classe, che comprendono la mutazione F508del, sono caratterizzate da una degradazione precoce.

Dal momento che le proteine CFTR, pur essendo mal ripiegate, mostrano comunque una normale conduttanza agli ioni cloro, i composti che sono in grado di ridurre la degradazione e di

aumentare il traffico di proteine CFTR alla membrana sono considerate come una opzione di trattamento potenziale<sup>22</sup>. Tra questi farmaci alcuni, chiamati correttori, si sono dimostrati promettenti.

Le mutazioni di terza classe sono caratterizzate da una mancata attivazione della proteina CFTR, normalmente espressa. Per tale classe di mutazioni sono in fase di studio composti, chiamati potenziatori, che hanno lo scopo di attivare la proteina canale. Tra questi VX770 ha mostrato di essere efficace e di presentare un buon profilo di sicurezza ed è attualmente impiegato in trials clinici in pazienti con mutazione G551D<sup>23</sup>. I risultati mostrati dal farmaco appaiono promettenti. Il VX770 potrebbe essere utilizzato anche nel trattamento delle mutazioni di classe 2, combinato con i farmaci correttori<sup>16</sup>.

Le mutazioni di quarta classe sono caratterizzate da una proteina CFTR normalmente espressa sulla membrana plasmatica ma con una ridotta conduzione ionica. Alcune xantine prolungano lo stato fosforilato del CFTR e di conseguenza aumentano il tempo di apertura del canale.



Presidio Ospedaliero "Madonna delle Grazie" A.S.M.  
- Matera -



### SCOPO DELLA TESI

Nel tirocinio svolto presso l'U.O.D. di Citogenetica e Genetica Molecolare del P.O. "Madonna delle Grazie" di Matera mi sono impegnata di apprendere le tecniche di base di biologia molecolare utili per lo studio e la caratterizzazione molecolare delle principali mutazioni geniche che colpiscono il gene CFTR, responsabili dell'estrinsecazione della patologia denominata "Fibrosi Cistica".

## CAPITOLO 2

### TECNICHE DI ANALISI GENETICA MOLECOLARE

L'indagine genetica e molecolare ha lo scopo di individuare le mutazioni geniche responsabili dell'estrinsecazione della FC o caratterizzare i soggetti portatori sani del gene mutato, specialmente nelle famiglie con individui che manifestino la patologia. Essa prevede i seguenti steps:

- I) Estrazione del DNA da linfociti presenti nel sangue venoso in EDTA o da tampone buccale.
- II) Determinazione della purezza di DNA estratto.
- III) Amplificazione del DNA ottenuto, con l'ausilio della tecnica della PCR.
- IV) Verifica della corretta amplificazione mediante elettroforesi su gel di agarosio al 3%.
- V) Rilevazione delle eventuali mutazioni studiate mediante Reverse Dot Blot.

### 2.1 METODICHE PER ESTRAZIONE DEL DNA

#### 2.1a Estrazione del DNA con metodica fenolo-cloroformio

Questa metodica, ormai obsoleta, viene effettuata in tre giorni.

#### PRIMO GIORNO

Si prelevano 10 mL di sangue intero in una falcon sterile da 50 mL, contenente, come anticoagulanti, 2 mL di ACD (=una soluzione contenente Acido citrico, Citrato trisodico, Destrosio ed acqua) o EDTA (=Acido etilendiaminotetracetico) e la si pone in congelatore per una notte a -20°C o a -80°C.

#### SECONDO GIORNO

Si scongela il sangue, inserendo la falcon in un bagnomaria a 37°C, e lo si diluisce nel rapporto di circa 1:5 con 45 mL di SOLUZIONE LISANTE.

Preparazione della soluzione lisante:

10 mL di TRIS [=Tris(idrossimetil)aminometano] 2M; 10 mL di EDTA 0.5M e 980 mL di H<sub>2</sub>O sterile.

- Un litro di soluzione di TRIS 2M, a sua volta, viene preparato facendo sciogliere 242 g di TRIS (PM=121.1 g/mol) in 800 mL di H<sub>2</sub>O distillata e, infine, si porta a volume di 1000 mL con H<sub>2</sub>O distillata.
- Un litro di soluzione di EDTA 0.5M, invece, è preparato immettendo in 800 mL di H<sub>2</sub>O distillata 146.15 g di EDTA (PM=292.3 g/mol) e, infine, si porta al volume di 1000 mL con H<sub>2</sub>O distillata.

Le provette vengono mantenute in ghiaccio per 10 minuti; agitate delicatamente e centrifugate per 10 minuti a 6000 rpm. Viene aspirato il sovrnatante; si ripetono i lavaggi con la soluzione lisante fino a distinguere nitidamente i leucociti ed, all'ultimo passaggio, si aspira il surnatante, lasciando 15 mL nella falcon.

A questo punto, si aggiungono 750 µL di Sodio Dodecil Solfato (SDS: ha l'obiettivo di sciogliere i lipidi delle membrane cellulari per permettere il rilascio del contenuto della cellula) e 150 µL di proteinasi K.

- Proteinasi K: confezioni da 100 mg liofilizzati. Aggiungere 5 mL di H<sub>2</sub>O sterile, preparare delle aliquote da 1 mL e congelare a -20°C.
- SDS: preparare una soluzione al 10%.

Infine, si pone il tutto per una notte in bagnomaria a 37°C con agitatore, il quale permette un delicato ondeggiamento della falcon secondo il suo asse maggiore.

**TERZO GIORNO**

Si aggiunge alla falcon 1.5 mL di TRIS 2M, precedentemente preparato, ed 1 mL di fenolo equilibrato (=solvente organico non miscibile con acqua, il quale causa la coagulazione delle proteine presenti nella miscela e quindi la formazione di uno strato acquoso separato, estremamente viscoso ed elastico, contenente principalmente DNA).

Preparazione del fenolo equilibrato:

Si aggiungono a 500 mL di fenolo 1 grammo di 8-idrossichenolina ed 1 volume di TRIS 1M a pH 8; si agita con agitatore magnetico per 5-6 ore e, dopo aver fatto sedimentare per circa 30 minuti, si aspira il sovrnatante. Successivamente si aggiungono 1 volume di cloroformio isoamilico, conservato in frigorifero, e 2 volumi di TE1X; si agita la soluzione ottenuta per una notte in frigorifero, si lascia sedimentare per 30 minuti a temperatura ambiente; si aspira il sovrnatante e si conserva la

Si procede centrifugando a 6000 rpm per 10 minuti. Si aspira il sovrnatante, ovvero il DNA, con una pasteur, e lo si trasferisce in una nuova provetta da 15 mL.

A quest'ultima si aggiunge 1 mL di fenolo equilibrato e si agita delicatamente fino ad ottenere una soluzione omogenea, che sarà centrifugata per 10 minuti a 6000 rpm.

Si aspira il surnatante (=DNA) e lo si trasferisce in un'altra falcon, si aggiunge 1 mL di cloroformio isoamilico 24:1 (24 parti di cloroformio isoamilico + 1 parte di alcool isoamilico).

Si agita leggermente e si centrifuga a 6000 rpm per 10 minuti: procedere con l'aggiunta di 0.1 mL di sodio acetato 3M a pH 5.2 e di 2 mL di etanolo assoluto, conservato a -20°C, il quale fa sì che le molecole di DNA precipitino e possano venir estratte dal liquido come una piccola sfera lucente di DNA puro ad alto PM.

Un litro di soluzione di sodio acetato a pH 5.2 viene preparato facendo sciogliere 408 g di sodio acetato triidrato in 800 mL di H<sub>2</sub>O sterile, regolando il pH con acido acetico e portando la soluzione fino al volume di 1000 mL con H<sub>2</sub>O sterile.

Si agita delicatamente; si pone a -20°C o -70°C per 15 minuti; si preleva il DNA precipitato con una pasteur ad uncino e si effettua un lavaggio in etanolo al 70% (centrifuga 600 rpm per 10 minuti).

Viene asciugata sotto una comune lampadina la "matassa" di DNA finché questa incomincia a diventare trasparente; a quel punto, la si

pone in una cuvetta da 1.4 mL, contenente 1mL di TE1X e presterilizzata in autoclave, e si conserva a +4°C.

Una soluzione di TE1X (=Tris-EDTA) viene ottenuta aggiungendo a 500 mL di TRIS 2M 200 mL di EDTA 0.5M e 300 mL di H<sub>2</sub>O sterile.

È stato così ottenuto il DNA dopo 3 giorni dal suo prelievo ed ora è possibile procedere con la misurazione della sua purezza, quindi, alla sua amplificazione ed allo studio delle eventuali mutazioni del gene CFTR presenti.

### 2.1b Estrazione del DNA

Questo tipo di estrazione di DNA da sangue intero prevede i seguenti steps:

1. Dopo aver prelevato al paziente un campione di sangue periferico in EDTA, si procede pipettando 80 µL di quest'ultimo all'interno di una provetta da centrifuga con tappo a vite.
2. Si aggiungono 320 µL di una soluzione di NH<sub>4</sub>Cl (=Cloruro di ammonio) 170mM (d=9.09 g/L).
3. Si agita, capovolgendo delicatamente, per 20 minuti, evitando la formazione di schiuma.
4. Si centrifuga a 12000 rpm per 2 minuti.
5. Si rimuove il surnatante.
6. Si aggiungono, nella provetta, 300 µL di una soluzione contenente NaCl (=Cloruro di sodio) 10mM (d=0.58 g/L) ed EDTA 10mM (d=3.72 g/L).
7. Si vortexa vigorosamente.
8. Si centrifuga a 12000 rpm per 1 minuto.
9. Si ripetono gli steps 5-6-7-8 per almeno altre due volte, finché la colorazione rossa nel sovrinatante non scompare.
10. Si elimina il surnatante.
11. Si aggiungono nella provetta 200 µL di una soluzione di NaOH 50mM (d=2g/L).

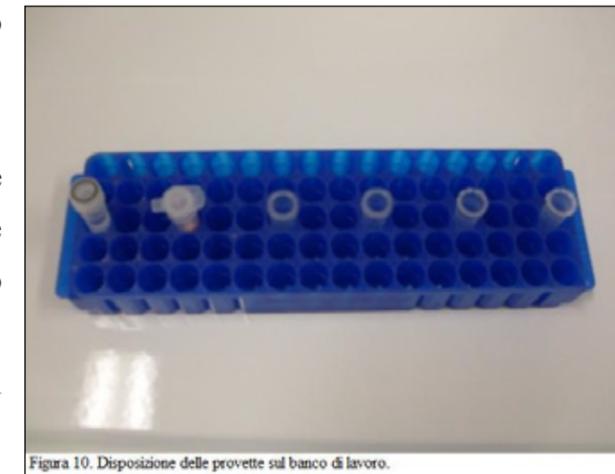
12. Si vortexa vigorosamente.
13. Si incuba per 10 minuti in un Termo Block a 98°C.
14. Si pipettano nella provetta 40 µL di una soluzione contenente Tris-base (formula bruta = C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>) 1M (d=121.1g/L) e HCl a pH 7.5.
15. Si vortexa vigorosamente, al fine di risospendere le cellule.
16. Si aggiunge 1 mL di H<sub>2</sub>O distillata sterile, portando il campione di DNA al volume di 1.24 mL.
17. Si centrifuga per 1 minuto a 12000 rpm.
18. All'interno del sovrinatante si troverà il DNA estratto.

### 2.1c Estrazione di DNA da sangue intero con il kit NUCLEAR LASER MEDICINE®

L'estrazione del DNA da sangue intero con il kit NUCLEAR LASER MEDICINE® richiede diversi steps.

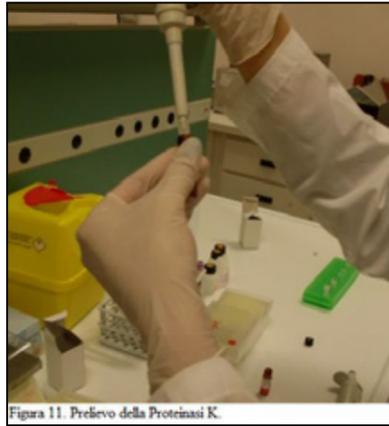
Una volta disposto il materiale occorrente sul banco di lavoro (fig.10) e dopo

aver contrassegnato con il codice del paziente le provette, può iniziare l'estrazione del DNA.

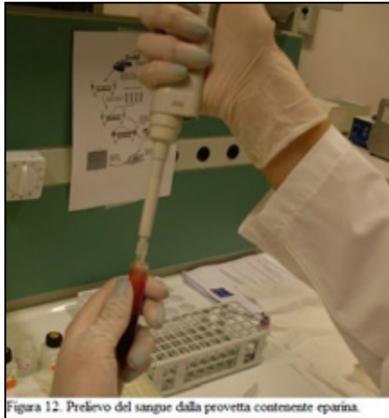


Si inseriscono 25 µL di proteinasi K (fig.11) sul fondo di una provetta da 1.5mL con il tappo a vite.

Proteinasi K: conservata a +4°C, fornita nel kit nella sua forma liofilizzata e ricostituibile con l'aggiunta di 0.9 mL di buffer. Ha lo scopo di degradare le proteine che legano il DNA.



Si prelevano 200  $\mu$ L di sangue in EDTA (fig.12), dopo averla agitata delicatamente, e si depositano sul fondo della provetta con tappo a vite contenente 25  $\mu$ L di proteinasi K.  
Si incuba a temperatura ambiente per 5 minuti.



Si aggiungono 200  $\mu$ L di tampone di lisi B3 al campione (fig.13A).

Tampone di lisi B3: fornito nel kit.  
Lisi le cellule per permettere il rilascio del materiale genetico.

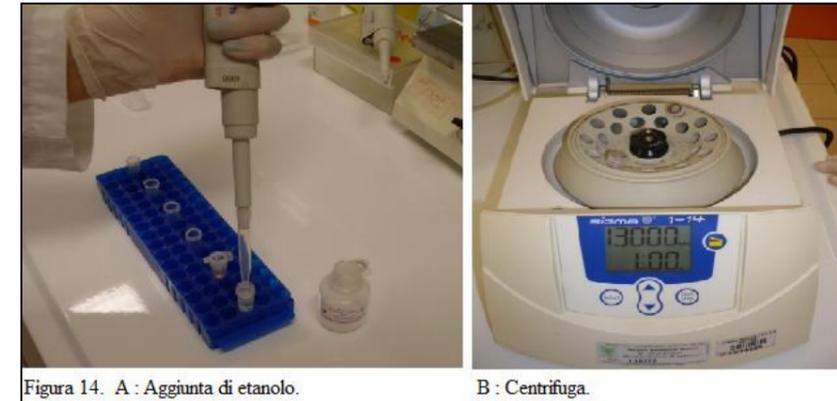
Si vortexa vigorosamente per 10-20 secondi (fig.13B) e si incuba per 15 minuti a 70°C, nel Thermo Block (fig.13C).



Si aggiungono ora 210  $\mu$ L di etanolo.

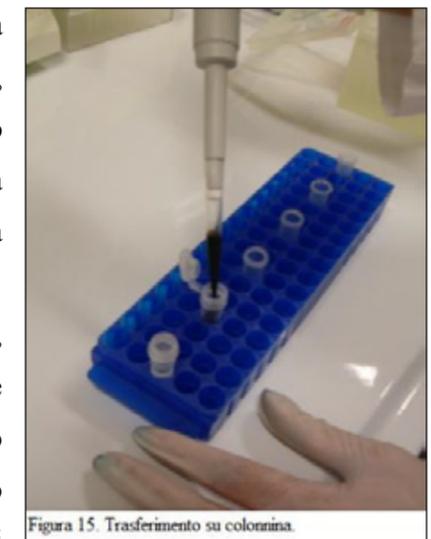
Etanolo (formula bruta =  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ): fornito nel kit.  
Consente il legame delle molecole di DNA al filtro della colonnina.

Si vortexa vigorosamente e si centrifuga a 13000 rpm per 1 minuto (fig.14).



A questo punto, si prelevano 600  $\mu$ L di campione; si immettono delicatamente all'interno della colonnina fornita dal kit, facendo scivolare il liquido sulle pareti per evitare la rottura del filtro (fig.15), e si centrifuga a 13000 rpm per 1 minuto.

Il DNA risulterà legato al filtro, mentre i contaminanti, come le membrane cellulari, avranno attraversato il filtro e si saranno depositati, sotto forma di soluzione, sul fondo della provetta di raccolta (fig.16).



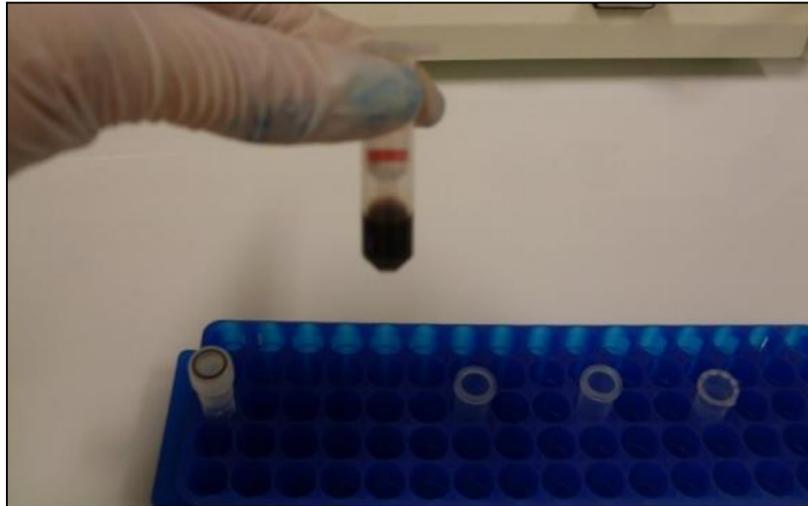


Figura 16. Soluzione contenente i contaminanti depositati sul fondo della provetta di raccolta.

Si elimina la provetta di raccolta, si posiziona la colonnina con il DNA sul filtro su una nuova provetta di raccolta e si aggiungono 500  $\mu$ L di tampone BW (fig.17).

Tampone BW: fornito nel kit.

Elimina i contaminanti per ottenere il DNA puro.

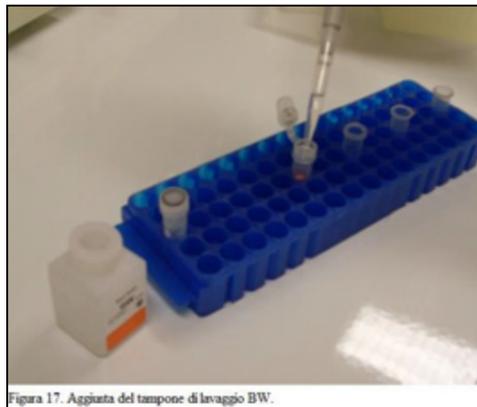


Figura 17. Aggiunta del tampone di lavaggio BW.

Si centrifuga a 13000 rpm per 1 minuto; si elimina la provetta di raccolta contenente la soluzione con all'interno le impurità (fig.18); si trasferisce la

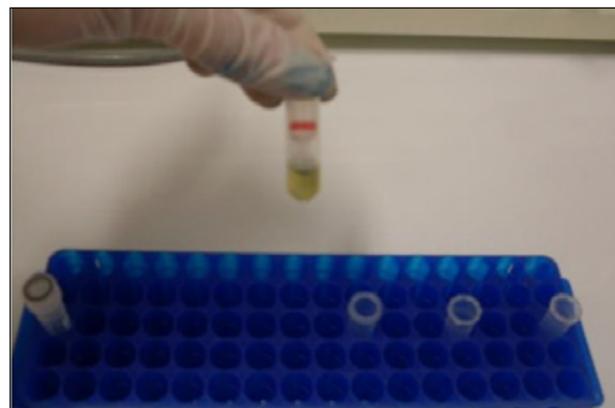


Figura 18. Soluzione contenente i contaminanti depositati sul fondo della provetta di raccolta.

colonnina su un'altra provetta, questa volta non fornita dal kit, e si procede con un secondo lavaggio con il tampone B5.

Tampone B5: fornito nel kit.

Elimina i contaminanti per ottenere il DNA puro.

Si aggiungono 600  $\mu$ L di tampone B5 (fig.19), facendo attenzione ad evitare la rottura del filtro, e si centrifuga nuovamente a 13000 rpm per 1 minuto.

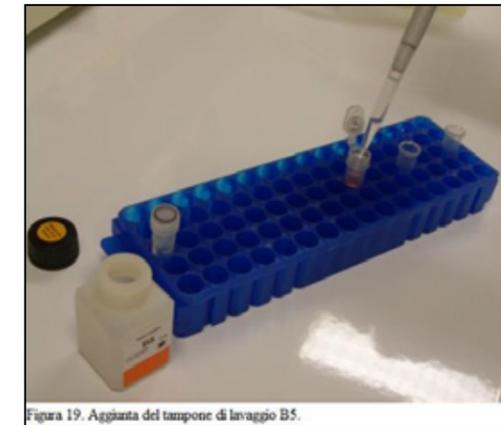


Figura 19. Aggiunta del tampone di lavaggio B5.

Si elimina la provetta di raccolta contenente i contaminanti nella soluzione precipitata (fig.20) e si posiziona la colonnina su una nuova provetta per effettuare il lavaggio a vuoto (fig.21): senza aggiungere nessun tampone di lavaggio, si centrifuga a 13000 rpm per 1 minuto. Si elimina la provetta a fondo conico e si posiziona la colonnina su un'altra provetta.

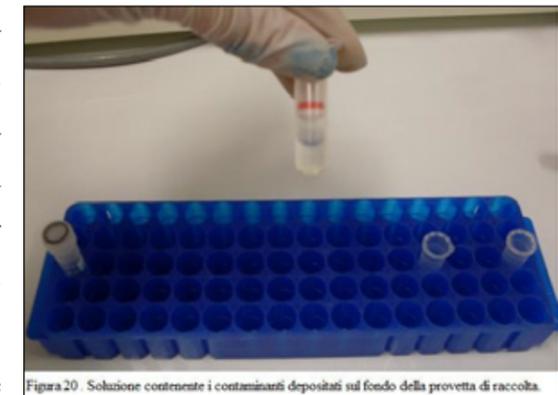


Figura 20. Soluzione contenente i contaminanti depositati sul fondo della provetta di raccolta.

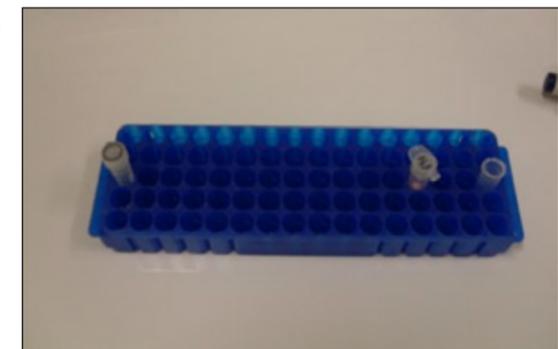


Figura 21. Trasferimento del filtro su una nuova provetta prima di effettuare il lavaggio a vuoto.

Si aggiungono, allora, 100  $\mu$ L di tampone di eluizione BE (fig.22).

**Tampone BE:** fornito nel kit e riscaldato a 70°C prima dell'uso. Permette al DNA legato al filtro della colonnina di eluire sul fondo della provetta.

Si centrifuga, per l'ultima volta, a 13000 rpm per 1 minuto.

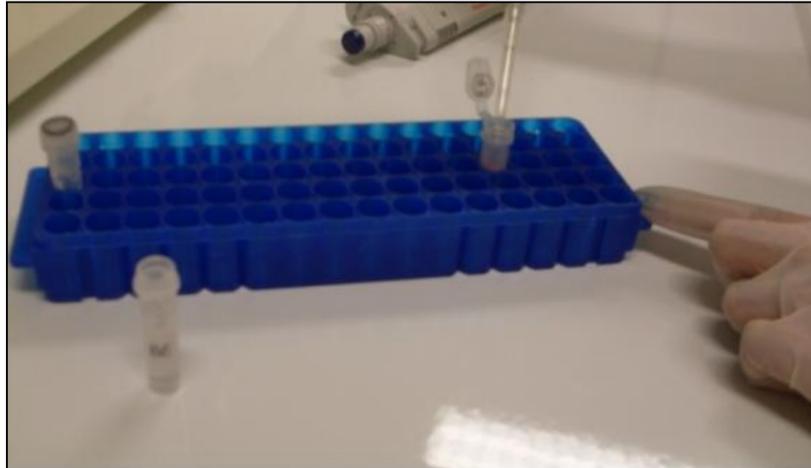


Figura 22. Aggiunta del tampone di eluizione BE.

Sul fondo conico della provetta si potrà osservare un eluato limpido e denso: la soluzione di DNA (fig.23).

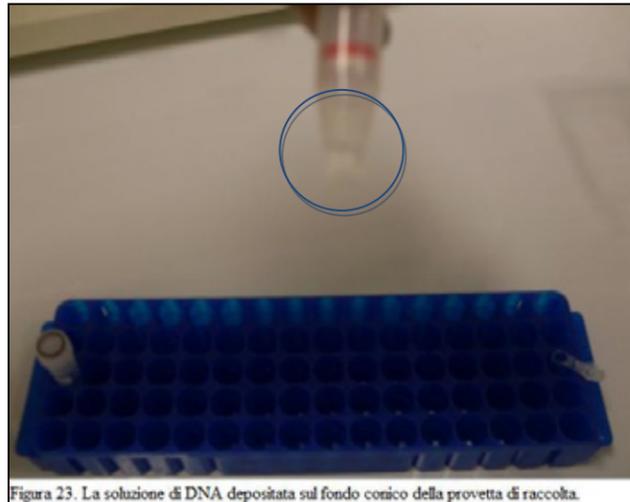


Figura 23. La soluzione di DNA depositata sul fondo conico della provetta di raccolta.

Ora si può trasferire il DNA in un'eppendorf DNasi ed RNasi free da 200  $\mu$ L (fig.24), iniettando il materiale genetico lentamente e con estrema attenzione, al fine di evitare la formazione di bolle d'aria all'interno, e, prima di utilizzarlo, si determina la purezza del campione estratto.

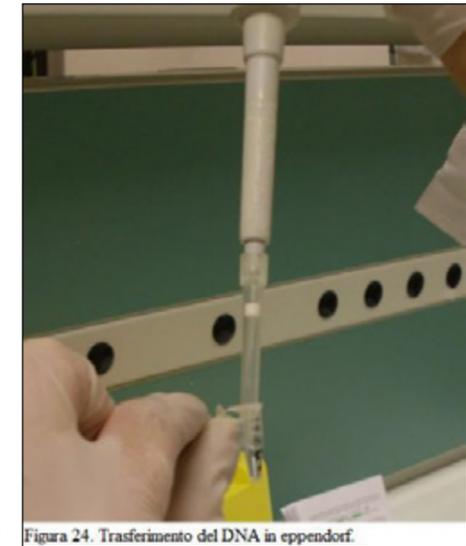


Figura 24. Trasferimento del DNA in eppendorf.

#### 2.1d Estrazione di DNA da tampone buccale

L'estrazione di DNA da tampone buccale prevede i seguenti steps:

1. Si immettono 2 mL di soluzione fisiologica sterile all'interno di una provetta a fondo conico sterile da 15 mL dotata di tappo a vite.
2. Si inserisce nella bocca del paziente il tampone sterile e, mediante *scraping*, si prelevano le cellule epiteliali.
3. Si immette il tampone nella soluzione fisiologica e si agita: la soluzione apparirà torbida.
4. Si centrifuga a 1500 rpm per 10 minuti.
5. Si elimina il surnatante.
6. Si prelevano dal fondello della provetta le cellule epiteliali ivi contenute (pellet).
7. Si procede come nel caso dell'estrazione di DNA da sangue intero con il kit NUCLEAR LASER MEDICINE® (vedi 2.1c).

## 2.4 DETERMINAZIONE DELLA PUREZZA DEL CAMPIONE ESTRATTO

Per determinare la concentrazione del DNA, precedentemente estratto, e la sua purezza, si utilizza uno spettrofotometro (fig.25) alla lunghezza d'onda di 260 nm e di 280 nm, ovvero, rispettivamente, la lunghezza d'onda massima di assorbimento del DNA e delle proteine.

Per l'analisi, si pipetta, con l'apparato dello spettrofotometro aperto, 1  $\mu$ L di H<sub>2</sub>O sterile per il bianco, il solvente in cui è immerso il DNA di cui vogliamo misurare l'assorbanza, ed 1  $\mu$ L di campione da analizzare.

Lo spettrofotometro è dotato di un software specifico che permette di visualizzare lo spettro di assorbimento del nostro campione. Se il campione è privo di inquinamento da contaminanti, il rapporto DNA/proteine avrà un valore pari a  $1.7 \pm 0.2$ .

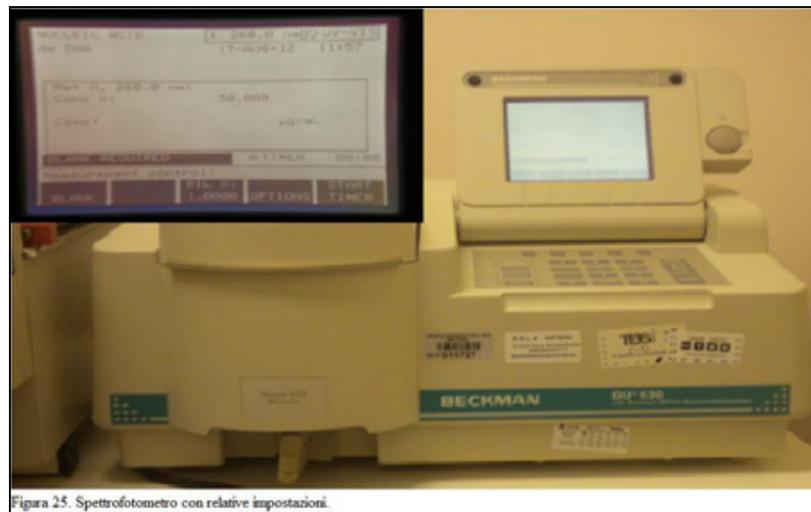


Figura 25. Spettrofotometro con relative impostazioni.

## 2.3 AMPLIFICAZIONE DEL DNA ESTRATTO MEDIANTE PCR

Una volta estratto e quantificato il DNA si può procedere con:

- amplificazione mediante la reazione a catena della polimerasi (Polymerase Chain Reaction, PCR) seguita da
- rivelazione delle mutazioni mediante IBRIDAZIONE INVERSA (Reverse Dot Blot).

### 2.3a Protocollo di amplificazione

Materiali presenti nel kit:

1. Master Mix di amplificazione CF 22 Mut.
2. Master Mix di amplificazione CF 16 Mut+Tn.
3. Taq DNA Polymerase.

Lo strumento utilizzato per la PCR è il termociclatore (fig.26).

La mix di amplificazione va conservata a  $-20^{\circ}\text{C}$ .  
È importante mantenere i reagenti separati da possibili acidi nucleici contaminanti (campioni e prodotti di amplificazione).



Figura 26. Termociclatore.

### 2.3b Preparazione delle mix per la PCR

Le operazioni di preparazione delle mix per la PCR avvengono sotto cappa sterile a flusso laminare verticale.

Precauzioni: mantenere tutti i reagenti per l'amplificazione in ghiaccio durante l'esecuzione dell'intera procedura. Eseguire le operazioni tenendo le provette in ghiaccio. Evitare ripetuti scongelamenti delle mix di amplificazione.

Per ogni campione:

- Preparare 2 provette da termociclatore del volume di 0,2 ml DNasi ed RNasi free (una per ogni mix di amplificazione) e mantenerle in ghiaccio.
- Preparare una PCR mix 1 (22 mutazioni) (50 µL): di cui 44.5 µL di mix di amplificazione CF 22mut e 0.5 µL di Taq Polimerasi.
- Preparare una PCR mix 2 (16 mut+Tn) (50 µL): di cui 44.5 µL di mix di amplificazione CF 16mut+Tn e 0.5 µL di Taq Polimerasi.
- Aggiungere 5 µL di DNA nelle rispettive provette.

La concentrazione di DNA da analizzare deve essere di circa 30-40 ng/ µL.

Reazione di amplificazione per singolo campione (n)	
Sostanze	Quantità
Amplification Mix	44,5 µL
Taq (5U/ µL )	0,5 (1U/ µL)
DNA da amplificare	5 µL
Totale reazione	50 µL

Ad esempio, qualora si vogliono amplificare 4 campioni (n=4), si calcherà il tutto per 5 campioni (n+1=5):

- ✓ si prepareranno, in totale, 222.5 µL di mix 1 e 2.5 µL di Taq;
- ✓ si dividerà per 5;
- ✓ si aggiungeranno a ogni mix completo, all'interno dell'ependorf, 5 µL di DNA.

A questo punto, si preriscalda il coperchio del termociclatore; si inseriscono le provette e si esegue il programma di amplificazione specifico per la rilevazione della Fibrosi Cistica (tab.6).

DENATURAZIONE PARZIALE	94°C per 10 min	
DENATURAZIONE	94°C per 30 sec	} 35 cicli
ANNEALING	54°C per 30 sec	
ESTENSIONE	72°C per 40 sec	
	72°C per 10 min	
	4°C	

Tabella 6. Programma di amplificazione per Fibrosi Cistica.

## 2.4 VERIFICA DEI PRODOTTI DI AMPLIFICAZIONE: ELETTROFORESI SU GEL DI AGAROSIO AL 3%

Dopo l'amplificazione viene effettuato un controllo sui prodotti di amplificazione mediante **elettroforesi su gel di agarosio al 3%** in TBE 1X. L'elettroforesi su gel di agarosio è un metodo semplice e veloce che permette di separare, e quindi identificare, frammenti di DNA in base al loro peso molecolare. I frammenti migrano, nel campo elettrico che attraversa il gel, dal polo negativo o catodo a quello positivo o anodo, in funzione delle cariche elettriche conferitegli dai gruppi fosfato. La velocità di migrazione dipende dalle dimensioni dei frammenti, dalla percentuale dell'agarosio nel gel e dal voltaggio applicato. Frammenti lineari più piccoli migrano più velocemente rispetto a quelli più grandi, mentre, a parità di peso molecolare, il DNA circolare migra più velocemente di un DNA lineare, in quanto assume una conformazione detta super avvolta. La corsa elettroforetica avviene all'interno di una vasca elettroforetica orizzontale, collegata ad un alimentatore.

### 2.4a Preparazione del tampone TBE1X

Inizialmente, si procede preparando 1 L di tampone TBE1X (=Tris-Borato-EDTA): si aggiungono a 100 mL di EDTA 900 mL di H<sub>2</sub>O distillata e si agita il tutto, al fine di evitare la precipitazione del sale sul fondo della soluzione (fig.27).



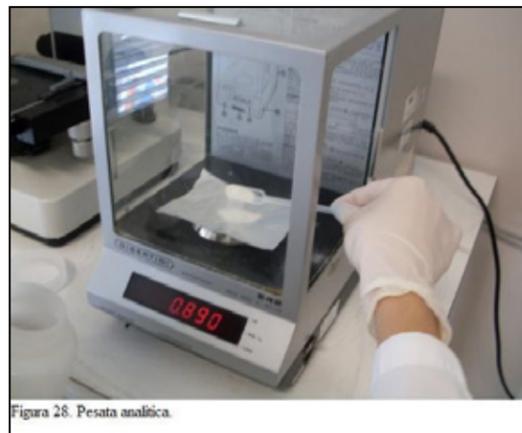
Figura 27. Tampone TBE1X.

#### 2.4b Preparazione del gel di agarosio al 3%

L'agarosio è un polisaccaride di origine marina, estratto dalle alghe *agar agar*, costituito da unità di D-galattosio e 3,6-anidro-L-galattosio, che si trova sotto forma di polvere.

Per preparare un gel di agarosio al 3%, si devono far sciogliere 3 g di agarosio in 100 mL di TBE1X, precedentemente preparato.

Vengono pesati, così, i 3 g di agarosio su una bilancia analitica (fig.28).



Si immette ora l'agarosio pesato nei 100 mL di TBE1X (fig.29) e, utilizzando come tappo la carta di alluminio utilizzata nella pesata, si agita per solubilizzare l'agarosio nel solvente.



Si riscalda la soluzione in forno a microonde o su piastra termica con l'ausilio di un magnete agitatore. Il gel sarà pronto nel momento in cui sarà diventato limpido e trasparente: dopo circa 3 minuti nel microonde (fig.30A) e 20 minuti su piastra (fig.30B).

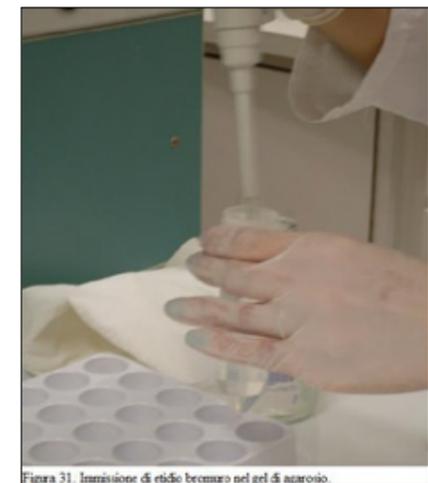


Intanto, è stata allestita la vaschetta, con all'interno il pettinino, per creare i pozzetti nel gel; una falcon da 50 mL, che servirà per inserire il gel in quest'ultima; una pasteur di vetro, per eliminare eventuali bolle nella vaschetta, ed il Bromuro di etidio, con cui verrà colorato il gel.

Bromuro di etidio: colorante specifico per acidi nucleici.  
Si intercala tra le basi del DNA per permetterne la successiva osservazione.

Una volta pronto il gel, se ne trasferiscono 50 mL all'interno della falcon, e si pipettano 5  $\mu$ L di etidio bromuro (fig.31).

A questo punto, si può inserire lentamente il gel nella vaschetta predisposta, facendo attenzione all'eventuale formazione di bolle d'aria, da eliminare con l'ausilio di una pasteur di vetro (fig.32).



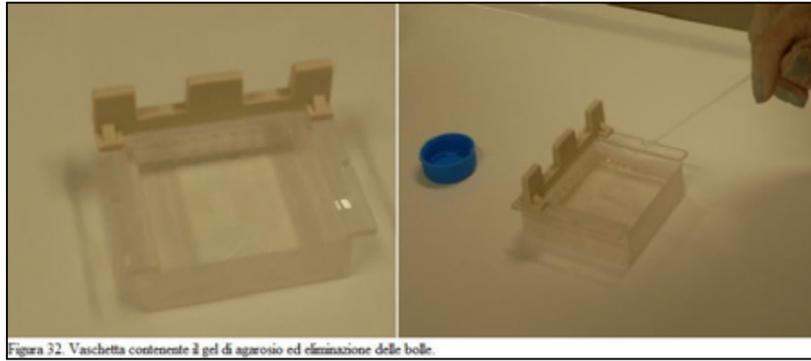


Figura 32. Vaschetta contenente il gel di agarosio ed eliminazione delle bolle.

### 2.4c Preparazione dell'amplificato e corsa elettroforetica

Utilizzando come indicatore il gel avanzato all'interno della falcon, si attende la solidificazione e, nel frattempo, si prepara la strumentazione necessaria per la corsa elettroforetica (fig.33), in cui si immetterà, in abbondanza, tampone TBE1X.

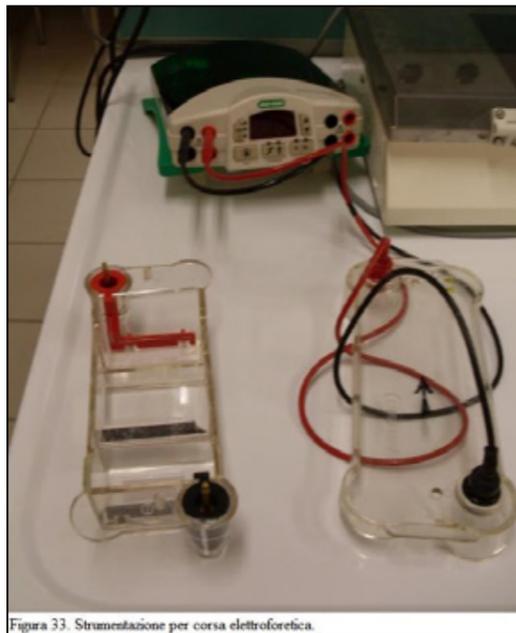


Figura 33. Strumentazione per corsa elettroforetica.

Dopo la solidificazione del gel nella vaschetta, è possibile inserirlo all'interno della vasca predisposta alla corsa e pipettare all'interno dei pozzetti il tampone circostante.

Si procede disponendo sul banco una striscia di parafilm, su cui si immetteranno tante gocce da 2  $\mu$ L di colorante bludibromofenolo (fig.34A), a temperatura ambiente, quanti sono gli amplificati da

caricare nei pozzetti. In corrispondenza della goccia, vengono disposti 12  $\mu$ L di amplificato (fig.34B); si mescola (fig.34C), pipettando, e si prelevano i 14  $\mu$ L totali, per iniettarli nel pozzetto. Si ripete lo stesso procedimento per ciascun amplificato, ponendo attenzione alla posizione del pozzetto in cui viene collocato.

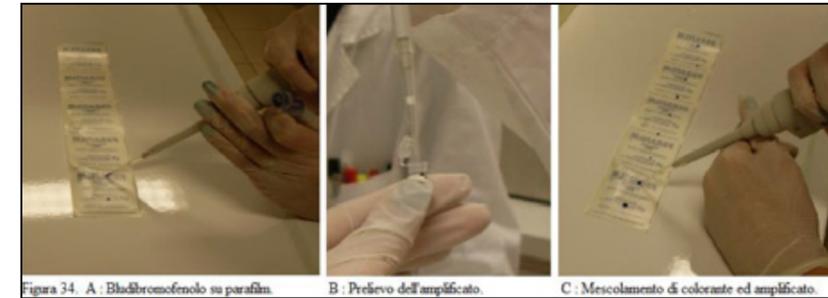


Figura 34. A: Bludibromofenolo su parafilm. B: Prelievo dell'amplificato. C: Mescolamento di colorante ed amplificato.

Nel primo pozzetto, si inseriscono 12  $\mu$ L di un marker a peso molecolare noto, da confrontare con gli altri amplificati, e si immettono gli amplificati, mescolati al colorante, nei successivi pozzetti (fig.35).

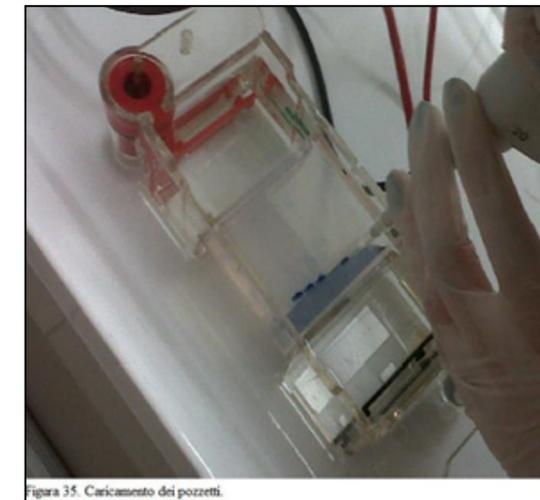


Figura 35. Caricamento dei pozzetti.

Una volta caricati tutti i pozzetti, si avvia la corsa elettroforetica, applicando un voltaggio di 80 V, per circa 60 minuti (fig.36).

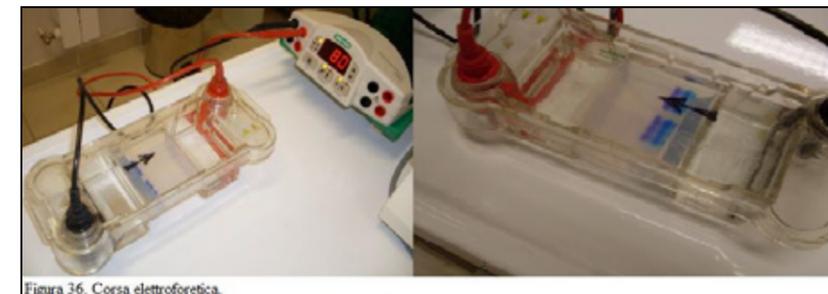


Figura 36. Corsa elettroforetica.

Si pone termine alla corsa nel momento in cui si osservano le bande colorate dell'amplificato in prossimità della regione finale del gel di agarosio e si trasferisce il gel su una lampada UV, per osservarlo (fig.37).



Figura 37. Gel di agarosio su lampada UV.

## 2.5 RILEVAZIONE DELLE MUTAZIONI: REVERSE DOT BLOT

La tecnica del Reverse Dot Blot (RDB) consente di rilevare la presenza delle eventuali mutazioni e prevede una reazione di ibridazione allele specifica tra i prodotti della PCR e le sonde molecolari oligonucleotidiche complementari alla sequenza normale o a quella mutata. Le sonde allele specifiche, che portano un gruppo amminico in posizione 5', vengono fatte aderire stabilmente a una membrana di nylon carica negativamente. Dopo l'ibridazione tra le sonde e il DNA amplificato, nel quale è incorporato dUTP biotinilato, si procede alla visualizzazione colorimetrica con una reazione di tipo biotina-streptavidina-fosfatasi alcalina (fig.38).

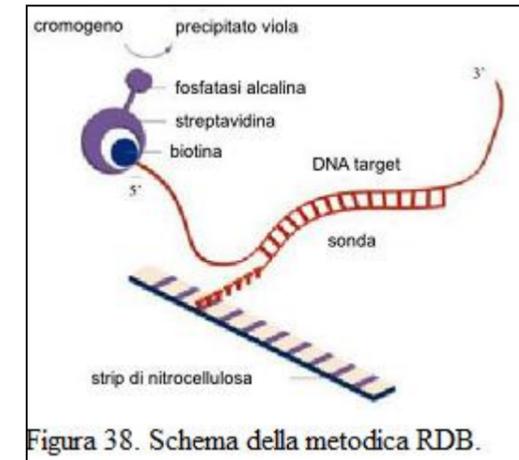


Figura 38. Schema della metodica RDB.

Il sistema è rapido, affidabile e non richiede strumentazioni sofisticate (fig.39).



Figura 39. Materiale occorrente per RDB.

### 2.5a Procedura del RDB

Si accende il bagnomaria, portandolo alla temperatura di 41°C; si regola il livello dell' H<sub>2</sub>O, la quale deve coprire i 2/3 della vaschetta che verrà introdotta, e si immette all'interno la soluzione di ibridazione e di lavaggio stringente, al fine di preriscaldarle.

Si predispongono sul banco il DNAT; la soluzione coniugata; la soluzione di lavaggio B; lo sviluppatore del colore, che devono trovarsi a temperatura ambiente; le eppendorf contenenti il DNA amplificato; le strip, su della carta assorbente; la pinzetta e le pipette.

Si utilizzano 2 vaschette da rivelazione, opportunamente contrassegnate, al fine di rilevare per ogni campione 38 mutazioni, con l'ausilio di 2 strip, rispettivamente, da 22 mut e da 16 mut.

**DENATURAZIONE:** Si immettono in ogni corsia della vaschetta

15  $\mu$ L di **denaturante** (si useranno n corsie quanti sono i campioni da analizzare), che si presenterà di colore blu (fig.40).

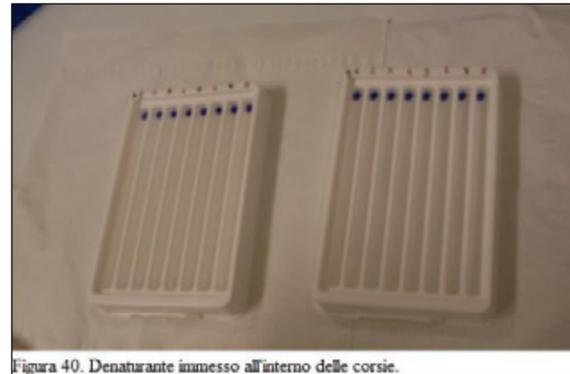


Figura 40. Denaturante inneso all'interno delle corsie.

Denaturante (DNAT): permette l'apertura della doppia elica di DNA e la formazione dei singoli filamenti di acido nucleico.

Si aggiungono 15  $\mu$ L di **prodotto di amplificazione** (fig.41), si mescola bene, con l'ausilio della pipetta, e si incuba per 5 minuti a temperatura ambiente.



Figura 41. Aggiunta dell'amplificato e mescolamento con il DNAT.

**RINATURAZIONE:** Si pipetta, per ogni campione, 1 mL di **soluzione di ibridazione** (fig.42A).

Soluzione di ibridazione: preriscaldata a 41°C.  
Consente il legame tra il singolo filamento di DNA e gli oligonucleotidi presenti sulla strip.

Si agita leggermente la vaschetta: si osserverà la scomparsa del colore blu (fig.42B).

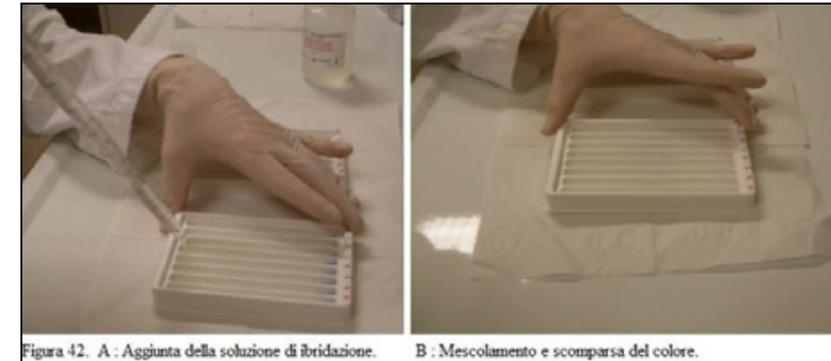


Figura 42. A: Aggiunta della soluzione di ibridazione. B: Mescolamento e scomparsa del colore.

A questo punto, si immerge una striscia, con le marker lines verso l'alto, in ogni corsia: nella vaschetta contenente l'amplificato con mix1 si introducono le strips CF22Mut, mentre in quella con all'interno l'amplificato con mix2 si immettono le strips CF16Mut+Tn (fig.43).

**Prima strip (22 mut):**

ESONE	MUTAZIONE	LUNGHEZZA AMPLIFICATO
13	2183AA>G	400 bp
INTRONE 19	3849+10Kb C>T	343 bp
3	G85E	311 bp
14b	2789+5G>A	310 bp
20	W1282X, G1244E	291 bp
5	711+5G>A, 711+AG>T	262 bp
21	N1303K, 4016 insT	239 bp
11	G542X, 1717-1G>A, R553X, Q552X, G551D, S549R (A>C)	199 bp
10	DF508, DI507, F508C, I502T, 1706del17, 1677 delTA	171 bp

**Seconda strip (16 mut+Tn):**

ESONE	MUTAZIONE	LUNGHEZZA AMPLIFICATO
4	621+G>T, R117H, I148T	292 bp
18	D1152H	334 bp
17b	L1055P, R1066H, L1077P	143 bp
24	4382delA	240 bp

19	R1162X, R1158X	213 bp
8	1259insA	410 bp
6a	852del22	159 pb
7	R347P, T338I	188 bp
Intr8/Es9	Alleli5T/7T/9T	270 pb
15	S912X	184 pb
17a	3199del6	239 pb

Strips con oligonucleotidi: vi si legherà il DNA denaturato. Consentono la rilevazione del genotipo del campione, in relazione al gene CFTR.

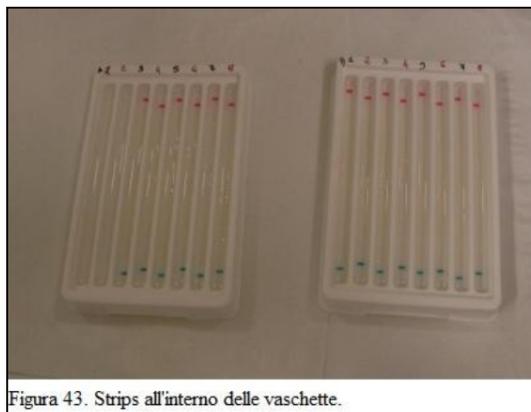


Figura 43. Strips all'interno delle vaschette.

Si incuba per 45 minuti a 41°C nel bagnomaria, chiuso con un coperchio per evitare variazioni di temperatura, mantenendo le strisce in agitazione a 50 rpm (fig.44).



Figura 44. Vaschette nel bagnomaria dotato di agitatore.

Si elimina, grazie ad un aspiratore, il liquido da ogni corsia della vaschette e si aggiunge 1 mL di **soluzione di lavaggio stringente** (fig.45A).

Soluzione di lavaggio stringente: fornita dal kit e preriscaldata a 41°C.

Dopo circa 10 secondi, si aspira il liquido (fig.45B).

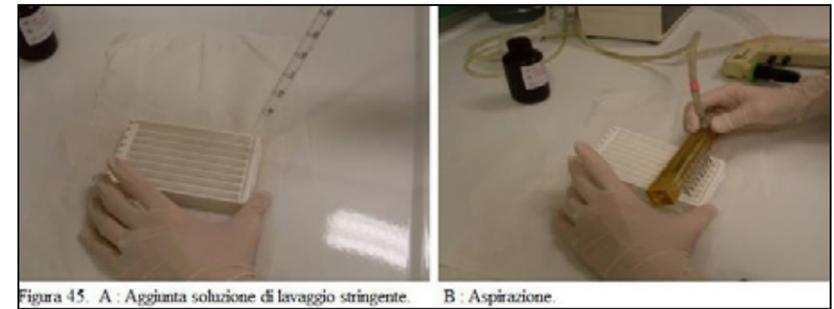


Figura 45. A: Aggiunta soluzione di lavaggio stringente. B: Aspirazione.

Si aggiunge nuovamente 1 mL di soluzione di lavaggio stringente e si incuba per 10 minuti nel bagnomaria a 41°C, con un'agitazione di 50 rpm.

Si aspira il liquido; si immette un altro mL di soluzione di lavaggio stringente; si incuba a 41°C per 10 minuti nel bagnomaria in agitazione e si elimina il liquido.

**REAZIONE BIOTINA-STREPTAVIDINA:** Ora è possibile aggiungere 1 mL di **soluzione coniugato** ed incubare a temperatura ambiente per 20 minuti, mantenendo le strisce in agitazione, dopo averle disposte sul coperchio del bagnomaria (fig.46).

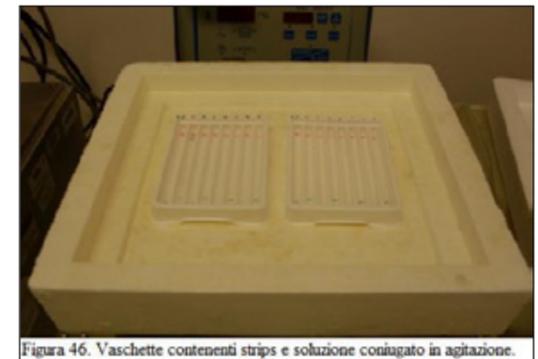


Figura 46. Vaschette contenenti strips e soluzione coniugato in agitazione.

Soluzione coniugato: presente nel kit.

É costituita da streptavidina coniugata con fosfatasi alcalina.

Si elimina il liquido e si immette 1 mL di **soluzione di lavaggio B**.

Soluzione di lavaggio B: fornita dal kit.

Si attende circa 10 secondi e si aspira il liquido.

Si aggiunge un altro mL di soluzione di lavaggio B e si incuba a temperatura ambiente per 5 minuti, disponendo sul coperchio del

bagnomaria le vaschette, per mantenere le strisce in agitazione costante.

L'agitazione, richiesta in vari steps, garantisce il contatto tra gli oligo presenti sulle strips e il DNA denaturato, che vi si legherà se complementare alla loro sequenza nucleotidica.

Si aspira il liquido e si ripete l'ultimo passaggio, pipettando 1 mL di soluzione di lavaggio B ed incubando, in agitazione, a temperatura ambiente per 5 minuti.

Si elimina il liquido; si aggiunge 1 mL di **sviluppatore del colore** (fig.47A).

Sviluppatore di colore: rende possibile l'osservazione delle zone di legame tra gli oligo e il DNA, attraverso la formazione di bande colorate sulle strips.

Si incuba per 20 minuti a temperatura ambiente, in agitazione, al buio, predisponendo un coperchio sulle vaschette (fig.47B).



Figura 47. A : Aggiunta dello sviluppatore del colore. B : Incubazione al buio ed agitazione delle vaschette.

Si immette H<sub>2</sub>O distillata nella corsia, per attuare il lavaggio finale delle strips (fig.48).

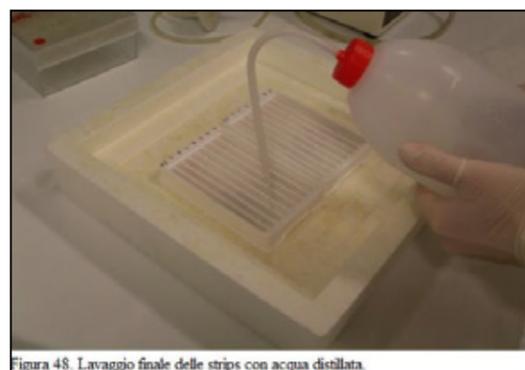


Figura 48. Lavaggio finale delle strips con acqua distillata.

Le strips, che risultano colorate al termine della procedura (fig.49), vengono prelevate, con una pinzetta; vengono lavate diverse volte, con H<sub>2</sub>O distillata, ed asciugate al buio con carta assorbente.

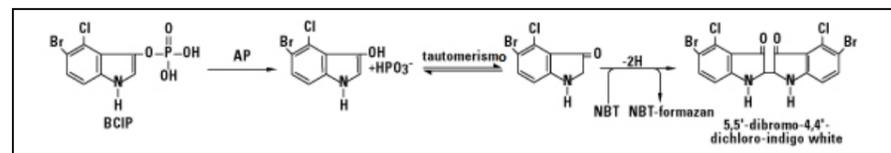


Figura 49. Strips colorate al termine della procedura RDB.

Negli ultimi passaggi, la Streptavidina ha formato un legame con la Biotina e, se nel DNA del campione è presente una sequenza nucleotidica complementare ad uno degli oligo, sulla strip si formerà un "sandwich" tra l'oligonucleotide ed il complesso DNA-Biotina-Streptavidina-AP. Lo sviluppo del colore, invece, è avvenuto grazie all'enzima fosfatasi alcalina, il quale sposta un gruppo fosfato dal colorante NBT (4-nitro-blue-tetrazolium-chloride) al BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indoyl-phosphate), dando luogo ad un precipitato insolubile di colore blu, in corrispondenza della zona in cui è avvenuta l'ibridazione tra oligo e DNA-campione.

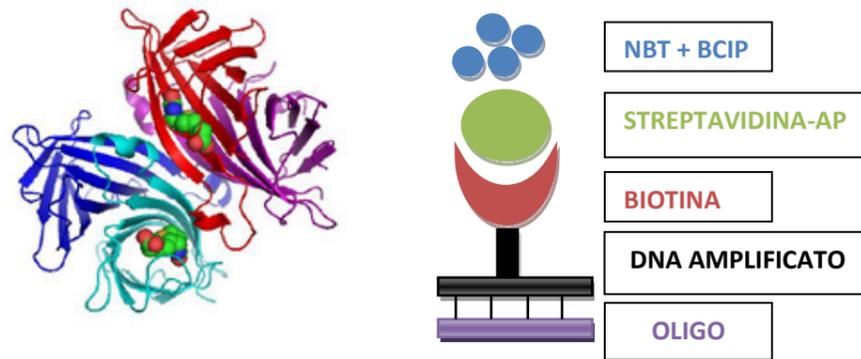
La Streptavidina è una proteina di 60 kDa, purificata, per la prima volta, dal batterio *Streptomyces Avidinii*. La Streptavidina umana tetramerica ha una straordinaria affinità per la Biotina, conosciuta anche come vitamina B7. Il legame che si forma tra loro è una delle più forti interazioni non-covalenti conosciute in natura.

### La reazione tra i coloranti NBT e BCIP:



### Il legame Biotina-Streptavidina:

### Il processo di colorazione:

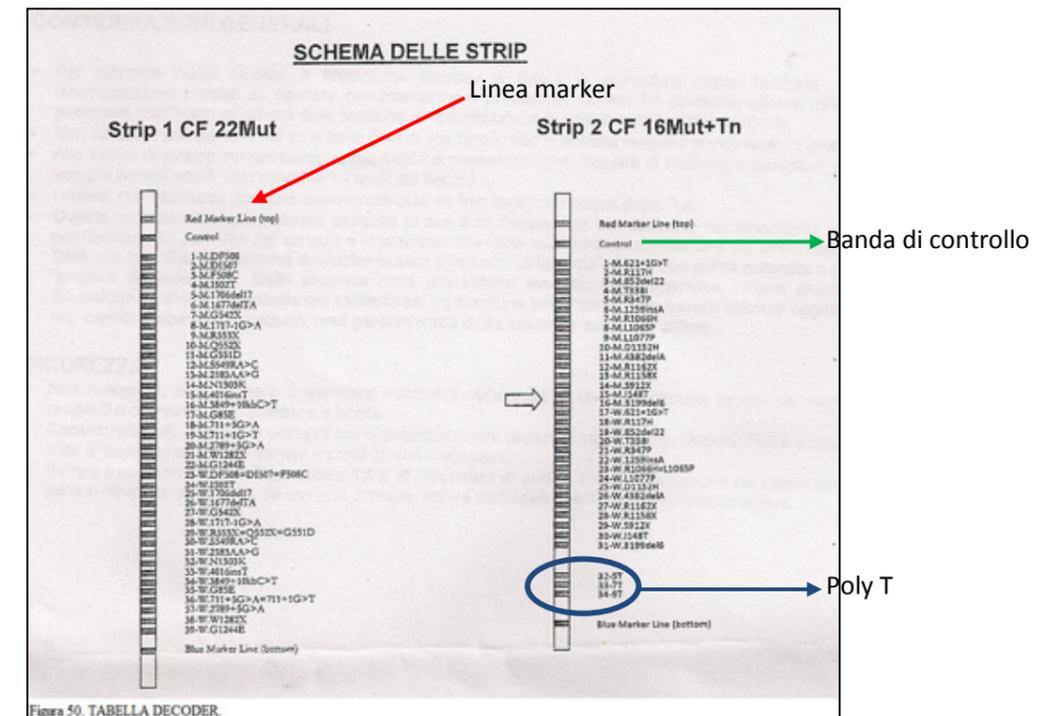


### 2.5b Interpretazione dei risultati

Per determinare il genotipo di un campione, confrontare la striscia corrispondente con la TABELLA DECODER (fig.50), fornita dal kit.

La linea rossa in alto e la linea azzurra in basso (linee marker) servono da guida per il corretto allineamento tra la striscia e la tabella decoder.

La banda di controllo indica il corretto funzionamento del coniugato e dello sviluppatore del colore e, perciò, deve risultare sempre positiva.



Nella strip 2 si studia anche il polimorfismo polipirimidinico (polyT), di lunghezza variabile, che può presentarsi all'interno dell'introne 8 del gene CFTR. La variabilità si manifesta sotto forma di tre alleli, chiamati 5T, 7T, 9T, a seconda del numero di timine presenti. In particolare, l'allele 5T è associato ai cromosomi mutati dei maschi con CBAVD. Gli alleli 7T e 9T generano un TRASCritto NORMALE, mentre la variante 5T dà luogo ad un trascritto anomalo. Questa ultima variante in omozigosi o in doppia eterozigosi con un'altra mutazione del gene CFTR, rappresenta un forte fattore di rischio di infertilità maschile in quanto può portare all'assenza congenita, anche bilaterale, dei vasi deferenti. Esiste un forte linkare disequilibrium tra la mutazione F508del e l'allele 9T. Dall'osservazione delle bande si possono ottenere vari modelli di reattività (tab.7).

Solo la sonda wild type	GENOTIPO NORMALE
Sonda wild type e sonda mutata	GENOTIPO ETEROZIGOTE
Solo la sonda mutata	GENOTIPO OMOZIGOTE MUTATO

Tabella 7. Modelli di reattività.

Inoltre, ove necessario, abbiamo esteso l'analisi molecolare andando a ricercare ulteriori 21 mutazioni genetiche del gene regolatore della conduttanza trans-membrana della Fibrosi Cistica.

Queste ultime mutazioni sono “mutazioni regione specifiche”. Esse sono di seguito riportate:

1259insA, 4016insT, 4382delA, 852del22, D579G, G1244E, G1349D, I502T, L1065P, R1158X, T338I, S549R(A>C), 991del5, D1152H, 1898+3A>G, R1070Q, R1066H, R347H, 621+3A>G, E217G, R334Q.

Alcuni riarrangiamenti genetici coinvolgono le delezioni del gene CFTR e possono spiegare circa il 20% di casi clinici non identificati con le comuni metodologie suddette. Pertanto abbiamo studiato anche 7 delle più importanti macrodelezioni collegate alla malattia: Ex2del; Ex1in del; 22, 23, 24 del; 22, 23 del; 2, 3 del; 17a, 17b, 18 del denominata anche 3120+1kb del (8,6kb); 14b-17b del.

## 2.6 AMPLIFICAZIONE E RILEVAZIONE DELLE 20 MUTAZIONI REGIONE SPECIFICHE

### 2.6a Procedura di amplificazione

Eseguire le varie fasi della metodica in ghiaccio od in ambiente refrigerato.

Reattivi necessari:

1. AmpliTaq Gold (Applied Biosystem).
2. Acqua distillata.
3. INNO-LiPA CFTR Amplification Kit.
4. INNO-LiPA CFTR Italian Amplification.

Preparare la Mix come da tabelle seguenti (tab.8 e 9): far scongelare i componenti a T ambiente tranne la Taq Polimerasi che deve rimanere sempre congelata.

I volumi sono riferiti ad 1 campione; tenere conto nel calcolo finale anche di un controllo negativo-acqua- e di un campione extra.

COMPONENTI	VOLUMI
Acqua distillata autoclavata	24.3 µL
Amplification buffer	10 µL
INNOLiPA Primer	10 µL
Taq DNA Polimerasi (5U/µL)	0.7 µL
	<b>Volume totale 45 µL</b>

Tabella 8. Mix CFTR Italian Regional.

95°C	15 min	
95°C	1 min	<b>x 30</b>
57°C	1 min	
68°C	1 min	
68°C	10 min	

Tabella 9. Profilo di Amplificazione.

Al termine dell'amplificazione controllare su gel di agarosio al 2% la presenza degli ampliconi e porre nel frigorifero gli amplificati fino al momento della rilevazione.

### 2.6b Visualizzazione su gel di agarosio al 2%

La presenza del prodotto amplificato può essere verificata su un gel di agarosio al 2%. Dopo aver caricato 10 µL del prodotto amplificato per pozzetto, si può prevedere il seguente schema (tab.10):

Introne/Esone	Lunghezza (bp)	Bande visibili sul gel
Esone 8	521	<b>Banda 1</b>
Esone 10	491	
Esone 20	473	
Esone 6b	470	
Esone 24	436	<b>Banda 2</b>
Introne 10/Esone 11	425	
Esone 19	411	

Introne 17a/Esone 17b	395	
Esone 18	348	<b>Banda 3</b> (piuttosto larga)
Esone 21	341	
Esone 7	341	
Esone/Introne 12	331	
Esone/Introne 4	304	
Esone 6a	301	
Esone 22	297	
Tabella 10. Schema degli amplificati.		

### 2.6c Procedura per l'ibridazione inversa

- Soluzione Denaturante:** aggiungere 10 µL a ciascuna vaschetta.
- Campione Amplificato per la Italian Regional:** aggiungere 10 µL alla soluzione denaturante.
- Incubare per 5 min a T ambiente.
- Soluzione di Ibridazione:** immettere 2 mL della soluzione preriscaldata a 47°C in tutte le vaschette.
- LiPa strip per la Italian Regional:** aggiungere la strip in tutte le vaschette.
- Incubare a 47°C per 90 minuti in bagnomaria oscillante.
- Aspirare il liquido dalle vaschette.
- Lavaggio Stringente:** lavare 2 volte per 10-20 secondi con 2 mL della soluzione.
- Effettuare un terzo lavaggio ed incubare a 47°C per 30 min in un bagnomaria oscillante.
- Soluzione di Lavaggio:** lavare 2 volte per 1 min con 2 mL della soluzione.
- Soluzione di Coniugato:** aggiungere a tutte le vaschette 2 mL della soluzione.
- Incubare a T ambiente per 30 min su un agitatore orbitale.
- Soluzione di Lavaggio:** lavare le strip per 2 volte con 2 mL della soluzione per 1 min.
- Tampone Substrato:** aggiungerne 2 mL a tutte le vaschette.
- Incubare a T ambiente per 30 min su un agitatore orbitale.

16. Aspirare il liquido.

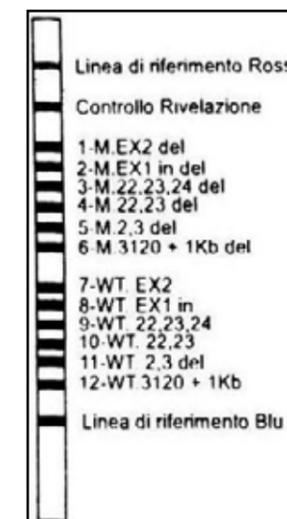
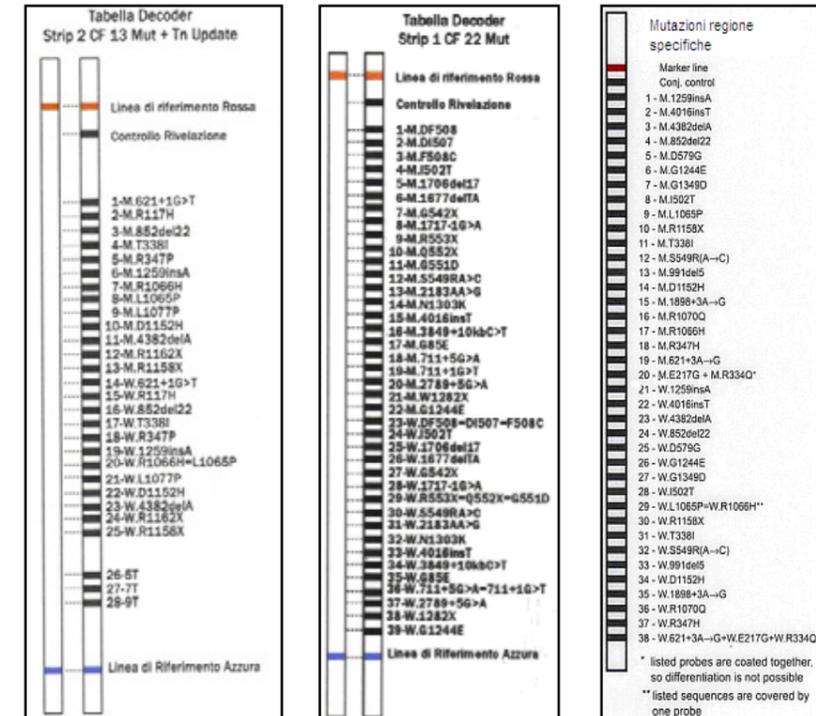
17. **Acqua distillata:** lavare 2 volte le strip con 2 mL di H<sub>2</sub>O distillata per 3 min.

18. Aspirare il liquido dalle vaschette.

19. Rimuovere le strip con una pinzetta.

20. Far asciugare completamente le strip.

21. Leggere i risultati utilizzando le seguenti tabelle DECODER:



I decoder rappresentano le mutazioni che vengono indagate presso il laboratorio di citogenetica e genetica.

CAPITOLO 3

ESEMPIO DI CASO CLINICO

RISCONTRATO DURANTE IL TIROCINIO

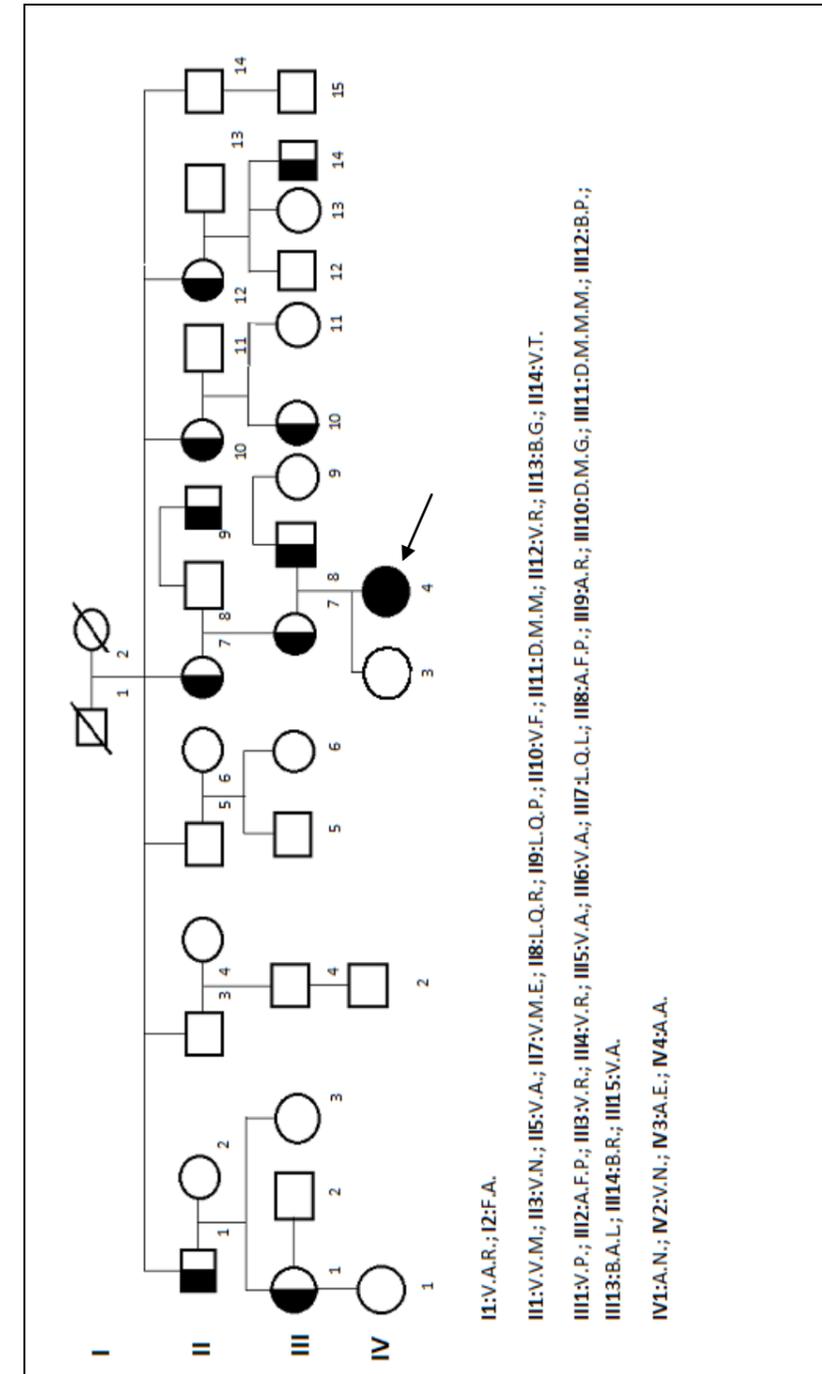
3.1 PRESENTAZIONE DEL CASO IN OGGETTO.

La piccola A.A. nata il XXXXXXX è giunta alla nostra osservazione in quanto il medico competente della U.O.C. di Pediatria del P.O. di Matera aveva riscontrato un test del sudore positivo. Per tale motivo il suddetto aveva richiesto l'indagine molecolare nel gene CFTR le cui mutazioni sono associate al quadro clinico sospettato.

Il test molecolare eseguito permette di rilevare complessivamente 58 mutazioni oltre ad identificare il polimorfismo del tratto polipirimidinico IVS8. Dette mutazioni sono le più rappresentative sul territorio nazionale e consentono di identificare circa il 95% delle mutazioni negli individui originari delle regioni dell'Italia meridionale (dati prelevati dal sito del gruppo italiano di fibrosi cistica per le regioni per le quali esiste un dato bibliografico: <http://spazioinwind.libero.it/laboratorioCF>).

L'analisi molecolare ha evidenziato nel gene CFTR la mutazione F508del in omozigosi. Tale assetto genetico è associato all'estrinsecazione della patologia denominata Fibrosi Cistica.

Per tale motivo si è proceduto all'indagine molecolare sui genitori e sui loro rispettivi consanguinei in modo tale da individuare i portatori sani del difetto genetico riscontrato e di conseguenza attivare tutte le procedure di prevenzione atte ad individuare i soggetti a rischio di procreare figli affetti da Fibrosi Cistica. I risultati dell'indagine molecolare sono riportati nel successivo albero genealogico.



## BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA

1. Viviani L, Padoan R, Giglio L, Bossi A. The Italian registry for cystic fibrosis: what has changed in the last decade. *Epidemiol Prev* 2003; 27: 91-96.
2. Corbetta C, Seia M, Bassotti A, Ambrosioni A, Giunta A, Padoan R. Screening for cystic fibrosis in newborn infants: results of a pilot programme based on a two tier protocol (IRT/DNA/IRT) in the Italian population. *J Med Screen* 2002; 9: 60-63.
3. NIH Consensus Statement. Genetic testing for cystic fibrosis. *Arch Intern Med* 1999;159, 1529-1539..
4. Robert G. Carroll. "Fisiologia. Percorsi integrati"; 2008 Elsevier Masson S.r.l.
5. Tommaso Alescio, A. Rita Buonomini, Luca Dori. "Biologia dinamica. Biologia generale e molecolare della cellula"; III edizione; 2003; Piccin Nuova Libreria S.p.A.
6. Thomas D. Pollard, William C. Earnshaw. "Biologia cellulare"; II edizione; 2008; Elsevier Masson S.r.l.
7. Knowles MR, Durie PR. "What is cystic fibrosis?" *N Engl J Med* 2002.
8. Marcorelles P, Montier T, Gillet D, Lagarde N, Ferec C. Evolution of CFTR protein distribution in lung tissue from normal and CF human fetuses. *Pediatr Pulmonol.* 2007 Nov;42(11):1032-40.
9. Rendine S, Calafell F, Cappello N, Gagliardini R, Caramia G, Rigillo N, Silveti M, Zanda M, Miano A, Battistini et al. Genetic history of cystic fibrosis mutations in Italy. I. Regional distribution. *Ann Hum Genet* 1997; 61: 411-424.
10. Balakrishna AM, Saxena AM, Mok HY, Swaminathan K. Structural basis of typhoid: Salmonella typhi type IVb pilin (PilS) and cystic fibrosis transmembrane conductance regulator interaction. *Proteins.* 2009 Nov 1;77(2):253-61.
11. Riordan JR, Rommens JM, Kerem BS, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989; 245: 1066-73.
12. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem BS, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, Zsiga M, Bukwald M, Riordan JR, Tsui LC, Collins FS. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989; 245: 1059-65.
13. Foresta C, Ferlin A, Gianaroli L, Dallapiccola B. Guidelines for the appropriate use of genetic tests in infertile couples. *Eur J Hum Genet* 2002.
14. Griesenbach U, Geddes D, Alton E. Gene therapy progress and prospects: cystic fibrosis. *Gene Ther* 2006.
15. Knowles MR, Hohneker KW, Zhou Z, Olsen JC, Noah TL, Hu PC, et al. A controlled study of adenoviral-vector-mediated gene in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 1995.
16. Alton E, Davies J, Geddes D. Biomarkers for cystic fibrosis: are we progressing? *Am J Respir Crit Care Med* 2007.
17. Ratjen FA. Cystic fibrosis: pathogenesis and future treatment strategies. *Respir Care* 2009.
18. Moss RB, Rodman D, Spencer LT, Aitken ML, Zeitlin PL, Waltz D, et al. Repeated adeno-associated virus serotype transmembrane regulator gene transfer to the lungs of patients with cystic fibrosis: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial.
19. Moss RB, Milla C, Colombo J, Accurso F, Zeitlin PL, Clancy JP, et al. Repeated aerosolized AAV-CFTR for treatment of cystic fibrosis controlled phase 2B trial. *Hum Gene Ther* 2007.

20. Howard M, Frizzell RA, Bedwell DM. Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations.
21. Wilschanski M, Yahav Y, Yaacov Y, Blau H, Bentur L, Rivlin J, et al. Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. *N Engl J Med* 2003.
22. Kerem E. Mutation specific therapy in CF. *Paediatr Respir Rev* 2006.
23. Cystic fibrosis Foundation. <http://www.cff.org>.

