



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Pediatria

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: MEDICINA DELLO SVILUPPO
E SCIENZE DELLA PROGRAMMAZIONE.
INDIRIZZO: MALATTIE RARE; GENETICA, BIOLOGIA E BIOCHIMICA.
CICLO XXIV

**SVILUPPO DI METODI PER L'IDENTIFICAZIONE E L'ANALISI DI
SEQUENZE GENICHE FETALI NELLA CIRCOLAZIONE MATERNA
PER UNA DIAGNOSI PRENATALE NON INVASIVA**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Giuseppe Basso

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Giorgio Perilongo

Supervisore: Ch.mo Prof. Maurizio Clementi

Dottorando: Alice Bruson

INDICE

ABSTRACT	1
1. INTRODUZIONE	5
1.1 Diagnosi genetica prenatale	5
1.2 Cellule fetali nel sangue materno	6
1.3 Acidi nucleici fetali liberi nel sangue materno	9
1.4 <i>The cell-free fetal DNA</i>	9
1.4.1 <i>Detection</i> del DNA libero fetale	12
1.4.2 Applicazioni cliniche	14
1.4.2.1 Determinazione del sesso fetale	15
1.4.2.2 Disordini correlati alla gravidanza	16
1.4.2.3 Aneuploidia	18
1.4.2.4 Malattie monogeniche	20
1.4.2.5 Marcatori fetali universali	20
2. SCOPO DELLA TESI	23
3. RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI IN ESAME	25
4. MATERIALI E METODI	27
4.1 Estrazione e purificazione di DNA libero circolante da plasma	27
4.2 Estrazione del DNA genomico	27
4.3 <i>Real-Time</i> qPCR	28
4.3.1 Verifica della sensibilità della tecnica	29
4.3.2 <i>Real-Time</i> qPCR per verificare l'efficienza del protocollo di estrazione	30
4.3.3 <i>Real-Time</i> qPCR per la determinazione del sesso fetale	31

4.4	<i>Mini-sequencing</i>	33
4.4.1	Verifica dell'informatività dei polimorfismi Selezionati	35
4.4.2	Verifica della sensibilità della tecnica	37
4.4.3	Reazione di <i>mini-sequencing</i>	37
4.5	<i>Nested PCR</i> allele-specifica	40
4.5.1	Verifica della sensibilità della tecnica	40
4.5.2	<i>Nested PCR</i> allele-specifica per la mutazione Δ F508 del gene CFTR (<i>Cystic Fibrosis</i> <i>Transmembrane Conductance Regulator</i>)	41
4.5.3	<i>Nested PCR</i> allele-specifica per la mutazione H515Q del gene HSD17B4 (<i>Hydroxysteroid</i> <i>(17-beta) dehydrogenase 4</i>)	43
5.	RISULTATI E DISCUSSIONE	47
5.1	Real-Time qPCR	47
5.1.1	Verifica della sensibilità della tecnica	47
5.1.2	Quantificazione del DNA libero totale	48
5.1.3	Determinazione del sesso fetale e quantificazione del cffDNA	50
5.2	<i>Mini-sequencing</i>	52
5.2.1	Verifica della sensibilità della tecnica	53
5.2.2	Identificazione di sequenze geniche utili al riconoscimento di cffDNA nelle gravidanze con feto di sesso femminile	54
5.3	<i>Nested PCR</i> allele-specifica	56
5.3.1	Verifica della sensibilità della tecnica	56
5.3.2	<i>Nested PCR</i> allele-specifica per la mutazione Δ F508 del gene CFTR	59
5.3.3	<i>Nested PCR</i> allele-specifica per la mutazione H515Q del gene HSD17B4	60

6. CONCLUSIONI	61
7. BIBLIOGRAFIA	65

ABSTRACT

Negli ultimi anni l'evoluzione della biologia molecolare ha permesso una conoscenza sempre maggiore del genoma umano e consente ormai la diagnosi in utero di un numero crescente di patologie genetiche. Al momento attuale la diagnostica prenatale di anomalie cromosomiche o di malattie genetiche richiede il prelievo di cellule fetali ottenibili con metodiche invasive, l'amniocentesi e la villocentesi. Queste tecniche comportano un rischio di provocare un aborto compreso fra 0.5% e 1%. Di fronte a questi limiti delle metodiche invasive sono stati messi a punto alcuni metodi di screening alternativi non invasivi, basati su parametri ecografici fetali e/o biochimici su sangue materno, che però hanno il limite di fornire risposte solo di tipo probabilistico.

L'introduzione di un test realmente alternativo di diagnosi prenatale non invasiva che permetta di eliminare il rischio di aborto legato all'amniocentesi e alla villocentesi è fortemente attesa. Infatti un simile test permetterebbe una estensione dell'analisi del materiale genetico fetale a molte più donne all'inizio della gravidanza e diminuirebbe l'impatto fisico e psicologico di questo tipo di indagine.

Nel 1997 uno studio ha dimostrato la presenza di DNA libero fetale (*cell-free fetal DNA*, cffDNA) nel plasma materno e ha evidenziato la sua potenzialità per una diagnosi prenatale non invasiva (NIPD). Durante i 15 anni successivi, si è sviluppata la ricerca di base sulle caratteristiche del DNA libero fetale e molti ricercatori hanno studiato la biologia e il significato clinico del trasporto di cffDNA nel circolo materno.

Il DNA libero fetale origina dall'apoptosi dei trofoblasti costantemente rimpiazzati sulla superficie della placenta e comprende circa il 3-6% del DNA libero totale nella circolazione materna. E' stato inoltre osservato che è costituito da corti frammenti di DNA (<200bp) piuttosto che interi cromosomi e che la sua concentrazione aumenta gradualmente durante la gravidanza: è rilevabile nella circolazione materna già a 32 giorni circa di gestazione (in quantità affidabile solo dopo le 7 settimane) e aumenta del 21% ogni settimana nel primo trimestre, con un forte picco durante le ultime 8 settimane di gravidanza per poi venire rapidamente rimosso dalla circolazione materna subito dopo il parto.

L'utilizzo del DNA fetale libero come mezzo per la diagnosi prenatale non invasiva di malattie genetiche fino ad ora è fortemente limitato dall'elevato *background* di DNA materno pertanto le prime strategie messe a punto per l'identificazione del DNA libero fetale si sono basate sul rilevamento di sequenze assenti nel genoma materno, come le sequenze Y-

specifiche, la determinazione del genotipo *RhD* fetale in donne *RhD*-negative e l'identificazione di sequenze fetali con mutazioni ereditate dal padre.

L'amplificazione tramite *Real Time* qPCR di sequenze unicamente fetali nel plasma di donne gravide rappresenta ad oggi il metodo di elezione per lo studio del DNA libero fetale, ma numerosi sforzi sono stati realizzati per la messa a punto di sistemi sempre più sensibili ed universali per rilevare le più piccole differenze tra il DNA fetale libero e quello materno, al fine di consentire un utilizzo su larga scala del cffDNA per la diagnosi prenatale non invasiva.

Lo scopo di questa ricerca è stato quindi, la messa a punto di protocolli validi per l'identificazione e l'analisi di sequenze geniche fetali nella circolazione materna.

Il progetto è stato quindi suddiviso in tre fasi: la prima fase ha comportato la messa a punto di opportuni protocolli di *Real-Time* qPCR per il rilevamento e la quantificazione sia del DNA libero totale estratto sia del cffDNA estratto in gravidanze con feto di sesso maschile; la seconda fase del progetto si è occupata di testare e sviluppare un protocollo affidabile per l'identificazione di sequenze geniche fetali utili al riconoscimento di cffDNA nelle gravidanze con feto di sesso femminile, mediante l'utilizzo della tecnica di *mini-sequencing*; l'ultima fase del progetto si è concentrata infine sulla messa a punto di un protocollo di verifica della presenza/assenza di mutazioni paterne in plasma materno mediante *nested* PCR allele-specifica.

L'analisi dei risultati ha dimostrato, per ogni tecnica sviluppata, elevate sensibilità e capacità di risoluzione accoppiate a velocità e facilità di esecuzione, confermandone quindi l'applicabilità per una diagnosi prenatale non invasiva. Inoltre l'utilizzo in combinazione delle due tecniche (*Real-Time* qPCR e *mini-sequencing*) per la conferma della presenza del cffDNA nel campione in analisi, si è rilevata indispensabile per poter escludere che il feto abbia ereditato la mutazione paterna, in tutti i casi in cui non viene identificata la mutazione. L'esclusione della mutazione paterna nel feto attraverso l'analisi su plasma materno permetterebbe quindi di evitare l'utilizzo di procedure invasive per il prelievo di cellule fetali e avere questa informazione alla 9-10 settimana di gravidanza consentirebbe di assicurare la coppia prima di qualsiasi altro test diagnostico di routine.

During last decade, molecular biology evolution has lead to a deep knowledge of human genome allowing the in-utero diagnosis of a large number of genetic diseases. Now adays performing a prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities and of genetic diseases,

requires genetic material from the fetus and this is possible only by invasive procedures such as amniocentesis and chorionic villus sampling. The risk of miscarriage of these techniques is between 0.5% and 1% and considering these limits, new alternative and non-invasive screening methods, based on ultrasound and/or biochemical parameters of maternal blood, were developed. The disadvantages of these methods are the probabilistic aspect of the results.

There was an increasing interest in a new approach that could keep to zero the risk of miscarriage, with an extension of fetal genetic materials screening to a large number of women at the beginning of pregnancy, leading a decreased physic and psychological impact.

In 1997 it was demonstrated the presence of cell-free fetal DNA (cffDNA) in the maternal blood and this has opened up new possibilities for a non-invasive prenatal diagnosis (NIPD).

The cell-free fetal DNA originates from apoptotic trophoblasts on placenta's surface and comprises around 3-6% of total cell-free DNA in maternal circulation. The cffDNA consists of short DNA fragments (<200bp). Fetal DNA can be detected from 32 days of gestation (though only reliably from 7 weeks) and it's concentration increases with gestational age (21% per week during the first three months) with a sharp peak during last 8 weeks of pregnancy. The cffDNA is completely removed after delivery.

The main problem related to the application of this NIPD is the high maternal background, so researchers have initially focused their attention on the detection of sequences that are absent in the maternal genome, such as DNA sequences from chromosome Y of male fetuses, the determination of fetal RhD genotype in women RhD-negative, and the detection of paternal mutations in maternal plasma.

Although, the Real Time qPCR amplification of fetal sequences is the widespread method for cffDNA study, there are still a lot of studies focused on the development different protocols for detection of minimal differences between maternal and fetal DNA.

The aim of this PhD thesis is the study and setup of different methods to identify fetal genomic sequences in maternal circulation.

The research project was divided in three steps: the first one was focused on the validation of *Real-Time* qPCR protocol, applied to the detection and quantification of total free DNA and of cffDNA in pregnancies with a male fetus; the second was focused on the develop of a reliable protocol for the identification of fetal genomic sequences useful to recognize cffDNA in pregnancies with a female fetus, by the mini-sequencing technics; finally, the last step was focused on the validation of an analytical protocol to verify the presence/absence of paternal mutations in maternal plasma using nested PCR allele-specific.

The results demonstrated here for each technic, show a high sensibility and resolution capacity, together with an easy and rapid handling. Furthermore, the combination of the two technics (Real-Time qPCR and mini-sequencing reaction) was essential in order to exclude the presence of a paternal mutation in the fetal genome in every case where a mutation wasn't identified. The ability to exclude the presence of the paternal mutation in the fetus by analysis of maternal plasma avoid the utilization of invasive prenatal tests and, at the same time, reassures the couple early in the course of the pregnancy about the recurrence of the disease, thus avoiding significant anxiety.

1 INTRODUZIONE

1.1 Diagnosi genetica prenatale

Per diagnosi genetica prenatale si intende l'insieme delle indagini, strumentali e di laboratorio, mediante le quali è possibile valutare la presenza di anomalie a carico del feto durante il corso della gravidanza. Negli ultimi anni, gli avanzamenti tecnologici nel campo della biologia hanno portato a una maggior comprensione delle basi molecolari delle malattie genetiche, fornendo nuove possibilità per la diagnosi in utero di tali patologie.

Scopo della diagnosi prenatale è di fornire un risultato diagnostico accurato nel minor tempo possibile e nelle fasi più precoci della gravidanza. Perché questo sia possibile è necessario quindi:

- a) identificare tempestivamente le coppie a rischio per una malattia;
- b) caratterizzarne le mutazioni causative;
- c) ottenere il materiale genetico fetale nelle prime epoche gestazionali con metodiche sicure;
- d) determinare il genotipo fetale sulla base delle mutazioni parentali.

Nel corso degli ultimi vent'anni la ricerca ha investito molto nello sviluppo di procedure diagnostiche e attualmente le tecniche disponibili si possono suddividere in due grandi categorie: le metodiche non invasive e le metodiche invasive.

I principali test non invasivi sono l'ecografia, il Bi-Test, il Tri-test e la translucenza nucale. Questi hanno un'attendibilità del 50 per cento e consentono esclusivamente una valutazione di tipo probabilistico (Grati *et al.*, 2010): non permettono infatti di identificare o di escludere direttamente le anomalie cromosomiche ma di selezionare pazienti a basso e ad alto rischio. Risultano quindi essere utili nel monitoraggio della gravidanza, ma del tutto inadeguate per una diagnosi genetica prenatale.

Le tecniche invasive, che consistono in villocentesi e amniocentesi, sono le uniche che consentono una possibilità di diagnosi di malattia di origine genetica poiché prevedono il prelievo di cellule fetali direttamente dall'utero materno. Il prelievo dei villi coriali è applicabile tra l'undicesima e a la quattordicesima settimana di gestazione, mentre l'amniocentesi si esegue dopo la quindicesima settimana e il risultato è generalmente

disponibile entro un paio di settimane per entrambi i test. Nel corso dei decenni queste tecniche sono state estremamente affinate, ma tutt'oggi il rischio di aborto successivo al prelievo non è stato del tutto azzerato e attualmente è valutato attorno al 0.5-1%. Per questo motivo, e per il fatto che tali procedure sono estremamente costose, la diagnosi prenatale invasiva è indicata solo in particolari condizioni:

- in donne di età superiore ai 35 anni;
- genitore portatore di anomalia cromosomica;
- precedente nato con anomalia cromosomica;
- malformazione fetale identificata ecograficamente;
- test di screening positivo;
- ricerca di agenti infettivi nel liquido amniotico;
- studio del DNA fetale per feto a rischio di malattia monogenica;
- determinazione di metaboliti nel liquido amniotico.

L'introduzione di un test realmente alternativo di diagnosi prenatale non invasiva (*Non Invasive Prenatal Diagnosis*, NIPD) che permetta la diagnosi di malattia di origine genetica e l'eliminazione del rischio di aborto legato all'amniocentesi e alla villocentesi è fortemente attesa. Infatti, un simile test permetterebbe l'estensione dell'analisi del materiale genetico fetale a molte più donne all'inizio della gravidanza e diminuirebbe l'impatto fisico e psicologico di questo tipo di indagine. Per tale motivo già da numerosi anni è cresciuto l'interesse per la messa a punto di procedure diagnostiche non rischiose per il feto, rivolte alla ricerca di una fonte alternativa di materiale genetico fetale. La dimostrazione ormai accettata che la placenta non costituisce, come si credeva in passato, una barriera che mantiene separati la madre e il feto geneticamente differenti ma si trova piuttosto al centro di un traffico bidirezionale ha portato quindi alla nascita di un nuovo campo di ricerca.

Tale ricerca si basa sul recupero di materiale genetico fetale dal sangue materno, sia sottoforma di cellule fetali sia sottoforma di acidi nucleici fetali.

1.2 Cellule fetali nel sangue materno

Il patologo tedesco Schmorl ha descritto per primo, nel 1893, la presenza di cellule fetali nella circolazione materna, rilevando la presenza di cellule del trofoblasto nella circolazione polmonare di 14 donne gravide decedute per eclampsia. Klinhauer e

collaboratori, nel 1957, riuscirono ad isolare eritrociti di origine fetale nella circolazione materna mentre nel 1969, Walknowska e collaboratori, riuscirono ad identificare leucociti fetali nel sangue di gravide portatrici di feto di sesso maschile (Bianchi, 1999).

Tali scoperte hanno dimostrato che nella circolazione materna sono riscontrabili tre tipi principali di cellule fetali: le cellule del trofoblasto, i leucociti e gli eritroblasti. Nonostante ciò, per molti anni l'esistenza delle cellule fetali nella circolazione materna è stata considerata controversa e la prova definitiva della loro reale presenza si è avuta solo con l'introduzione di tecniche analitiche più sensibili, quali l'ibridazione *in situ* fluorescente (FISH) e l'amplificazione del DNA tramite PCR. Solo nel 1993, infatti, Hamada e collaboratori, utilizzando FISH e PCR su sequenze specifiche del cromosoma Y, hanno dimostrato che nel sangue della gestante è presente circa una cellula fetale ogni 100.000 cellule nucleate materne nel primo trimestre di gravidanza e circa una cellula fetale ogni 10.000 cellule materne nel terzo trimestre di gravidanza (Hamada *et al.*, 1993). Questi dati sono stati poi confermati anche mediante saggi quantitativi con *Real-Time qPCR* (Bianchi *et al.*, 1997; Ariga *et al.*, 2001).

A causa della loro rarità, la proposta di utilizzare cellule fetali intatte isolate dal circolo materno per una diagnosi prenatale non invasiva è stata avanzata per la prima volta solamente nel 1990 (Bianchi, 1990). Da allora, gli studi si sono focalizzati sull'isolamento e la *detection* di cellule fetali nel sangue materno e numerosi metodi sono stati testati al fine di separarle dalle cellule materne o ad arricchire il sangue materno per la componente cellulare fetale per aumentare il numero di cellule fetali ottenibili.

I risultati sono stati però deludenti e non privi di controversie.

Per la diagnosi prenatale non invasiva, il tipo cellulare d'elezione dovrebbe presentare tre requisiti fondamentali:

1. essere rilevabile nella circolazione materna già nel primo trimestre di gravidanza,
2. possedere caratteristiche morfologiche distinguibili dalle cellule materne,
3. avere una vita media limitata nel sangue materno.

Le cellule del trofoblasto sono rilasciate nel sangue materno durante il primo trimestre di gravidanza e hanno una morfologia che ne consente un'inequivocabile identificazione al microscopio. Tuttavia vengono rapidamente catturate dalla circolazione polmonare rendendone difficile l'isolamento (Sargent *et al.*, 1994), hanno una natura multinucleata che può creare difficoltà nell'interpretazione dei segnali di fluorescenza in un'analisi di FISH e l'origine placentare che le caratterizza ne limita il loro utilizzo per la diagnosi citogenetica del

feto poiché comporta un rischio dell'1% di ottenere un cariotipo non rappresentativo del feto, a causa del fenomeno del mosaicismo placentare (Bianchi, 1999).

I leucociti sono stati il primo tipo di cellule fetali isolate con successo dal sangue materno da Herzenberg e collaboratori (Herzenberg *et al.*, 1979), basandosi sulla differenza tra madre e feto per gli antigeni HLA. Hanno la potenzialità di proliferare facilmente in vitro, permettendo di superare i limiti legati alla loro rarità, tuttavia il loro impiego è fortemente limitato dal presupposto che il padre deve essere noto e la coppia informativa relativamente ai polimorfismi HLA. Inoltre è stato dimostrato che possono persistere nella circolazione materna anche fino a 27 anni dopo il parto (Bianchi *et al.*, 1996), pertanto il loro utilizzo potrebbe portare ad errori interpretativi dovuti alla persistenza di cellule fetali da precedenti gravidanze (Ariga *et al.*, 2001).

Gli eritroblasti fetali sono cellule mononucleate altamente differenziate e con una breve emivita. Tuttavia gli eritroblasti fetali costituiscono solo una piccola frazione delle cellule fetali presenti nel sangue materno (Kølvraa *et al.*, 2005) e a causa del loro stato altamente differenziato è estremamente difficile espanderli in vitro. Inoltre numerosi studi hanno dimostrato che la maggior parte degli eritroblasti circolanti selezionati non sono di origine fetale (Slunga-Tallberg *et al.*, 1995; Sohda *et al.*, 1997; Little *et al.*, 1997; Von Eggeling *et al.*, 1997)

Nel sangue fetale sono state identificate anche cellule staminali mesenchimali fetali (Campagnoli *et al.*, 2001) che sembravano essere molto promettenti come bersaglio per la diagnosi prenatale non invasiva, sia perché compaiono precocemente, a partire dalla settima settimana di gestazione, sia perché hanno una morfologia ed un immunofenotipo caratteristici. Purtroppo però tutti i tentativi fatti per isolarle hanno dimostrato che queste cellule sono estremamente rare nella circolazione materna, escludendone quindi la possibilità di utilizzo su larga scala nella diagnosi prenatale non invasiva (O'Donoghue *et al.*, 2003).

Nonostante fino ad ora siano stati pubblicati numerosi studi di diagnosi prenatale non invasiva utilizzando cellule fetali su campioni ristretti, questi non sono stati confermati dai lavori fatti su una casistica più ampia precludendo così, almeno per il momento, un utilizzo routinario delle cellule fetali nella diagnosi prenatale non invasiva.

1.3 Acidi nucleici fetali liberi nel sangue materno

La scoperta della presenza di acidi nucleici liberi nel plasma risale a più di 50 anni fa, ma solo a partire dagli anni '60 sono cominciati i primi studi (Bischoff *et al.*, 2005). Nel 1966 è stata dimostrata la presenza di elevate quantità di DNA circolante libero nel siero di pazienti affetti da lupus eritematoso sistemico (Tan *et al.*, 1966) e nel 1977 nel siero di pazienti affetti da artrite reumatoide (Leon *et al.*, 1977a). Nello stesso anno è stato anche dimostrato un aumento della concentrazione del DNA libero circolante nel siero dei pazienti affetti da cancro e che la sua concentrazione aumenta in presenza di metastasi mentre diminuisce nei pazienti trattati con un'efficace terapia antitumorale (Leon *et al.*, 1977b). Soltanto alla fine degli anni novanta è stato possibile dimostrare che il DNA libero circolante deriva da cellule tumorali che muoiono per apoptosi (Giacona *et al.*, 1998; Jahr *et al.*, 2001).

Nel 1997 Lo e collaboratori (Lo *et al.*, 1997) hanno dimostrato la presenza di DNA libero fetale (*cell-free fetal DNA*, cffDNA) nel plasma materno e ne hanno evidenziato la potenzialità per una diagnosi prenatale non invasiva. Mentre nel 2000 è stata dimostrata la presenza, nella circolazione materna, anche dell'mRNA fetale libero di geni con un'univoca espressione placentare (Poon *et al.*, 2000).

Nonostante entrambi i tipi di acidi nucleici liberi fetali possano rappresentare potenziali target per la diagnosi prenatale non invasiva, la maggior parte degli studi si è focalizzata sull'utilizzo del cffDNA.

1.4 *The cell-free fetal DNA*

Durante gli anni successivi la sua scoperta, si è sviluppata la ricerca di base sulle caratteristiche del DNA libero fetale e molti ricercatori ne hanno studiato la biologia, l'origine e il significato clinico del trasporto nel circolo materno.

La prima strategia messa a punto per l'identificazione del DNA libero fetale si è basata sul rilevamento di sequenze assenti nel genoma materno, come le sequenze Y-specifiche, prima attraverso tecniche di *nested PCR* (Lo *et al.*, 1997) poi attraverso *Real Time PCR* (Lo *et al.*, 1998a), per avere anche un profilo quantitativo nelle varie epoche gestazionali. E' stato quindi dimostrato che il DNA libero fetale rappresenta circa il 3,4% del DNA libero plasmatico (con valori che oscillano tra lo 0,39% e l'11,9%) nel primo trimestre e circa il

6,2% (con valori che oscillano tra lo 2,33% e l'11,4%) nel terzo trimestre. Lo stesso studio inoltre ha quantificato che la concentrazione media di DNA libero fetale nel plasma materno è circa 20 volte più elevata rispetto al DNA fetale dovuto alla componente cellulare nella medesima settimana gestazionale (Lo *et al.*, 1998a).

È stato inoltre dimostrato che, a differenza del DNA cellulare, il DNA libero circolante è costituito prevalentemente da corti frammenti di DNA piuttosto che da interi cromosomi e che il cffDNA è composto da frammenti generalmente più corti (<300bp, di cui l'80% <193bp) di quelli del DNA libero circolante materno (> 500 bp) (Li *et al.*, 2004a; Chan *et al.*, 2004, Hromadnikova *et al.*, 2006).

Studi sull'andamento quantitativo del DNA libero fetale durante la gravidanza hanno permesso di evidenziare che la concentrazione aumenta gradualmente durante la gravidanza: è rilevabile nella circolazione materna già a 32 giorni di gestazione (Illanes *et al.*, 2007), anche se in modo affidabile solo dalla settima settimana, e aumenta di media del 21% ogni settimana nel primo trimestre e del 29% ogni settimana del terzo trimestre per raggiungere l'incremento massimo immediatamente prima del parto (Lo *et al.*, 1998a; Chan *et al.*, 2003). È stata stimata una concentrazione media di 16 genomi fetali per millilitro di sangue materno nel primo trimestre e di 80 nel terzo trimestre (Birch *et al.*, 2005).

Studi sulla *clearance* del DNA fetale libero dopo il parto hanno dimostrato che il cffDNA viene rapidamente degradato dalla circolazione materna con un'emivita media di 16,3 minuti (range 4-30 min) e non è più rilevabile 2 ore dopo il parto (Lo *et al.*, 1999a). Supponendo inoltre che non ci siano bruschi cambiamenti nella *clearance* del DNA fetale libero associati con il parto, Lo e collaboratori hanno ipotizzato che, per mantenere uno stato stazionario, il DNA fetale deve essere continuamente liberato in grandi quantità nella circolazione materna. I loro calcoli suggeriscono che il DNA fetale viene liberato nella circolazione materna ad una velocità media di $2,24 \times 10^4$ copie/min. Il rapido *turnover* del cffDNA nel plasma materno implica quindi che variazioni nella sua concentrazione forniscono un quadro, quasi in tempo reale, degli eventi che intercorrono tra madre e feto e che perciò possa essere utile per il monitoraggio della gravidanza (Bianchi, 2004).

Un acceso dibattito è stato aperto circa il tessuto di origine del DNA fetale circolante. Tre fonti principali sono state prese in considerazione: le cellule fetali ematopoietiche, la placenta e il trasferimento diretto di molecole di DNA.

Secondo la prima ipotesi, il DNA fetale libero avrebbe origine dall'apoptosi delle cellule fetali ematopoietiche nella circolazione materna (Chan *et al.*, 2004). Sebbene teoricamente possibile, le cellule fetali sono estremamente rare nel sangue materno ed è

quindi improbabile che possano spiegare le più elevate quantità di DNA fetale circolante. I dati più convincenti a sostegno del fatto che gli eritroblasti fetali non sono la fonte del DNA fetale circolante, sono stati pubblicati nel 2002 (Zhong *et al.*, 2002). Zhong e collaboratori raccolsero campioni di sangue intero da donne in gravidanza con feto di sesso maschile suddivise a seconda del tipo di gravidanza (normale, a rischio di eclampsia, a rischio di parto pretermine) e per ogni campione contarono il numero di cellule fetali intatte e misurarono i livelli di DNA libero. I risultati ottenuti mostrarono un aumento significativo dei livelli di DNA fetale libero nel gruppo di donne con gravidanza a rischio rispetto al gruppo con gravidanza normale e contemporaneamente alcuna variazione nel numero di cellule fetali tra i differenti gruppi.

La placenta è la fonte più logica di DNA fetale circolante, grazie alle sue abbondanti dimensioni e all'attività cellulare. L'ipotesi più accreditata suggerisce infatti che il DNA fetale libero origini dall'apoptosi dei trofoblasti costantemente rimpiazzati sulla superficie della placenta (Tjoa *et al.*, 2006, Alberry *et al.*, 2007). A sostegno di questa teoria esistono numerose evidenze:

1. l'assenza di DNA fetale libero nella circolazione materna in casi di mosaicismo placentare (Flori *et al.*, 2004);
2. l'assenza di DNA fetale libero 2 ore dopo il parto (Lo *et al.*, 1999a);
3. la presenza di DNA fetale libero nella circolazione materna dopo il parto quando una parte della placenta non viene espulsa ma trattenuta (Jimbo *et al.*, 2003);
4. la presenza di molecole di mRNA placenta-specifiche facilmente rilevabili nel plasma materno (Ng *et al.*, 2003);
5. il rilevamento nella circolazione materna di sequenze fetali con *patterns* di metilazione specifici della placenta (Chim *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2006).

Infine è importante notare che sequenze geniche fetali sono state rilevate anche in diversi altri fluidi del corpo materno, compresi liquido amniotico, urina, liquido cerebrospinale e liquido peritoneale (Bianchi, 2004). La concentrazione di DNA libero fetale, nel liquido amniotico è di circa 200 volte più elevata di quello che si trova in plasma materno, questo ha portato ad alcune speculazioni in merito alla possibilità della formazione di un gradiente di concentrazione che porta al trasferimento passivo di molecole di DNA fetale alla circolazione materna (Bianchi *et al.*, 2001).

Informazioni cliniche e fisiologiche, se considerate insieme, suggeriscono quindi che la maggior parte del DNA libero fetale presente nella circolazione materna deriva dalla

placenta, con un minimo di contributo del sistema ematopoietico fetale e del feto stesso tramite trasferimento diretto (Bianchi, 2004).

1.4.1 **Detection del DNA libero fetale**

Distinguere o addirittura isolare il DNA libero di origine fetale in un elevatissimo *background* materno è la sfida tecnica di questo ultimo decennio.

Infatti esistono numerosi problemi generali associati alla *detection* del cffDNA nella circolazione materna:

1. la concentrazione è relativamente bassa;
2. la quantità del DNA libero totale nel sangue varia enormemente tra gli individui;
3. le molecole di cffDNA stanno in rapporto di circa 1:20 rispetto alle molecole di DNA libero di origine materna;
4. il feto eredita metà del suo genoma dalla madre (Wright and Burton, 2009).

Un certo numero di metodi sono stati quindi sviluppati per ovviare a questi problemi.

Il primo step per l'analisi del cffDNA è ovviamente l'estrazione del DNA libero dal sangue: la frazione plasmatica deve essere separata dalla componente cellulare e successivamente il DNA libero deve esserne isolato e purificato. La resa dell'estrazione può quindi variare a seconda della procedura di trattamento adottata (Chiu *et al.*, 2001) e diventare un fattore limitante per la genotipizzazione del feto da sangue materno. È stato quindi organizzato un *workshop* europeo di valutazione dei diversi protocolli utilizzati e successivamente è stato avviato un processo di standardizzazione per l'estrazione di cffDNA dal plasma materno (Legler *et al.*, 2007), approvato anche dal SAFE (*The Special Non-Invasive Advances in Fetal and Neonatal Evaluation*) Network.

La tecnica base più comunemente utilizzata per rilevare ed identificare specifiche sequenze di cffDNA è la reazione a catena della polimerasi (PCR). Ma numerosi tipi diversi di PCR sono stati testati: *Nested* PCR, PCR allele-specifica, *Real-Time* qPCR. Tra queste la più utilizzata è la *Real-Time* qPCR, in quanto unisce elevata sensibilità e riproducibilità con un sistema abbastanza economico, veloce e di facile esecuzione (Traeger-Synodinos, 2006).

Un'altra tecnica molto sensibile è stata applicata per l'identificazione di cffDNA, la spettrometria di massa (Ding *et al.*, 2004), in cui la massa precisa di ogni frammento di DNA viene analizzata per determinare la sequenza genica permettendo quindi di rilevare sequenze

allele fetali che differiscono dalla sequenza materna anche di una singola base. Tuttavia questo approccio si basa sull'impiego di una apparecchiatura altamente sofisticata, con costi elevati e non facilmente accessibile.

Molto recentemente sono stati sviluppati dei nuovi sistemi automatizzati di sequenziamento, quali la *digital PCR* e *the next-generation sequencing*, i quali sembrano aver ampliato enormemente le possibilità di NIPD poiché dimostrano livelli di precisione e sensibilità molto superiori ai metodi tradizionali consentendo la quantificazione di ogni singola molecola di acido nucleico. Questo tipo di approccio diagnostico è molto promettente sia nella diagnosi di aneuploidia sia nella diagnosi di malattie monogeniche, ma attende ancora la conferma con studi su larga scala (Chiu and Lo, 2011).

Come per tutte le tecniche, l'accuratezza e l'affidabilità della *detection* possono essere significativamente migliorate aumentando il rapporto segnale/rumore di fondo. Sono stati sviluppati due metodi alternativi specificamente volti ad aumentare la percentuale di cffDNA rispetto al DNA materno:

1. la maggior parte del DNA circolante di origine fetale è composto da frammenti generalmente più corti (< 300 bp) di quelli del DNA libero circolante materno (> 500 bp) (Li *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2004, Hromadnikova *et al.*, 2006). Pertanto un arricchimento selettivo del DNA fetale, sulla base della differenza media di lunghezza fisica tra i frammenti di DNA fetale e materno potrebbe essere sfruttato per aumentare la quantità relativa di cffDNA.
2. l'aggiunta di formaldeide al campione di sangue dovrebbe stabilizzare le cellule materne intatte inibendo così un ulteriore rilascio di DNA materno nel campione e aumentando la percentuale relativa di DNA fetale (Dhallan *et al.*, 2004). Tuttavia, l'uso della formaldeide per questo scopo è controversa (Benachi *et al.*, 2005) e la ripetibilità del protocollo pubblicato è stata messa in discussione da diversi studi (Chinnapapagari *et al.*, 2005; Chung *et al.*, 2005).

Numerosi sforzi sono stati realizzati per la messa a punto di sistemi sempre più sensibili ed universali per rilevare le più piccole differenze tra il DNA libero fetale e quello materno.

1.4.2 Applicazioni cliniche

Nonostante esista una serie di ostacoli tecnici e clinici per il raggiungimento di elevati livelli di accuratezza diagnostica nell'uso del DNA libero fetale in diagnostica prenatale e una più ampia sperimentazione clinica sia ancora necessaria prima dell'introduzione di questa tecnica nella *routine* di diagnosi clinica, la sua potenzialità clinica e le sue implicazioni etiche e sociali sono estremamente importanti.

Ad oggi, è stato pubblicato un discreto numero di applicazioni cliniche per l'analisi di cffDNA nello screening e/o diagnosi prenatale, sulla base delle differenze distinguibili e rilevabili tra il genoma fetale e quello materno (Figura 1.1):

- determinazione del sesso fetale, rilevando sequenze del cffDNA sul cromosoma Y;
- disordini correlati alla gravidanza, rilevando la presenza del gene Rh o un aumento della concentrazione assoluta di cffDNA;
- aneuploidia, rilevando una concentrazione anomala del particolare cromosoma di interesse;
- malattie monogeniche, rilevando la mutazione paterna nel cffDNA.

Table 1 Summary of nucleic acid sequences that have been detected in maternal blood for the purposes of NIPD (see text for details and references)

Purpose	Sequence detected	Detection method(s)
Sex determination [†]	SRY , <i>DYS14</i> , <i>DYS1</i> , <i>DYZ1</i> , <i>DYZ3</i> , <i>DAZ</i> , <i>ZFY</i> , <i>amelogenin</i>	PCR (conventional, nested, real-time)
HDN	<i>RHD</i> , <i>RHC</i> , <i>RHc</i> , <i>RHE</i> , <i>Kell</i> , <i>ABO</i>	PCR (conventional, nested, real-time)
Single gene disorders [‡]	<i>HD</i> , <i>FGFR3</i> , <i>DMPK</i> , <i>CFTR</i> , <i>globin</i> , <i>CYP21</i>	PCR (conventional, nested, real-time); PCR with mass spectrometry
Aneuploidy (trisomy 13, 18, 21)	SNPs <i>maspin</i> <i>PLAC4</i> RNA Chr21 locus	PCR Methylation-sensitive PCR with mass spectrometry RT-PCR with mass spectrometry; digital PCR Digital PCR
Universal fetal markers	Fetal RNA (<i>PLAC4</i> , <i>GCM1</i> , <i>ZDHHC1</i> , <i>PAPPA</i> , <i>PSG9</i> , <i>PLAC1</i> , <i>TFPI2</i> , <i>KISS1</i>) <i>RASSF1A</i> , <i>maspin</i>	RT-PCR; microarray Bisulphate conversion or methylation-sensitive PCR with mass spectrometry
Universal DNA markers*	STRs, biallelic insertion/deletion polymorphisms, SNPs <i>GAPDH</i> , <i>CCRS</i> , <i>β-globin</i> , <i>β-actin</i> <i>β-human chorionic gonadotrophin</i> , <i>albumin</i> , <i>ATL1</i>	PCR (conventional, nested, real-time) PCR (conventional, nested, real-time); Mass spectrometry

Those shown in bold are the most commonly used or most promising within each category.

[†]Y chromosome sequences have also often been used to study pregnancy-related disorders.

[‡]In order: Huntington's disease, achondroplasia, myotonic dystrophy, cystic fibrosis, β-thalassemia/Hb Lepore, congenital adrenal hyperplasia.

*Maternal (not fetal) cell-free DNA, to verify extraction process.

Figura 1.1: sommario delle applicazioni cliniche proposte per NIPD (Wright and Burton, 2009).

1.4.2.1 Determinazione del sesso fetale

A causa della relativa facilità con cui il cromosoma Y di un feto di sesso maschile può essere distinto dal DNA materno, la prima strategia e l'applicazione clinica più comune fino ad oggi è stata la determinazione del sesso del feto nei casi in cui ci sia un rischio di malattia legata al sesso, come ad esempio l'emofilia o la distrofia muscolare di Duchenne. La maggior parte degli studi pubblicati sull'uso di cfDNA per la determinazione del sesso fetale, ha utilizzato *Real-Time* PCR per rilevare geni del cromosoma Y, in particolare il gene *SRY* (*Sex*

determining Region Y). Ma sono stati indagati anche un certo numero di altri loci Y-specifici che hanno il vantaggio di essere presenti in multicopia, come *DYS*, *DYZ* e *DAZ* (Wright and Burton, 2009).

Questo metodo è potenzialmente soggetto a risultati falsi negativi, poiché i feti di sesso femminile non vengono rilevati direttamente ma dedotti da un risultato negativo per il cromosoma Y, che potrebbe anche essere causato da livelli non rilevabili di cffDNA. Numerosi studi sono stati effettuati per verificare l'accuratezza del metodo per la previsione del sesso del feto. Un'analisi recente su 23 studi selezionati, molti dei quali hanno utilizzato *Real-Time* PCR per l'analisi del gene *SRY*, ha evidenziato una sensibilità della tecnica superiore al 90% (per molti del 100%) e una specificità del 100% (Avent and Chitty, 2006). Ancor più recentemente è stata pubblicata una revisione su 57 studi selezionati che, nonostante la variabilità delle tecniche utilizzate e la diversa numerosità di campioni analizzati, riporta complessivamente una sensibilità (95,4%) e una specificità (98,6%) molto elevate (Devaney *et al.*, 2011). L'insieme di questi studi conferma che la determinazione del sesso da cffDNA non solo è possibile ed accurata, ma anche più precisa rispetto all'uso degli ultrasuoni nel primo trimestre (Avent and Chitty, 2006).

L'accuratezza di questa tecnologia inoltre è in continuo miglioramento ed i limiti della sperimentazione sono in via di definizione, rendendo la determinazione non invasiva del sesso fetale estremamente utile in ambito clinico nella gestione delle patologie *X-linked* poiché potrebbe ridurre quasi della metà il numero di diagnosi invasive richieste per ogni specifica malattia.

1.4.2.2 Disordini correlati alla gravidanza

Per disordini correlati alla gravidanza, di interesse per una diagnosi prenatale non invasiva, si intendono principalmente i problemi ematologici (donne *Rhd-negative*) e problemi clinici (gestosi, parto pre-termine).

Tra le prime applicazioni del DNA embrio-fetale libero basate sul rilevamento di sequenze fetali assenti nel genoma materno, ma non Y-specifiche, di notevole rilievo clinico è la determinazione non invasiva del genotipo *RhD* fetale in donne gravide *RhD-negative*.

L'antigene Rh è presente in oltre l'80% della popolazione caucasica (anche se questo dato varia tra i differenti gruppi etnici) (Daniels, 2005) e rappresenta la maggioranza dei casi di immunizzazione materna (Avent and Reid, 2000). Attualmente, questa risposta immunitaria

è in gran parte trattata come profilassi mediante iniezione di anticorpi anti-D, somministrata alla gestante subito dopo la nascita o durante il terzo trimestre, che si legano e neutralizzano gli antigeni fetali Rh. Prima dell'introduzione della profilassi anti-D, a causa di questa incompatibilità veniva colpito da anemia emolitica del neonato circa il 5% dei bambini nati da donne Rh negative nelle popolazioni caucasiche, mentre attualmente la cifra è più vicina al 0,5% (Pilgrim *et al.*, 2009). Tuttavia, è stato stimato che nella popolazione caucasica, circa il 40% delle donne Rh-negative sono sottoposte inutilmente alla profilassi prenatale anti-D poiché anche il feto è Rh-negativo (Van der Schoot *et al.*, 2006). Ridurre al minimo l'uso profilattico di anticorpi anti-D è auspicabile sia in termini economici che di salute della madre, in quanto rappresenta una fonte teorica di infezione dal momento che viene utilizzato sangue di donatori. Anche se la determinazione del genotipo *RhD* fetale è possibile ottenerla mediante amniocentesi o villocentesi, entrambi questi metodi hanno un rischio non solo di aborto spontaneo, ma anche di sensibilizzazione materna all'antigene Rh a causa della mescolanza tra sangue fetale e materno.

La diagnosi genetica prenatale non invasiva in questo caso offre una soluzione importante e, da quando è stata dimostrata fattibile nel 1998 (Lo *et al.*, 1998b), è stata ampiamente sviluppata e applicata. Nel 2006 è stato pubblicato uno studio con lo scopo di definire la capacità di risoluzione della genotipizzazione dell'*RhD* fetale da sangue materno (Geifman-Holzman *et al.*, 2006). L'analisi, effettuata su 44 protocolli di *screening* riportati in 37 pubblicazioni in lingua inglese, ha determinato una sensibilità dell'applicazione del 95,4% ed una specificità del 98,6%. Successivamente una serie di altri grandi studi sono stati pubblicati e riportano livelli estremamente elevati di precisione, tra cui uno studio effettuato in Belgio su 563 donne in gravidanza che ha raggiunto una precisione del 99,8% (Minon *et al.*, 2008) e uno studio effettuato nel Regno Unito su 1997 donne che riporta una precisione del 95,7% (Finning *et al.*, 2008). Mentre i risultati falsi positivi non sono considerati un problema clinicamente rilevante poiché le gestanti con tale risultato riceverebbero solamente gli anticorpi anti-D non necessari, i risultati falsi negativi sono esclusivamente attribuibili all'incapacità di rilevare la presenza di DNA libero fetale e questo può essere ovviato utilizzando un controllo interno, come ad esempio sequenze Y-specifiche in gravidanze con feto di sesso maschile. Se questi risultati fossero applicati come guida per il trattamento, solo il 2% delle donne riceverebbe anticorpi anti-D inutilmente, rispetto al 38% senza la genotipizzazione (Wright and Burton, 2009).

Un aumento della quantità di cfDNA nel plasma/siero materno è stato descritto in numerosi casi di gravidanze con complicazioni associate alla crescita e sviluppo della

placenta (Bischoff *et al.*, 2005; Hahn *et al.*, 2005; Bauer *et al.*, 2006). La prima patologia ad essere associata ad un incremento della quantità del DNA libero fetale è stata la preeclampsia (Lo *et al.*, 1999b), per la quale è stato riportato un aumento, rispetto alle gravidanze normali, da 2 a 3 volte prima dell'insorgere della preeclampsia e da 2 a 14 volte durante la preeclampsia (Hahn *et al.*, 2005). È stato inoltre dimostrato che la preeclampsia è accompagnata da un difetto nella *clearance* del cffDNA dal plasma materno, in grado di spiegare almeno in parte l'aumento del DNA nella circolazione materna (Lau *et al.*, 2002). Poiché la preeclampsia è caratterizzata da anomalie a carico della placenta (Roberts *et al.*, 2000; Roberts and Lain, 2002; Redman and Sargent, 2003) e questa rappresenta la principale fonte di cffDNA, numerosi gruppi hanno deciso di studiarne l'andamento quantitativo in altre patologie affini. In questo modo è stato dimostrato un aumento dei livelli di DNA libero fetale anche in numerosi altri disturbi della gravidanza, quali: il parto prematuro (Leung *et al.*, 1998; Farina *et al.*, 2005), i casi di placenta previa, placenta invasiva e placenta increta (Sekizawa *et al.*, 2002; Jimbo *et al.*, 2003), la morte intrauterina del feto (Zhong *et al.*, 2006), l'emorragia fetomaterna (Samura *et al.*, 2003), l'iperemesi (Sekizawa *et al.*, 2001; Sugito *et al.*, 2003) e il polidramnio (Zhong *et al.*, 2000).

La concentrazione di cffDNA nella circolazione materna potrebbe quindi rappresentare un utile marcatore per il monitoraggio della gravidanza. Ma dal momento che questa aumenta in un numeroso gruppo di patologie, non può costituire un marcatore specifico per una determinata patologia ma rimane un marcatore generico di gravidanza a rischio.

1.4.2.3 Aneuploidia

Variazioni nella concentrazione del DNA libero fetale, rispetto alle gravidanze normali, sono state riportate anche nel caso di gravidanze con feti affetti da aneuploidia cromosomica.

Nonostante siano stati pubblicati numerosi studi al riguardo, i dati sono piuttosto contrastanti. Infatti mentre vari gruppi hanno dimostrato un aumento del cffDNA in presenza di trisomia 21 e 13, ma non 18 (Lo *et al.*, 1999c; Spencer *et al.*, 2003; Wataganara *et al.*, 2003), altri gruppi non hanno rilevato nessun aumento o comunque nessuna differenza nei livelli di DNA libero fetale (Ohashi *et al.*, 2001; Hromadnikova *et al.*, 2002; Gerovassili *et*

al., 2007), attribuendo i risultati precedentemente riportati ai diversi protocolli sperimentali (Gerovassili *et al.*, 2007).

Questi studi però si basano sulla quantificazione del cffDNA attraverso il rilevamento di sequenze Y-specifiche, ma dato che i livelli di cffDNA sono molto variabili (Hahn *et al.*, 2001) e, come già dimostrato, possono risultare elevati anche in una serie di altre condizioni legate alla gravidanza, le strategie diagnostiche più di successo sono l'individuazione e la quantificazione di sequenze specifiche su cromosomi marcatori che devono necessariamente essere alterati in caso di aneuploidia. Per questo motivo diversi metodi sono stati proposti:

1. il rilevamento simultaneo di centinaia di SNPs di origine paterna sul cromosoma di interesse, utilizzando formaldeide per sopprimere il DNA libero materno nel plasma materno (Dhallan *et al.*, 2007). I risultati vengono poi confrontati con i genotipi materno e paterno e quantificati per determinare il diverso rapporto tra alleli paterni e materni in ogni sito e quindi il numero di cromosomi di interesse presenti nel feto.
2. lo sfruttamento delle differenze nel *pattern* di metilazione del DNA tra le cellule di origine placentare e le cellule di origine materna, di un gene contenente uno SNP informativo sul cromosoma di interesse (ad esempio il gene *maspin* sul cromosoma 18) al fine di amplificare in modo selettivo e rilevare quindi solo le sequenze non metilate (Tong *et al.*, 2006).
3. l'utilizzo della *digital PCR* per avere una misura della dose totale di DNA libero (cioè materno più fetale) di un tratto di uno specifico cromosoma di interesse rispetto ad un altro cromosoma di riferimento (Lo *et al.*, 2007).
4. l'utilizzo del *next generation sequencing* per sequenziare simultaneamente milioni di frammenti di DNA libero circolante e quindi confrontare la quantità di sequenze prodotte da ogni cromosoma per rilevare eventuali, anche piccolissimi, squilibri cromosomici nel feto causati da aneuploidia (Fan *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2011).

Ampi studi sono ancora necessari per determinare la sensibilità clinica e la specificità dei metodi proposti prima di considerare l'utilizzo del cffDNA per la diagnosi non invasiva di aneuploidia, tuttavia è già chiaro che il DNA libero fetale può essere utile nello *screening* delle gravidanze per stratificare il rischio (indipendentemente dall'età materna) prima di offrire la diagnosi genetica prenatale invasiva (Wright and Burton, 2009).

1.4.2.4 Malattie monogeniche

L'utilizzo del cffDNA come mezzo per la diagnosi prenatale non invasiva di malattie genetiche è ancora estremamente difficile. In primo luogo, l'individuazione di mutazioni puntiformi fetali è fortemente limitata dall'elevato *background* di DNA materno, a causa del quale è possibile rilevare solamente mutazioni ereditate di origine paterna. In secondo luogo, l'individuazione di mutazioni di grandi dimensioni (>300bp) è limitato dalla natura frammentaria del cffDNA (Norbury and Norbury, 2008).

La diagnosi prenatale di malattie autosomiche dominanti ereditate per via paterna è possibile per l'assenza dell'allele causativo di malattia nel genoma materno. Ad oggi, l'uso del cffDNA è stato utilizzato per una diagnosi prenatale non invasiva di corea di Huntington (Gonzalez-Gonzalez *et al.*, 2003), acondroplasia (Saito *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2004b, 2007) e distrofia miotonica (Amicucci *et al.*, 2000).

Sebbene sia stato dimostrato che è possibile rilevare nel plasma materno le mutazioni ereditate dal feto, la diagnosi prenatale non invasiva nelle patologie autosomiche recessive è significativamente più difficile, in quanto attualmente non esiste alcun metodo per distinguere tra alleli materni e paterni identici. Pertanto il cffDNA può essere utilizzato solo per determinare lo stato di portatore del feto in eterozigoti composti, ricercando l'allele ereditato dal padre. Questa informazione risulta comunque importante perché può essere utilizzata per ridurre il numero di diagnosi prenatali invasive non necessarie. Ad oggi, lo stato di portatore del feto è stato determinato utilizzando cffDNA in gravidanze a rischio per fibrosi cistica (Gonzalez-Gonzalez *et al.*, 2002; Nasis *et al.*, 2004), emoglobinopatie (Chiu *et al.*, 2002a; Fucharoen *et al.*, 2003; Lazaros *et al.*, 2006), sindrome adrenogenitale (Rijnders *et al.*, 2001; Chiu *et al.*, 2002b; Bartha *et al.*, 2003).

1.4.2.5 Marcatori fetali universali

Se da una parte numerosi sforzi sono stati realizzati per la messa a punto di sistemi sempre più sensibili per rilevare le più piccole differenze tra il DNA libero fetale e quello materno, al fine di consentire un utilizzo su larga scala del cffDNA per la diagnosi prenatale non invasiva, dall'altra parte numerosi sforzi sono stati fatti per identificare un marcatore universale del DNA libero fetale, che permettesse di analizzare tutte le gravidanze. Un marcatore fetale universale potrebbe infatti essere utilizzato per confermare e quantificare la

presenza di cffDNA indipendentemente dal sesso del feto e quindi essere utilizzato insieme a test diagnostici clinicamente rilevanti come controllo positivo per la presenza di cffDNA, al fine di evidenziare falsi negativi causati o da livelli di DNA circolante al di sotto del limite di *detection* del test o da problemi con il processo di estrazione del DNA.

Gli studi pubblicati riportano principalmente due aree di indagine con metodi differenti.

Una parte dei lavori si è concentrata sull'individuazione di polimorfismi, non correlati a malattia, di origine paterna siti su cromosomi autosomici. Sono stati rilevati con successo sia polimorfismi a singolo nucleotide (Li *et al.*, 2006; Dhallan *et al.*, 2007) sia corte sequenze ripetute in *tandem* (STR) (Pertl *et al.*, 2000; Page-Christiaens *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007).

Mentre la maggior parte degli studi si è concentrata sulla discriminazione tra il DNA libero fetale e quello materno sulla base delle differenze epigenetiche. Poiché uno dei fenomeni epigenetici meglio caratterizzato è la metilazione, i ricercatori hanno indagato proprio nelle differenze di metilazione tra il DNA fetale libero e il DNA materno (Chim *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2006).

La metilazione del DNA è essenziale per il normale sviluppo e questa è associata con alcuni processi chiave, tra cui l'imprinting genomico, l'inattivazione del cromosoma X, la soppressione di elementi ripetitivi e la carcinogenesi. La metilazione comporta l'aggiunta di un gruppo metile al carbonio 5 della citosina, presente sul dinucleotide CpG. Tali isole CpG, sono preferenzialmente localizzate al promotore dei geni *housekeeping* e in alcuni geni tessuto-specifici ed i diversi pattern di metilazione ne regolano l'accensione e lo spegnimento genico.

Dal momento che la placenta è la principale fonte di cffDNA, in essa sono stati cercati *patterns* di metilazione diversi. Nel 2005 è stato individuato il primo marcatore fetale universale che può essere utilizzato in tutte le gravidanze. È stato infatti dimostrato che la regione promotoriale (*SERPINB5*) del gene *maspin* è ipometilata nelle cellule placentari e ipermetilata nelle cellule ematopoietiche materne (Chim *et al.*, 2005). Altri esempi di marcatori epigenetici fetali che sono stati sviluppati sulla base del modello di metilazione specifico della placenta includono il primo esone del gene *RASSF1A* (*Ras association domain family 1A*) (Chan *et al.*, 2006) e il promotore del gene *HLCS* (*holocarboxylase synthetase*) (Tong *et al.*, 2010). Entrambi sono ipermetilati nella placenta e ipometilati nelle cellule ematopoietiche materne.

Gli approcci utilizzati per la rilevazione di questi marcatori sono principalmente due. Il primo passo è stato quello di differenziare tra DNA metilato e non metilato tramite la

modifica con bisolfito, successivamente il DNA convertito può essere amplificato con PCR metilazione-specifica o analizzato mediante sequenziamento. Tuttavia, il principale svantaggio di questa tecnica è che la modifica con bisolfito degrada più del 90% del DNA e, data la bassa concentrazione di cfDNA nel plasma materno, sono ben poche le molecole di DNA fetale convertito disponibili e quindi la precisione del test risulta fortemente ridotta. Quindi altri approcci sono stati sviluppati per *bypassare* l'uso di bisolfito (Tsui *et al.*, 2010). Il differente stato di metilazione può infatti essere rilevato anche mediante digestione con opportuno enzima di restrizione, endonucleasi in grado di riconoscere una specifica sequenza di DNA, detta sito di restrizione, e di tagliare a livello di quella sequenza o in prossimità di essa idrolizzando l'ossatura zucchero-fosfato. L'azione di alcuni di questi (ad esempio BstUI o HpaII) può essere influenzata dalla presenza di isole CpG metilate.

Ad esempio, per i marcatori ipermetilati nella placenta, come *RASSF1A* e *HLCS*, trattare il DNA circolante estratto da plasma con questi enzimi permetterebbe di rimuovere la componente materna e procedere successivamente con l'analisi della sola componente fetale. Tuttavia, la digestione può essere non sempre completa poiché dipende dalla durata della digestione, dalla qualità dell'enzima e dalla quantità di DNA circolante estratto (Tsui *et al.*, 2010).

Ulteriore lavoro è necessario per selezionare e affinare il metodo migliore per rilevare dei marcatori fetali universali utili nella diagnosi prenatale non invasiva su DNA libero fetale dal circolo materno (Wright *and* Burton, 2009). L'utilizzo di robuste tecniche per confermare la presenza del DNA libero fetale nel campione estratto in tutte le gravidanze si rivela indispensabile per poter escludere che il feto abbia ereditato la mutazione di origine paterna in tutti i casi in cui non viene identificata la mutazione. Ed è quindi auspicabile che vengano sviluppate nuove tecniche per l'identificazione di marcatori epigenetici per l'utilizzo routinario del cfDNA nella diagnosi prenatale di malattie genetiche.

2 SCOPO DELLA TESI

Il presente progetto di ricerca si propone la messa a punto di protocolli per:

- l'estrazione e la purificazione di DNA libero circolante da plasma materno in donne in gravidanza;
- la quantificazione del DNA libero totale estratto per verificare l'efficienza del protocollo di estrazione, amplificando una breve sequenza di gene *housekeeping* mediante *Real-Time qPCR*;
- la quantificazione di cffDNA estratto in gravidanze con feto di sesso maschile mediante *Real-Time qPCR* su sequenze geniche Y-specifiche (*SRY*);
- l'identificazione di sequenze geniche utili al riconoscimento di cffDNA nelle gravidanze con feto di sesso femminile mediante *mini-sequencing*;
- la verifica della presenza/assenza di mutazioni paterne in plasma materno mediante PCR allele-specifica.

3 RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI IN ESAME

Allo studio hanno partecipato 71 donne con gravidanza fisiologica compresa tra la nona e la trentacinquesima settimana di gestazione, 2 coppie con gravidanza fisiologica alla undicesima settimana gestazionale (Controllo 1 e 2) e 5 coppie con gravidanza a rischio di malattia genetica a trasmissione autosomica recessiva tra la nona e la sedicesima settimana di gestazione (Caso 1, 2, 3, 4 e 5). Ad ogni partecipante è stato richiesto di firmare il consenso informato.

Per ogni paziente sono stati prelevati 6 ml di sangue periferico in provette sterili con anticoagulante EDTA (acido etilendiamminotetraacetico) e processati entro 2 ore dal prelievo. I campioni di sangue sono stati immediatamente centrifugati per 10 minuti a 2500 rcf per separare il plasma dalla frazione cellulare; il surnatante prelevato e sottoposto ad una successiva centrifuga di 30 minuti a 16000 rcf per l'eliminazione di eventuali frammenti cellulari. Il plasma è stato aliquotato in tubi da 1,5 ml e conservato a -20°C fino al momento dell'estrazione.

4 MATERIALI E METODI

4.1 Estrazione e purificazione di DNA libero circolante da plasma

L'estrazione di DNA libero da plasma è stata messa a punto utilizzando il kit commerciale QIAamp DSP Virus Kit (Qiagen, Hilden, Germania), seguendo il protocollo approvato dal SAFE (*The Special Non-Invasive Advances in Fetal and Neonatal Evaluation Network*).

Per ogni campione è stato estratto un totale di 1,5 ml di plasma in 3 aliquote da 500µl. In ogni tubo di estrazione il DNA è stato risospeso in 50 µl di Elution Buffer (AVE) (soluzione di eluizione fornita con il kit) e al termine dell'estrazione le aliquote di DNA sono state unite in un unico tubo per un totale di 150 µl di DNA circolante estratto.

In letteratura (Birch *et al.*, 2005, Legler *et al.*, 2007) si riportano concentrazioni di DNA libero estratto non rilevabili con una semplice corsa elettroforetica su gel di agarosio. Si procede quindi con l'amplificazione standardizzata, mediante *Real-Time qPCR*, di una breve sequenza di un gene *housekeeping* che rappresenta un indicatore della quantità totale di DNA circolante estratto.

Il DNA estratto viene conservato a -20 °C.

4.2 Estrazione del DNA genomico

Il DNA genomico è stato estratto a partire da cellule nucleate di sangue periferico in EDTA, secondo il protocollo del kit commerciale *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche).

Per valutare la qualità e la quantità del DNA estratto è stata effettuata una corsa elettroforetica su gel d'agarosio allo 0,8% colorato con *SYBR-safe* (Invitrogen), un intercalante della doppia elica che rivela la presenza di acido nucleico quando esposto alla luce ultravioletta.

Il DNA estratto viene conservato a -20 °C.

4.3 *Real-Time qPCR.*

Il DNA libero, sia totale che fetale, presente nel plasma materno è stato rilevato e quantificato tramite la tecnica della *Real Time qPCR*.

Con questa tecnica si visualizzano i prodotti di amplificazione mentre vengono sintetizzati, e ciò è reso possibile grazie all'utilizzo di sonde marcate con molecole fluorescenti o di un fluoroforo intercalante la doppia elica del DNA che, una volta intercalato, emette fluorescenza se esposto a sorgente luminosa di opportuna lunghezza d'onda. L'utilizzo di molecole fluorescenti che legano il DNA è meno costoso e non sequenza-specifico, può quindi applicarsi a qualsiasi tipo di amplificato. Le molecole intercalanti però possono legare dimeri di *primers* o prodotti di amplificazione aspecifici, complicando in questo modo la messa a punto delle condizioni di reazione.

La fluorescenza viene rivelata ad ogni ciclo ed il suo aumento è proporzionale alla quantità del prodotto di PCR specifico. Durante i primi cicli di amplificazione i valori di fluorescenza rimangono pressoché costanti (*baseline*). Il diagramma di amplificazione viene esaminato nella fase logaritmica corrispondente all'aumento esponenziale di concentrazione del prodotto, un esempio di diagramma è rappresentato in figura 4.1.

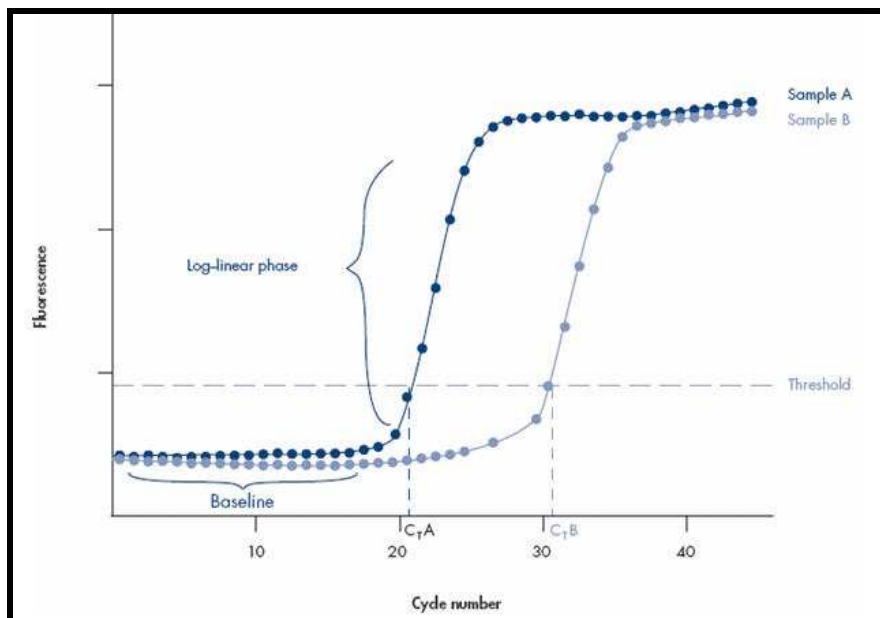


Figura 4.1: diagramma di amplificazione.

L'analisi viene eseguita attribuendo arbitrariamente un valore soglia (*threshold*) in funzione della variabilità della *baseline*. Il numero del ciclo durante il quale la fluorescenza di ciascun campione raggiunge questa soglia è detto Ct, la fase di amplificazione esponenziale inizia dal ciclo corrispondente al Ct.

Il Ct è inversamente proporzionale al numero di copie di sequenze *target* presenti all'inizio della reazione e viene quindi utilizzato per quantificare il DNA iniziale presente in ciascun campione basandosi su una curva standard generata con una quantità nota di DNA che viene amplificata nella stessa reazione di PCR, secondo l'equazione:

$$C_n = C_i \times (1 + E)^n$$

dove, C_n è il numero di copie al ciclo n , C_i è il numero di copie iniziali, n è il numero di cicli ed E è l'efficienza dell'amplificazione.

Quando l'efficienza è massima, ovvero pari a 1, l'equazione è $C_n = C_i \times 2^n$ e quindi il numero di copie di sequenze target raddoppia ad ogni ciclo.

Il *software* utilizza le curve dei campioni a concentrazione nota per calcolare l'efficienza della reazione e produce due dati importanti per la valutazione di questa: una retta di interpolazione ($y = Mx + B$) ed il valore R^2 . In condizioni ottimali, ovvero quando la reazione ha un'efficienza del 100%, R^2 ha un valore > 0.99 e M (o *slope*) vale -3.3 (*Real-Time PCR: Understanding Ct, Application Note, Applied Biosystems; [http://www3.appliedbiosystems.com/sup/gl/search/results.htm#Application Notes & Tutorials](http://www3.appliedbiosystems.com/sup/gl/search/results.htm#Application_Notes_&Tutorials)*).

4.3.1 Verifica della sensibilità della tecnica

Per verificare la sensibilità della *Real Time* qPCR sono stati amplificati campioni di DNA genomico maschile a concentrazioni note (1000, 100, 10, 1 e 0.1 copie).

Per determinare le concentrazioni da utilizzare è stato utilizzato il fattore di conversione di 6.6 pg per cellula: una copia di DNA (o genoma equivalente, *Genome Equivalent*) corrisponde, infatti, a 6.6 pg di DNA.

In secondo luogo, per verificare l'influenza del *background* di DNA materno, sono stati amplificati dei campioni di cffDNA artificiale in differenti percentuali (1%, 2%, 3%, 5% e 10%): 1 copia di DNA maschile diluita in 99, 49, 29, 19 e 9 copie di DNA femminile.

Le diluizioni sono state preparate utilizzando DNA genomico standard (Promega). I campioni sono stati caricati in triplo e la reazione è stata effettuata tre volte per verificare la ripetibilità dei risultati.

4.3.2 *Real-Time* qPCR per verificare l'efficienza del protocollo di estrazione

Per la quantificazione del DNA libero totale estratto è stato selezionato un tratto (137bp) del promotore del gene della β -actina (*ACTB*) da amplificare mediante *Real-Time* qPCR.

I *primers* utilizzati (FORWARD 5'–3': GCGCCGTTCCGAAAGTT; REVERSE 5'–3': CGGCGGATCGGCAA) sono stati ricavati dalla letteratura (Chan *et al.*, 2006), mentre le condizioni ottimali di amplificazione sono state messe a punto sperimentalmente, utilizzando DNA genomico standard (Promega), su Rotor-Gene 6000.

La reazione è stata condotta utilizzando l'enzima *Takara Ex Taq Polimerase* (Takara) secondo il protocollo riportato in Tabella 4.1 e con il profilo termico riportato in Tabella 4.2, in un volume totale di 25 μ l. Successivamente alla reazione di amplificazione è sempre stata condotta una rampa di denaturazione progressiva (analisi di *melt*) per individuare la presenza di eventuali prodotti aspecifici.

Temperatura (°C)	Tempo	N. cicli
95	3'	1
95	30''	50
65 (<i>touchdown</i> 10°C in 10 cicli)	30''	
72	30''	
72	5'	1

Tabella 4.1: profilo termico della reazione.

Mix di reazione	Quantità x 1 (µl)
H ₂ O	4.95
Buffer 5X	5
MgCl ₂ 50mM	1.5
dNTPs 10mM	0.5
pForward 10µM	0.75
pReverse 10µM	0.75
EvaGreen 20X	1.25
Taq Takara [5U/ µl]	0.3
TOTALE	15 µl + 10 µl DNA

Tabella 4.2: mix della reazione.

I campioni sono stati caricati in triplo, ottimizzando ogni reazione con una curva di calibrazione creata mediante diluizioni seriali note di DNA genomico standard (Promega) (2 ng/µl, 200 pg/µl, 20 pg/µl e 2 pg/µl). In contemporanea all'analisi dei campioni sono stati amplificati in triplice copia anche DNA genomico standard (Promega) sia femminile che maschile diluiti alla concentrazione finale di 20 pg/µl, come controlli per la retta di calibrazione.

4.3.3 ***Real-Time* qPCR per la determinazione del sesso fetale**

Per determinare il sesso fetale e per confermare la presenza di cffDNA nell'estratto, in gravidanze con feto di sesso maschile, si è scelto di analizzare un tratto (137bp) del gene *SRY*. I *primers* utilizzati (FORWARD 5'–3':TGGCGATTAAGTCAAATTCGC; REVERSE 5'–3':CCCCCTAGTACCCTGACAATGTATT) sono stati ricavati dalla letteratura (Picchiassi *et al.*, 2008), mentre le condizioni ottimali di amplificazione sono state messe a punto sperimentalmente utilizzando DNA genomico maschile standard (Promega), su Rotor-Gene 6000.

La reazione è stata condotta utilizzando l'enzima *Takara Ex Taq Polimerase* (Takara) secondo il protocollo riportato in Tabella 4.3 e con il profilo termico riportato in Tabella 4.4, in un volume totale di 25µl. Successivamente alla reazione di amplificazione è sempre stata

condotta una rampa di denaturazione progressiva (analisi di *melt*) per individuare la presenza di eventuali prodotti aspecifici.

Temperatura (°C)	Tempo	N. cicli
95	3'	1
95	10''	50
62	20''	
72	5'	1

Tabella 4.3: profilo termico della reazione.

Mix di reazione	Quantità x 1 (µl)
H ₂ O	4.95
Buffer 5X	5
MgCl ₂ 50mM	1.5
dNTPs 10mM	0.5
pForward 10µM	0.75
pReverse 10µM	0.75
EvaGreen 20X	1.25
Taq Takara [5U/ µl]	0.3
TOTALE	15 µl + 10 µl DNA

Tabella 4.4: mix della reazione.

I campioni sono stati caricati in triplicato, ottimizzando ogni reazione con una curva di calibrazione creata mediante diluizioni seriali note di DNA genomico maschile standard (Promega) (2 ng/µl, 200 pg/µl, 20 pg/µl e 2 pg/µl). In contemporanea all'analisi dei campioni sono stati amplificati in triplice copia anche DNA genomico standard (Promega) sia femminile che maschile diluiti alla concentrazione finale di 20 pg/µl, come controlli per la retta di calibrazione.

4.4 Mini-sequencing

Per verificare la presenza del cffDNA nell'estratto in caso di presenza del segnale di *ACTB* e di assenza di segnale di *SRY*, il cffDNA è stato analizzato con il kit per *mini-sequencing*, The SNaPshot™ Multiplex System (Applied Biosystems).

Questa tecnica permette di rilevare la variazione di una singola base anche a concentrazioni di template estremamente basse ed in presenza dell'elevato *background* di DNA libero materno (Bustamante-Aragones *et al.*, 2008) poiché sfrutta l'allungamento di un singolo nucleotide con dideossinucleotidi (ddNTPs) fluorescenti a partire da un *primer* non marcato che ibrida immediatamente a monte del sito di interesse (Figura 4.2).

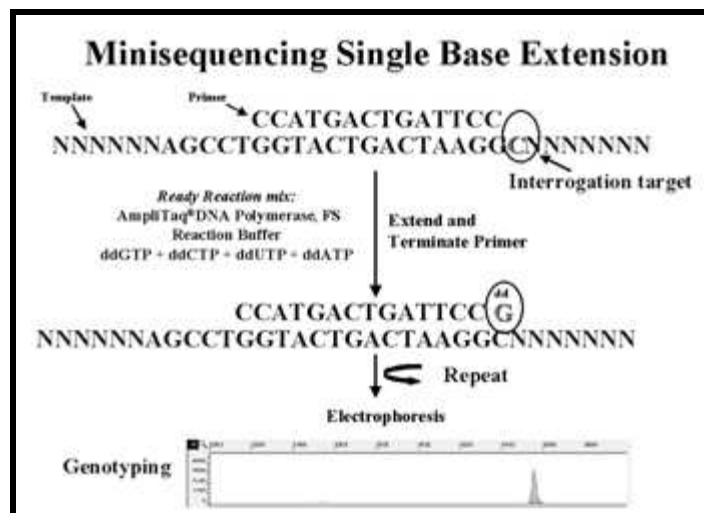


Figura 4.2: tecnica del *mini-sequencing*.

Presupponendo che l'assenza di segnale di *SRY* corrisponda alla presenza di feti di sesso femminile, sono stati selezionati 10 polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) nel cromosoma X caratterizzati da un'eterozigotità prossima al 50% (Tabella 4.5). I polimorfismi di interesse sono stati selezionati usando il sito *Computational Genetics, Rutgers University*, (<http://compgen.rutgers.edu/mapomat/map/OLD-BY-KONG/html/>), la loro posizione cromosomica è stata verificata consultando l'*UCSC Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) e l'eterozigotità confrontata con quanto riportato nel *NCBI Variation Database (dbSNP)* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>).

Nome	Posizione (build 131)		SNP	Eterozigosità dbSNP
	Base	Banda		
rs1534285	11,882,557	Xp22.2	A/G	0.490 ± 0.069
rs1894579	17,560,052	Xp22.13	C/T	0.486 ± 0.083
rs1373592	25,779,585	Xp21.3	A/G	0.476 ± 0.106
rs741935	31,764,087	Xp21.1	A/G	0.501 ± 0.021
rs925178	42,848,162	Xp11.3	A/G	0.494 ± 0.055
rs1936313	67,200,648	Xq12	C/T	0.490 ± 0.069
rs1977719	78,397,143	Xq21.1	C/T	0.498 ± 0.029
rs1372687	94,465,580	Xq21.33	A/C	0.497 ± 0.038
rs1930674	144,091,597	Xq27.3	C/G	0.492 ± 0.061
rs1981452	151,150,133	Xq28	G/T	0.476 ± 0.107

Tabella 4.5: set di SNPs nel cromosoma X selezionati per l'analisi di *mini-sequencing*.

I *primers* da PCR, fiancheggianti il polimorfismo, sono stati disegnati utilizzando il *software*, disponibile online, *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) mentre i *primers* specifici per SNaPshot sono stati disegnati utilizzando il *software*, disponibile online, *Sequence Manipulation Suite* (<http://www.bioinformatics.org/sms2/>) (Tabella 4.6).

SNP	PCR primers:	
	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
	SNaPshot primer (5'-3')	
rs1534285	AAGCCACCTAGGGGATGC TCCCAAAGGATATCAAAAGCTC	CACTGGTTATTTTCTTCTTCCCTTCT
rs1894579	CAAATTGAGACAACCTTTGAGGTG TGGATAAGAGATGCTCCAAG	CGACCTCAGTGGAACCTTGC
rs1373592	GGTGAAGAAAATAATGCTCAGAGA TCCTCATTCTCTCGCTTAAACA	CATGGGTTTTGAGTCAGCCATTTTT
rs741935	TCTGGAAATACAACCTTCAAGGATT CAATACCCAGTACTCCTTCC	ATGCCCTTAATACGTATTGCTGCA
rs925178	TGCAACTAACACCTTTGAAAGATAA TTCTCAGAGATGCTCCTCAGACT	GGAAAGCCTTCATGCTGCAATG
rs1936313	GGAGGTTTTCTTCAGCCCCTA TTCCTGAAAGAGGTGCCATT	GAGACACAGATCATAACAAGCACCA
rs1977719	AGTTGCTCTATGGGGAAAGAA TGCAGCTTATTTGGTGGAAAG	AGGAGGAAAATGAGGATACCAAG
rs1372687	TGAGGAACTTAACTAAGAAGTTGG TTTATTTTAGACACAGAGAATTTCA	CATAAATCCCTGACCCACTTACTTT
rs1930674	CTCAAGGTCTCAGCTTCAAGG TTCACTTCTAGTGTGAAGAGTCTGA	GTACAGTGAATTGACAGAATATGTTGT
rs1981452	TGGATTGGACAAAGAGGTAGAA AACTCCACGGAACCTCTGA	CCCCTCCACATCTTCAAAACCT

Tabella 4.6: primers utilizzati per l'analisi di *mini-sequencing*.

4.4.2 Verifica dell'informatività dei polimorfismi selezionati

L'eterozigotità di ogni polimorfismo è stata verificata screenando 100 campioni di DNA genomico di controllo mediante analisi di *melt* ad alta risoluzione (*High-Resolution Melting Analysis*, HRMA) su Rotor-Gene 6000.

L'HRMA è una tecnica estremamente sensibile e veloce che permette di distinguere gli ampliconi sfruttando la diversa temperatura di *melting* di ogni sequenza. Permette quindi di rilevare molteplici tipi di variazioni di sequenza del DNA come: cambiamenti di singola base, inserzioni, delezioni e duplicazioni. L'amplificazione deve avvenire in presenza di un fluoroforo intercalante la doppia elica che emette fluorescenza se esposto a fonte luminosa di opportuna lunghezza d'onda. Dopo l'amplificazione, i campioni subiscono una denaturazione progressiva da 70° a 90°C e la variazione dell'emissione di fluorescenza viene monitorata ogni 0,1°C per generare una curva di *melt* (figura 4.3). Questa diminuirà con l'aumentare della temperatura perché il fluoroforo viene rilasciato dal dsDNA (*double strand DNA*) che si

dissocia in ssDNA (*single strand DNA*). La temperatura in corrispondenza della quale si ha un repentino decremento della fluorescenza costituisce la temperatura di *melting* alla quale il 50% del DNA si trova in forma denaturata.

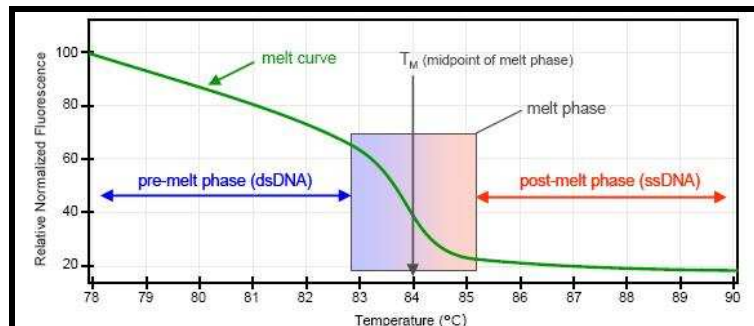


Figura 4.3: curva di *melt*.

Ad ogni prodotto di PCR corrisponde una temperatura di *melting* caratteristica, perciò tramite questo tipo di analisi è possibile distinguere i diversi genotipi. Ciò che rende questa analisi di *melting* ad alta risoluzione è l'utilizzo di fluorofori intercalanti di terza generazione, introdotti sul mercato nel 2003. Questi possono essere usati a concentrazioni saturanti consentendo una più alta fedeltà del segnale perché non c'è una ridistribuzione del fluoroforo nelle regioni non ancora denaturate durante la denaturazione, come avviene con i fluorofori di seconda generazione, ma senza inibire la reazione o modificare la temperatura di *melting*.

L'analisi di HRMA per ogni coppia di *primers* è stata messa a punto sperimentalmente utilizzando come riferimento campioni di DNA genomico a genotipo noto, poichè precedentemente sequenziati. Il protocollo di reazione e il profilo termico di amplificazione sono riportati in tabelle 4.7 e 4.8.

Temperatura (°C)	Tempo	N. cicli
95	3'	1
95	10''	40
56	20''	
72	5'	1

Tabella 4.7: profilo termico della reazione.

Mix di reazione	Quantità x 1 (µl)
H ₂ O	12.95
Buffer 5X	5
MgCl ₂ 50mM	1.5
dNTPs 10mM	0.5
pForward 10µM	0.75
pReverse 10µM	0.75
EvaGreen 20X	1.25
Taq Takara [5U/ µl]	0.3
TOTALE	23 µl + 2 µl DNA

Tabella 4.8: mix della reazione.

4.4.2 Verifica della sensibilità della tecnica

Per verificare la sensibilità della metodica di *mini-sequencing* sono stati amplificati campioni di DNA genomico maschile a concentrazioni note (1000, 100, 10, 1 e 0.1 copie).

In secondo luogo, per verificare l'influenza del *background* di DNA materno, sono stati amplificati dei campioni di cffDNA creati artificialmente mescolando DNA maschile e femminile in differenti percentuali (1%, 2%, 3%, 5% e 10%): 1 copia di DNA femminile eterozigote per il polimorfismo rs1894579 diluita in 99, 49, 29, 19 e 9 copie di DNA femminile omozigote.

Le diluizioni sono state preparate utilizzando DNA genomico di controlli. I campioni sono stati caricati in triplo e la reazione è stata condotta tre volte per verificare la ripetibilità dei risultati.

4.4.3 Reazione di *mini-sequencing*

Nella figura 4.4 sono schematizzate le fasi di preparazione del campione per l'analisi degli SNPs sui campioni di cffDNA con *ABI Prism® SNaPshot™ Multiplex Kit* (Applied Biosystems).

FASE 1:	Amplificazione (PCR)
FASE 2:	Purificazione amplificato
FASE 3:	Reazione di SNaPshot
FASE 4:	Rimozione dei ddNTPs non incorporati
FASE 5:	Elettroforesi e analisi con Genescan

Figura 4.4: fasi di preparazione del campione per l'analisi degli SNPs con SNaPshot™.

Nella fase 1 si procede con la prima amplificazione del frammento di interesse con la coppia di *primers* esterna al polimorfismo interessato. È stato quindi utilizzato lo stesso profilo termico riportato per la genotipizzazione dei campioni (tabella 4.7), mentre la mix di reazione utilizzata è stata presa dalla letteratura (Bustamante-Aragones *et al.*, 2008) ed è riportata in tabella 4.9

Mix di reazione	Quantità x 1 (μl)
Buffer 5X	5
MgCl ₂ 50mM	1.5
dNTPs 10mM	0.5
pForward 10μM	0.75
pReverse 10μM	0.75
Taq Takara [5U/ μl]	0.3
TOTALE	8.8 μl + 16.2 μl DNA estratto da plasma

Tabella 4.9: mix della reazione.

Per i controlli sono stati utilizzati 10 ng di DNA genomico.

Nella fase 2 è necessario rimuovere dal prodotto di PCR ottenuto tutti i *primers* e i dNTPs non incorporati nella reazione. I campioni sono stati quindi purificati con metodo enzimatico: 10 μl di PCR sono stati purificati con 4 μl di ExoSAP I (USB) utilizzando il profilo termico riportato in tabella 4.10

Temperatura (°C)	Tempo	N. cicli
37	15'	1
80	15'	1

Tabella 4.10: profilo termico della reazione.

Nella fase 3 si procede con la specifica reazione di allungamento di un singolo nucleotide con dideossinucleotidi fluorescenti. Quindi 8 μ l di PCR purificata prodotta dai campioni di DNA estratto da plasma e 4 μ l di PCR purificata dei controlli di DNA genomico sono stati utilizzati come template per la reazione di *mini-sequencing*, seguendo il protocollo riportato in tabella 4.11 e seguendo il profilo termico riportato in tabella 4.12.

Mix di reazione	Quantità x 1 (μ l) per prodotto dei campioni estratti da plasma	Quantità x 1 (μ l) per prodotto dei campioni estratti da genomico
<i>Multiplex Ready Reaction Mix</i>	10	5
<i>SNaPshot Primer</i> 10 μ M	2	1
TOTALE	12 μ l + 8 μ l PCR	6 μ l + 4 μ l PCR

Tabella 4.11: mix della reazione.

Temperatura (°C)	Tempo	N. cicli
96	10''	30
50	5''	
60	30''	

Tabella 4.12: profilo termico della reazione.

La fase 4 è necessaria per una ulteriore purificazione del prodotto di reazione. I dideossinucleotidi fluorescenti in eccesso sono stati rimossi con una seconda purificazione enzimatica: tutto il prodotto di reazione viene trattato con 0.6 μ l di *Antartic Phosphatase* (BioLabs) e 2.25 μ l di Buffer 10X utilizzando il profilo termico riportato in tabella 4.13.

Temperatura (°C)	Tempo	N. cicli
37	60'	1
65	5'	1

Tabella 4.13: profilo termico della reazione.

Infine, nella fase 5, i prodotti della reazione di *mini-sequencing* sono stati analizzati mediante elettroforesi capillare utilizzando il sequenziatore ABI3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) ed il *software* GeneScan (Applied Biosystems).

In ogni reazione sono stati analizzati, come controlli positivi, anche i campioni di DNA genomico dei membri della coppia e un campione risultato eterozigote per il polimorfismo.

4.5 *Nested PCR* allele-specifica

Il principio di azione della PCR allele-specifica (ASPCR) si basa sul fatto che errori d'appaiamento o *mismatches* sull'estremità 3' di un *primer* possono compromettere totalmente l'appaiamento di questo alla sequenza stampo. In questo metodo il *primer* di interesse viene dunque disegnato in modo da appaiarsi correttamente solo con l'allele di interesse dando pertanto luogo ad un prodotto d'amplificazione solo se in presenza della sequenza corrispondente. Per disegnare un primer allele-specifico bisogna quindi far sì che l'estremità 3' del primer coincida con la mutazione e che in corrispondenza della mutazione vi sia un *mismatch* non tollerato con l'allele normale. L'introduzione della ASPCR come step successivo ad una prima amplificazione, quindi come *nested* ASPCR, vuole aumentare la risoluzione della tecnica in condizioni particolari come la scarsa concentrazione di cffDNA.

4.5.1 Verifica della sensibilità della tecnica

Per verificare la sensibilità della *nested* ASPCR sono stati amplificati campioni di DNA genomico maschile a concentrazioni note (1000, 100, 10, 1 e 0.1 copie).

In secondo luogo, per verificare l'influenza del *background* di DNA materno, sono stati amplificati dei campioni di cffDNA artificiale in differenti percentuali (1%, 2%, 3%, 5% e 10%): 1 copia di DNA paterno diluita in 99, 49, 29, 19 e 9 copie di DNA materno.

Le diluizioni sono state preparate utilizzando DNA genomico dei genitori. I campioni sono stati caricati in triplo e la reazione è stata condotta tre volte per verificare la ripetibilità dei risultati.

4.5.2 ***Nested PCR allele-specifica per la mutazione $\Delta F508$ del gene *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator)***

Quattro delle 5 coppie selezionate (Casi 1, 2, 3 e 4) risultavano a rischio per fibrosi cistica ed è quindi stata messa a punto un'analisi di *nested* ASPCR per la rilevazione della mutazione paterna $\Delta F508$ del gene *CFTR* nel sangue materno.

Utilizzando il *software*, disponibile online, *Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>), sono stati disegnati tre *primers*, due *forward* ed un solo *reverse* (tabella 4.14), poiché è stato scelto di procedere inizialmente con una reazione di amplificazione standard (tabelle 4.15 e 4.16) con *primers* esterni alla delezione (FORWARD-ext/REVERSE) e successivamente con la *nested* PCR allele-specifica (tabelle 4.17 e 4.18) con *primer forward* specifico per il riconoscimento dell'allele con delezione delta F508 (FORWARD-del/ REVERSE).

<i>Primer</i>	Sequenza (5'-3')	Lunghezza del prodotto di amplificazione (bp)	
FORWARD-ext	TTCTCAGTTTTCTGGATTATGC	108	82
REVERSE	TCTTCTAGTTGGCATGCTTTGA		
FORWARD-del	GCACCATTAAAGAAAATATCATTGG		

Tabella 4.14: *primers* utilizzati per la *nested* PCR allele-specifica di $\Delta F508$.

Mix di reazione	Quantità x 1 (µl)
H ₂ O	11.2
Buffer 5X	5
MgCl ₂ 50mM	1.5
dNTPs 10mM	0.5
pForward 10µM	0.75
pReverse 10µM	0.75
Taq Takara [5U/ µl]	0.3
TOTALE	20 µl + 5 µl DNA

Tabella 4.15: mix della reazione di amplificazione standard.

Temperatura (°C)	Tempo	N. cicli
95	3'	1
95	10''	40
60	20''	
72	5'	1

Tabella 4.16: profilo termico della reazione di amplificazione standard.

Mix di reazione	Quantità x 1 (µl)
H ₂ O	14.2
Buffer 5X	5
MgCl ₂ 50mM	1.5
dNTPs 10mM	0.5
pForward 10µM	0.75
pReverse 10µM	0.75
Taq Takara [5U/ µl]	0.3
TOTALE	23 µl + 2 µl prodotto di PCR

Tabella 4.17: mix della reazione di *nested* PCR allele-specifica.

Temperatura (°C)	Tempo	N. cicli
95	3'	1
95	10''	20
63	20''	
72	5'	1

Tabella 4.18: profilo termico della reazione di *nested* PCR allele-specifica.

I prodotti di PCR sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di poliacrilammide al 12% colorato con *SYBR-safe* (Invitrogen) per la separazione e risoluzione delle bande.

Come controllo, positivo e negativo, è stato utilizzato il DNA genomico dei membri della coppia alla concentrazione di 1 ng/μl.

4.5.3 ***Nested PCR* allele-specifica per la mutazione H515Q del gene *HSD17B4* (*Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4*)**

La quinta coppia (Caso 5) risultava a rischio per Deficit dell'enzima bifunzionale ed è quindi stata messa a punto un'analisi di *nested* ASPCR per la rilevazione della mutazione paterna H515Q del gene *HSD17B4* (*Hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 4*).

Analogamente a quanto precedentemente riportato, sono stati disegnati tre *primers*, due FORWARD ed un solo REVERSE (tabella 4.19). Le condizioni ottimali sono state messe a punto sperimentalmente: una prima reazione di amplificazione standard (tabella 4.20 e 4.21) con *primers* esterni alla delezione (FORWARD-ext/REVERSE) e successivamente con una *nested* PCR allele-specifica (tabella 4.22 e 4.23) con *primer forward* specifico per il riconoscimento dell'allele con mutazione (FORWARD-515Q/REVERSE).

<i>Primer</i>	Sequenza (5'-3')	Lunghezza del prodotto di amplificazione (bp)	
FORWARD-ext	CTGCTTTGTACCGCCTCAGT	115	95
REVERSE	TCGAATAGCTAATATTTTTCATTGATAC		
FORWARD-515Q	GGAGACTGGAATCCCTTACAG		

Tabella 4.19: *primers* utilizzati per la *nested* PCR allele-specifica di H515Q.

Mix di reazione	Quantità x 1 (µl)
H ₂ O	11.2
Buffer 5X	5
MgCl ₂ 50mM	1.5
dNTPs 10mM	0.5
pForward 10µM	0.75
pReverse 10µM	0.75
Taq Takara [5U/ µl]	0.3
TOTALE	20 µl + 5 µl DNA

Tabella 4.20: mix della reazione di amplificazione standard.

Temperatura (°C)	Tempo	N. cicli
95	3'	1
95	10"	40
57	20"	
72	5'	1

Tabella 4.21: profilo termico della reazione di amplificazione standard.

Mix di reazione	Quantità x 1 (μ l)
H ₂ O	14.2
Buffer 5X	5
MgCl ₂ 50mM	1.5
dNTPs 10mM	0.5
pForward 10 μ M	0.75
pReverse 10 μ M	0.75
Taq Takara [5U/ μ l]	0.3
TOTALE	23 μ l + 2 μ l prodotto di PCR

Tabella 4.22: mix della reazione di *nested* PCR allele-specifica.

Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tempo	N. cicli
95	3'	1
95	10''	20
69	20''	
72	5'	1

Tabella 4.23: profilo termico della reazione di *nested* PCR allele-specifica.

I prodotti di PCR sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di poliacrilammide al 12% colorato con *SYBR-safe* (Invitrogen) per la separazione e risoluzione delle bande.

Come controllo, positivo e negativo, è stato utilizzato il DNA genomico dei membri della coppia alla concentrazione di 1 ng/ μ l.

5 RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1 *Real-Time qPCR.*

L'amplificazione tramite *Real Time* qPCR di sequenze specifiche dal plasma/siero di donne gravide rappresenta il metodo di elezione per lo studio del DNA libero fetale, per sensibilità, specificità e velocità di esecuzione.

Una corretta interpretazione dei dati però si può fare solo quando l'efficienza della reazione è estremamente elevata. Per valutare i risultati della *Real-Time* qPCR è stato quindi considerato un limite di tolleranza di $\pm 10\%$ rispetto al valore teorico atteso e sono state considerate valide solo reazioni con uno *slope* della curva standard compreso tra -3.1 e -3.9 e R^2 maggiore o uguale a 0.98 (van der Velden *et al.*, 2007).

5.1.1 **Verifica della sensibilità della tecnica**

La sensibilità della reazione è stata valutata impostando il *threshold* a 0.2 e considerando solamente i valori con $Ct < 40$ cicli.

La sensibilità e la capacità risolutiva della *Real-Time* qPCR sono risultate estremamente elevate, poiché è stato possibile rilevare fino ad 1 copia di DNA, come mostrato in figura 5.1, e la presenza del *background* materno non ha mostrato alcuna influenza (figura 5.2).

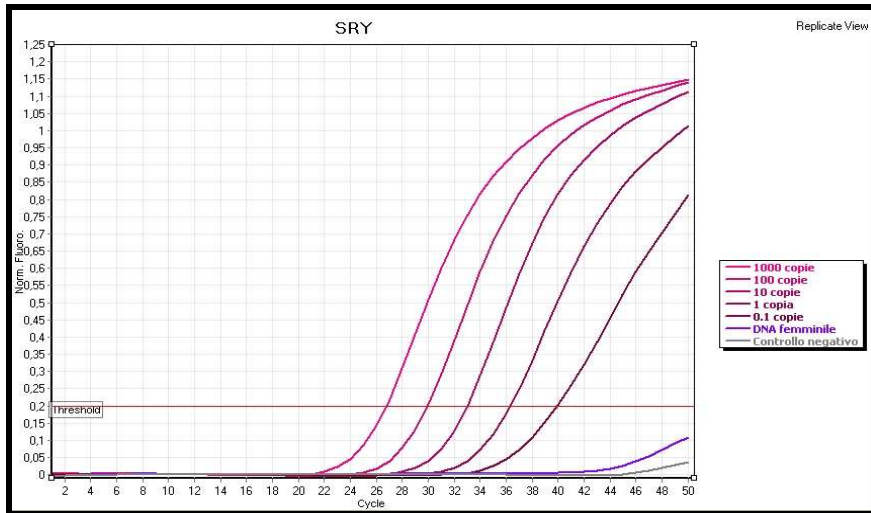


Figura 5.1: curva di sensibilità.

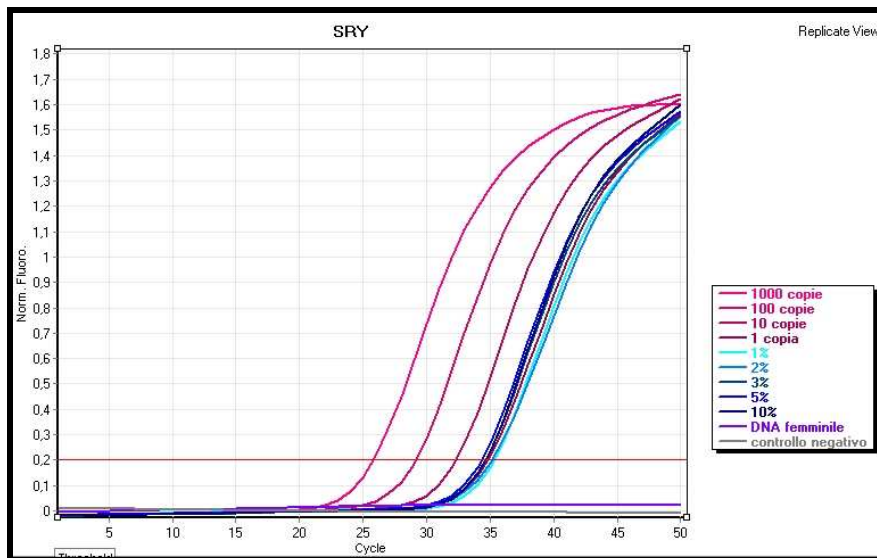


Figura 5.2: curva della capacità risolutiva.

5.1.2 Quantificazione del DNA libero totale

In figura 5.3 è riportato un esempio di curva standard prodotta dall'analisi con il *Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7* ottenuta dall'amplificazione con i *primers* del gene *ACTB*.

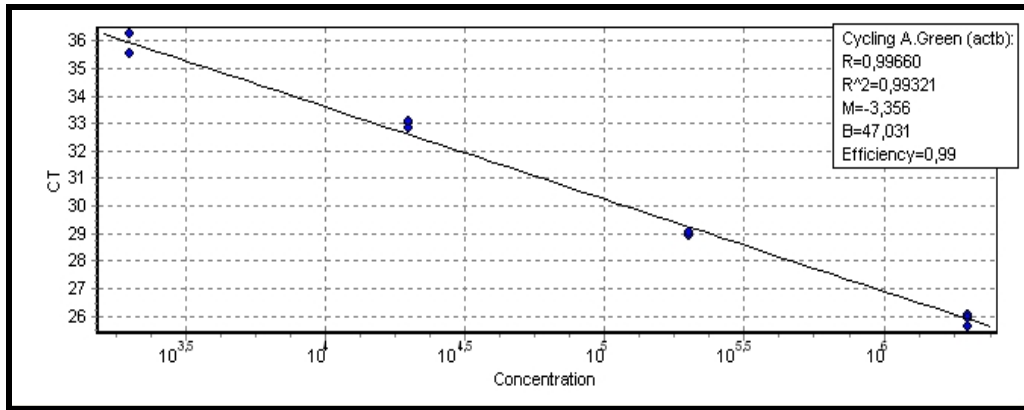


Figura 5.3: curva standard del gene *ACTB*.

In ascissa è riportato il valore delle differenti concentrazioni del DNA (nel range da 2 ng/μl a 2 pg/μl ottenuto mediante diluizioni scalari), mentre in ordinata è riportato il valore del Ct.

La retta di regressione prodotta per ogni reazione effettuata, ha rilevato valori di R^2 sempre compresi tra 0.979 e 0.994 e valori dello *slope* della retta sempre compresi tra -3.22 e -3.39, indice di un'elevata efficienza della reazione.

L'andamento quantitativo del DNA libero estratto rilevato nei 71 campioni di donne con gravidanza fisiologica, combinati per trimestre di gravidanza, è riportato in tabella 5.1.

Trimestre di gravidanza	N. di campioni	Concentrazione (<i>Genome Equivalents</i> /ml di sangue)	
		Intervallo	Media
1	12	131.35 – 1919.45	522.50
2	25	187.50 – 2333.41	592.61
3	34	163.62 – 2544.50	751.91

Tabella 5.1: concentrazione del DNA libero totale estratto da plasma.

Per il calcolo della concentrazione di DNA libero estratto, in termini di (*Genome Equivalents*/ml di sangue), è stata utilizzata la seguente formula:

$$C = Q \times (V_{\text{DNA}}/V_{\text{PCR}}) \times (1/V_{\text{EXT}}) \times (V_{\text{plasma}}/V_{\text{sangue}}) \quad (\text{Birch et al., 2005})$$

dove, C è la concentrazione di genomi equivalenti per ml di sangue, Q è la quantità target di genomi equivalenti (calcolati utilizzando il fattore di conversione di 6.6 pg per cellula) determinati mediante *Real-Time* qPCR, V_{DNA} è il volume totale di DNA ottenuto con l'estrazione (150 μ l), V_{PCR} è il volume di DNA utilizzato per l'amplificazione (10 μ l), V_{EXT} è il volume di plasma utilizzato per l'estrazione (1.5 ml), V_{plasma} è il volume di plasma preparato e V_{sangue} è il volume di sangue raccolto.

L'analisi delle concentrazioni dell'amplificato del gene *ACTB* conferma l'efficacia del protocollo di estrazione utilizzato ed evidenzia l'estrema variabilità già riportata in altri studi.

La lettura del segnale del tratto del gene *ACTB* nei campioni estratti dai membri delle 2 coppie con gravidanza fisiologica e delle 5 coppie reclutate per gravidanza a rischio di malattia genetica a trasmissione autosomica recessiva, conferma la presenza di DNA circolante (tabella 5.3).

5.1.3 Determinazione del sesso fetale e quantificazione del cffDNA

In figura 5.4 è riportato un esempio di curva standard prodotta dall'analisi con il *Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7* ottenuta dall'amplificazione con i *primers* del gene *SRY*.

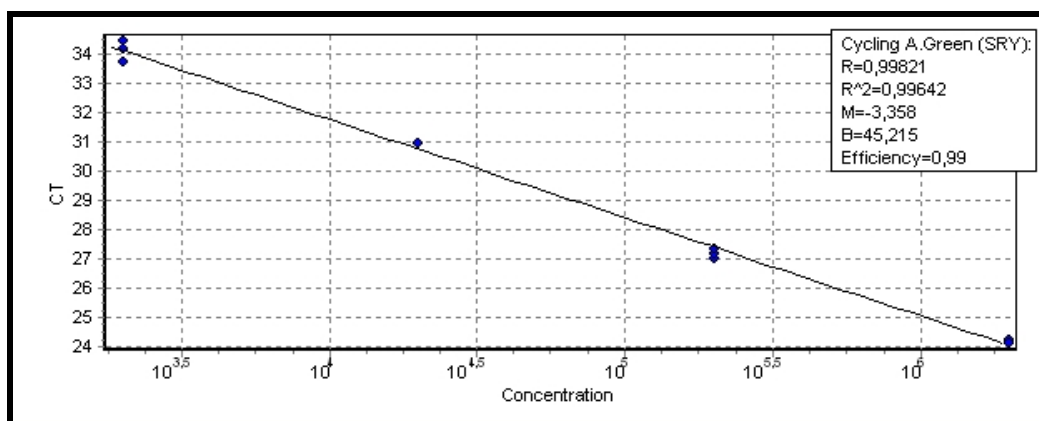


Figura 5.4: curva standard del gene *SRY*.

La retta di regressione prodotta per ogni reazione effettuata, ha prodotto valori di R^2 sempre compresi tra 0.985 e 0.997 e valori di M sempre compresi tra -3.28 e -3.36, indice di un'elevata efficienza della reazione.

Delle 71 donne con gravidanza fisiologica analizzate, il segnale del gene *SRY* è stato rilevato su 34 di esse. Il sesso fetale è stato confermato alla nascita per tutti i campioni tranne uno. In tabella 5.2 sono riassunti i dati ottenuti combinati per trimestre di gravidanza.

Trimestre di gravidanza	N. di campioni	Concentrazione (<i>Genome Equivalents</i> /ml di sangue)		Falsi negativi	Falsi positivi
		Intervallo	Media		
1	5	6.99 – 40.27	18.01	1	0
2	12	12.82 – 84.21	26.42	0	0
3	17	15.33 – 179.24	60.61	0	0

Tabella 5.2: riassunto dei risultati per il protocollo di determinazione del sesso fetale e delle concentrazioni di cffDNA rilevate nelle gravidanze con feto di sesso maschile.

I dati relativi alle concentrazioni rilevate (tabella 5.2) riflettono il fatto che la comparsa del cffDNA nella circolazione materna avviene in epoca precoce, ma con una quantità variabile da donna a donna, come dimostrato dal fatto che in un campione non è stato possibile rilevarlo, con conseguente diagnosi errata di feto femmina.

Dai risultati ottenuti si può calcolare che la sensibilità della reazione, calcolata come [veri positivi/(veri positivi + falsi negativi)], è pari all' 80% nel primo trimestre di gravidanza e al 100% nel secondo e terzo trimestre; la specificità invece, calcolata come [veri negativi/(veri negativi + falsi positivi)], si conferma molto elevata, infatti in tutti i trimestri è sempre pari al 100%.

La lettura del segnale del tratto del gene *SRY* nei campioni estratti dai membri delle 2 coppie con gravidanza fisiologica e delle 5 coppie reclutate per gravidanza a rischio di malattia genetica a trasmissione autosomica recessiva, ha confermato la presenza del cffDNA solo in una delle due coppie con gravidanza fisiologica ed in tutti e quattro i casi a rischio per fibrosi cistica (Caso 1, 2, 3 e 4) (tabella 5.3).

	Settimana gestazionale (settimane + giorni)	Concentrazione DNA libero totale (<i>Genome Equivalents/ml di sangue</i>)	Concentrazione cffDNA (<i>Genome Equivalents/ml di sangue</i>)
Controllo 1	11 + 2	414.84	/
Controllo 2	11 + 0	297.23	35.8
Caso 1	12 + 1	109.36	22.23
Caso 2	16 + 0	986.58	40.91
Caso 3	10 + 5	564.66	11.32
Caso 4	15 + 4	589.24	25.25
Caso 5	9 + 1	117.07	/

Tabella 5.3: risultati ottenuti dall'analisi del segnale dei geni *ACTB* e *SRY*.

5.2 *Mini-sequencing.*

La genotipizzazione su DNA genomico di controllo ha rilevato alcune discrepanze tra l'eterozigotità riportata sui database e quella rilevata sperimentalmente, ma comunque sufficientemente vicina al 50% da rendere ogni polimorfismo selezionato potenzialmente utile per un'analisi di *mini-sequencing* (tabella 5.4).

SNP	Eterozigotità
rs1534285 A/G	0.53
rs1894579 C/T	0.53
rs1373592 A/G	0.50
rs741935 A/G	0.38
rs925178 A/G	0.51
rs1936313 C/T	0.52
rs1977719 C/T	0,43
rs1372687 A/C	0,36
rs1930674 C/G	0,56
rs1981452 G/T	0,52

Tabella 5.4: eterozigotità rilevata sperimentalmente.

5.2.1 Verifica della sensibilità della tecnica

La sensibilità della tecnica è risultata essere estremamente elevata, essendo in grado di rilevare fino a 0.1 copie di DNA, come mostrato in figura 5.5, mentre la presenza del *background* materno si è rilevato il fattore fondamentale nel limitare la capacità risolutiva della tecnica: è stato possibile rilevare la presenza del cffDNA fino ad una percentuale del 2% (figura 5.6).

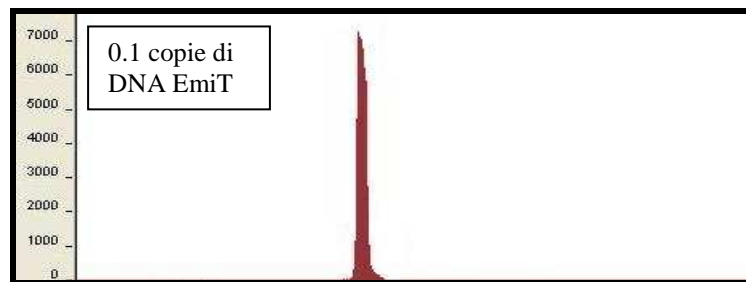


Figura 5.5: elettroferogramma di *mini-sequencing* rs1894579 di 0.1 copie di DNA maschile.

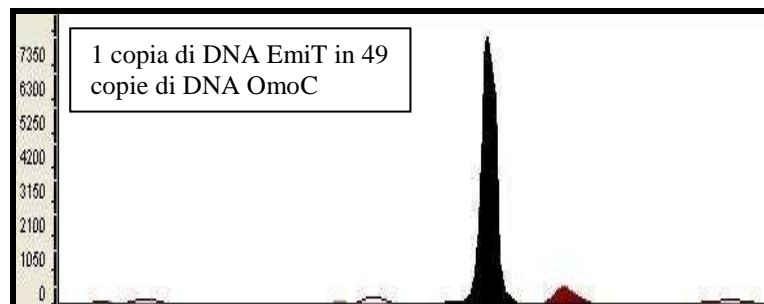


Figura 5.6: elettroferogramma di *mini-sequencing* rs1894579 del 2% di DNA fetale artificiale.

Dal momento che è stato dimostrato che il DNA libero fetale, nel primo trimestre, rappresenta mediamente il 3% del DNA libero plasmatico, è possibile considerare la capacità risolutiva della tecnica comunque soddisfacente, poiché in grado di rilevare fino ad 1 copia di DNA fetale in 49 copie di DNA materno.

5.2.2 Identificazione di sequenze geniche utili al riconoscimento di cffDNA nelle gravidanze con feto di sesso femminile

Il DNA genomico estratto da entrambi i membri delle coppie in cui non è stato possibile confermare la presenza mediante *Real-Time* qPCR sul gene *SRY* (una coppia con gravidanza fisiologica (Controllo 1) e la coppia con gravidanza a rischio per Deficit dell'enzima bifunzionale(Caso 5)), è stato utilizzato per la genotipizzazione dei campioni, mediante HRMA, e sono stati scelti per l'analisi solo i polimorfismi risultati informativi (es. padre "A" e madre "aa", o viceversa).

La genotipizzazione ha rilevato più di un polimorfismo significativo:

- controllo 1: rs741935 (madre CC e padre T), rs1894579 (madre CC e padre T);
- caso 5: rs1894579 (madre CC e padre T), rs1936313 (madre TT e padre C), rs1930674 (madre GG e padre C).

Il polimorfismo rs1894579 è risultato significativo per entrambe le coppie (figura 5.7), si è scelto quindi di procedere con un'unica reazione di *mini-sequencing*.

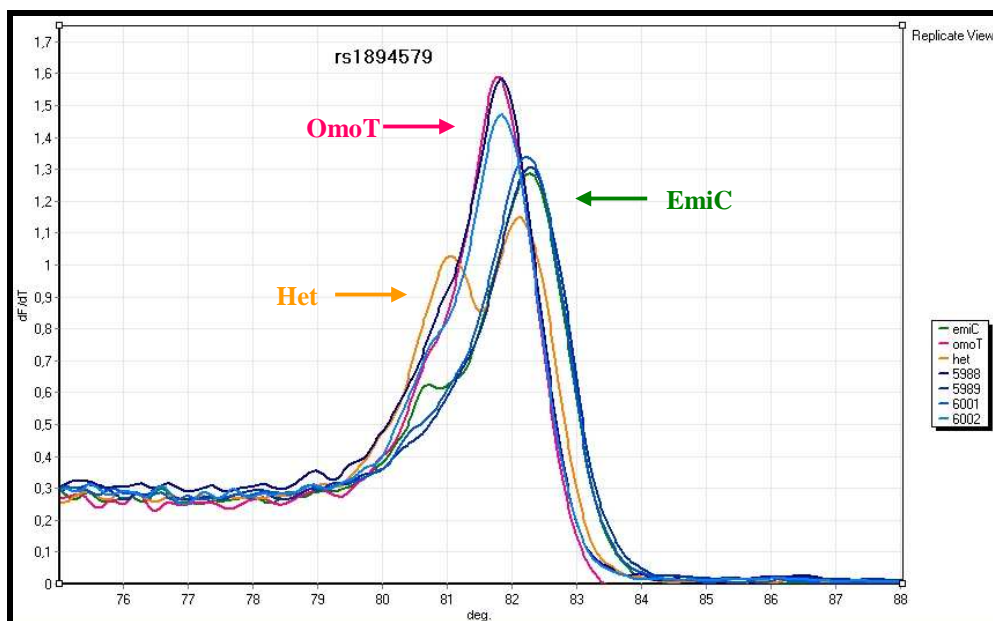


Figura 5.7: grafico della temperatura di Melt dell'analisi di HRM per la genotipizzazione di rs1894579.

L'analisi dei controlli caricati ha rivelato elettroferogrammi distinti (Figura 5.8). L'analisi sul campione di cffDNA di controllo ha rilevato la presenza dell'allele paterno

(Figura 5.9), mentre nell'elettroferogramma del caso 5 questo non era identificabile (Figura 5.10).

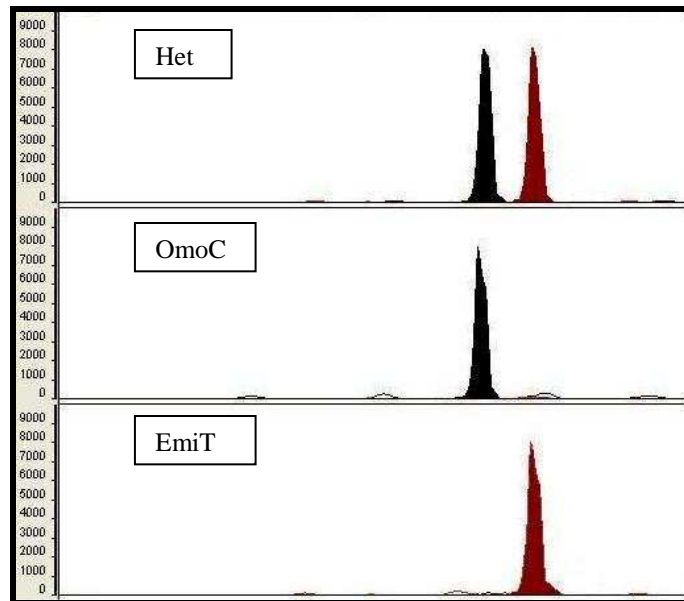


Figura 5.8: elettroferogrammi *mini-sequencing* rs1894579 dei controlli.

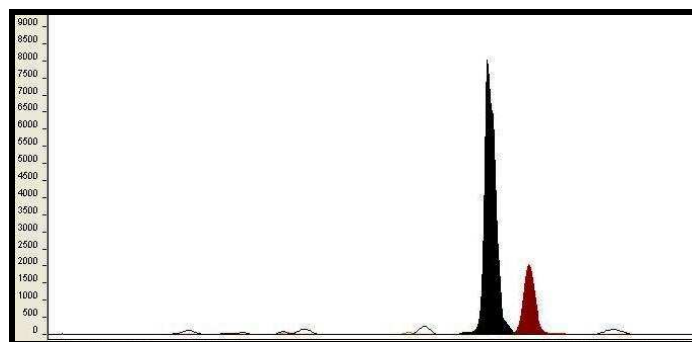


Figura 5.9: elettroferogramma *mini-sequencing* rs1894579 del cfDNA della coppia di controllo 1.

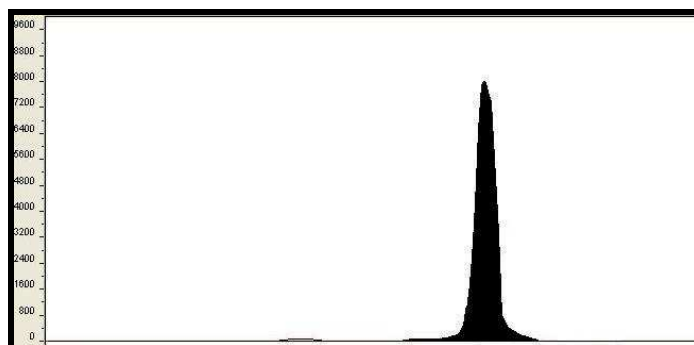


Figura 5.10: elettroferogramma *mini-sequencing* rs1894579 del caso 5.

Per il caso 5, si è proceduto quindi con l'analisi di *mini-sequencing* per un secondo polimorfismo (rs1930674), ma anche in questo caso non è stato possibile confermare la presenza di cffDNA nel campione estratto.

Nel DNA libero estratto da plasma del caso 5 è stato possibile confermare la presenza della sola componente materna (segnale di *ACTB* rilevabile), quindi verosimilmente nel campione estratto il DNA libero fetale era assente o troppo poco per essere rilevato. Si è proceduto quindi con una seconda estrazione nella quale è stato possibile confermare la presenza del cffDNA rilevando il segnale del gene *SRY* e calcolando una concentrazione di DNA libero fetale pari a 8.01 genomi equivalenti/ml di sangue.

5.3 *Nested PCR* allele-specifica

La conferma della presenza del cffDNA nell'estratto ha permesso di procedere con la reazione di *Nested* ASPCR per la ricerca della mutazione paterna nel plasma materno.

5.3.1 Verifica della sensibilità della tecnica

La sensibilità e la capacità risolutiva della *Nested* ASPCR sono risultate estremamente elevate, poiché è stato possibile rilevare fino ad 1 copia di DNA, come mostrato in figure 5.11 e 5.12, e la presenza del *background* materno non ha mostrato alcuna influenza (figure 5.13 e 5.14).

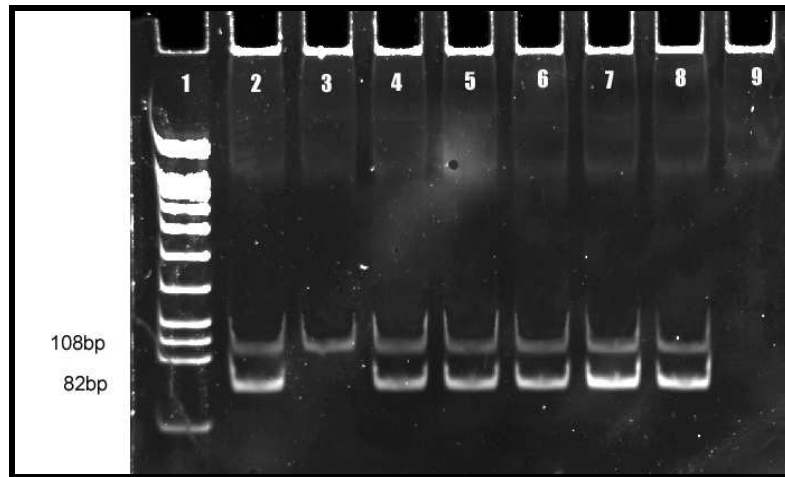


Figura 5.11: verifica della sensibilità della *Nested* ASPCR per la mutazione $\Delta F508$ di *CFTR*. I campioni sono stati così caricati: 1) marcatore di peso molecolare Marker VIII (Roche); 2) DNA genomico eterozigote per la delezione; 3) DNA genomico wt per la delezione; 4) 0.1 copie; 5) 1 copia; 6) 10 copie; 7) 100 copie; 8) 1000 copie; 9) controllo negativo di PCR.

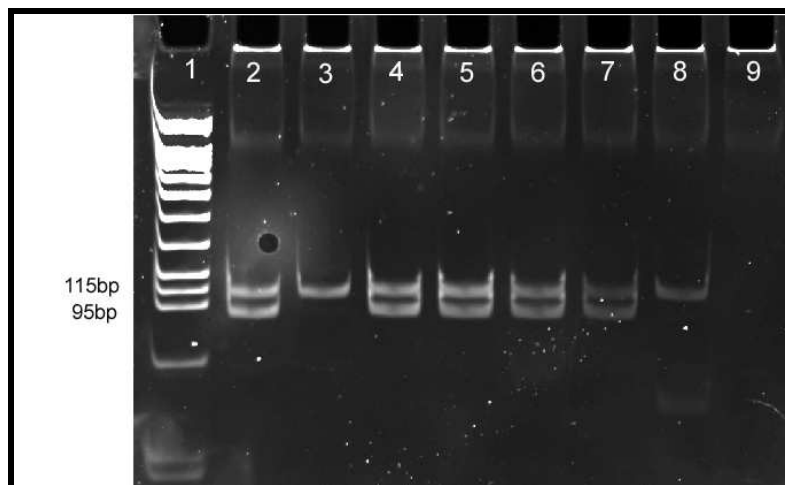


Figura 5.12: verifica della sensibilità della *Nested* ASPCR per la mutazione H515Q del gene *HSD17B4*. I campioni sono stati così caricati: 1) marcatore di peso molecolare Marker VIII (Roche); 2) DNA genomico eterozigote per la sostituzione; 3) DNA genomico wt; 4) 1000 copie; 5) 100 copie; 6) 10 copie; 7) 1 copia; 8) 0.1 copie; 9) controllo negativo di PCR.

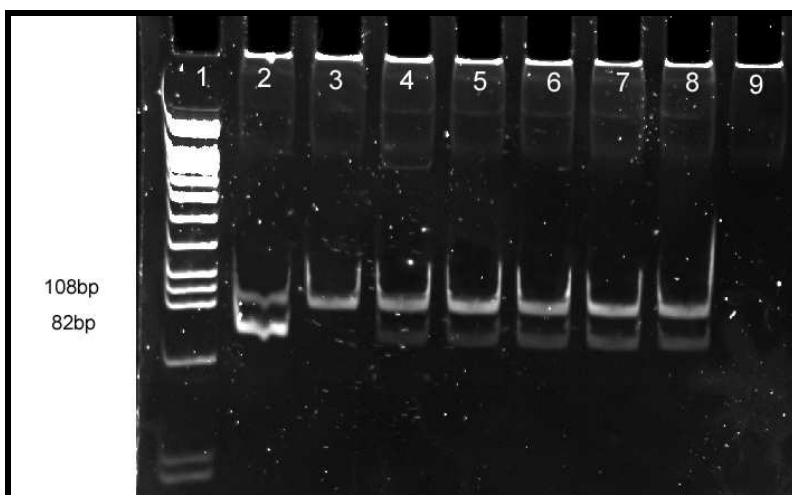


Figura 5.13: verifica della capacità risolutiva della Nested ASPCR per la mutazione $\Delta F508$ di CFTR. I campioni sono stati così caricati: 1) marcatore di peso molecolare Marker VIII (Roche); 2) DNA genomico eterozigote per la delezione; 3) DNA genomico wt per la delezione; 4) campione all'1%; 5) campione al 2%; 6) campione al 3%; 7) campione al 5%; 8) campione al 10%; 9) controllo negativo di PCR.

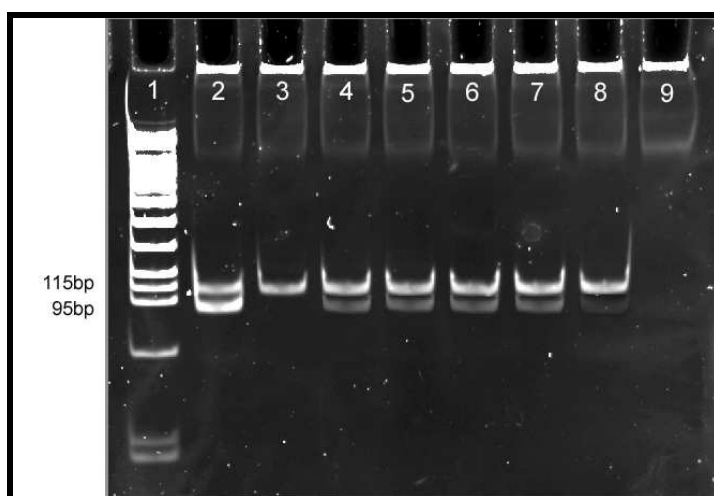


Figura 5.14: verifica della capacità risolutiva della Nested ASPCR per la mutazione H515Q del gene HSD17B4. I campioni sono stati così caricati: 1) marcatore di peso molecolare Marker VIII (Roche); 2) DNA genomico eterozigote per la mutazione; 3) DNA genomico wt per la mutazione; 4) campione al 10%; 5) campione al 5%; 6) campione al 3%; 7) campione al 2%; 8) campione all'1%; 9) controllo negativo di PCR.

5.3.2 *Nested PCR* allele-specifica per la mutazione $\Delta F508$ del gene *CFTR*

L'amplificazione mediante *nested* ASPCR per la mutazione deltaF508 è facilmente identificabile mediante il diverso pattern di bande su gel di poliacrilammide: il campione di controllo *wild-type* produce una singola banda di 108bp, mentre il campione eterozigote portatore della mutazione mostra due frammenti di 108bp e 82bp.

In figura 5.15 sono riportati i risultati dell'analisi di mutazione $\Delta F508$: i casi 2 e 4 mostrano la presenza solamente del frammento di 108bp, mentre i casi 1 e 3 mostrano la presenza anche della banda di 82bp, specifica per la mutazione $\Delta F508$. Con i campioni è stato amplificato il DNA genomico dei membri della coppia diluito ad 1 ng/ μ l, come controlli, positivo e negativo.

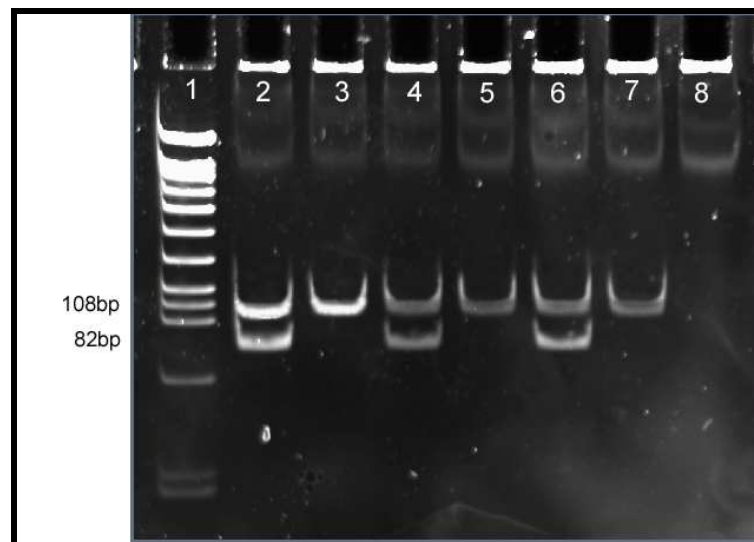


Figura 5.15: Nested ASPCR per la mutazione $\Delta F508$ di *CFTR*. I campioni sono stati così caricati: 1) marcatore di peso molecolare Marker VIII (Roche); 2) DNA genomico eterozigote per la delezione; 3) DNA genomico wt per la delezione; 4) caso 1; 5) caso 2; 6) caso 3; 7) caso 4; 8) controllo negativo di PCR.

I risultati ottenuti sono stati successivamente confermati dall'analisi molecolare su villi coriali.

5.3.3 *Nested PCR* allele-specifica per la mutazione H515Q del gene *HSD17B4*

Ugualmente a quanto descritto nel protocollo per la mutazione $\Delta F508$ del gene *CFTR*, l'amplificazione mediante *nested* ASPCR per la mutazione H515Q è facilmente identificabile mediante il diverso *pattern* di bande su gel di poliacrilammide: il campione di controllo *wild-type* produce una singola banda di 115bp, mentre il campione eterozigote portatore della mutazione mostra due frammenti di 115bp e 95bp.

In figura 5.16 sono riportati i risultati dell'analisi di mutazione H515Q: il caso 5 mostra la presenza solamente del frammento di 115bp. Con il campione è stato amplificato il DNA genomico dei membri della coppia diluito ad 1 ng/ μ l, come controlli, positivo e negativo.

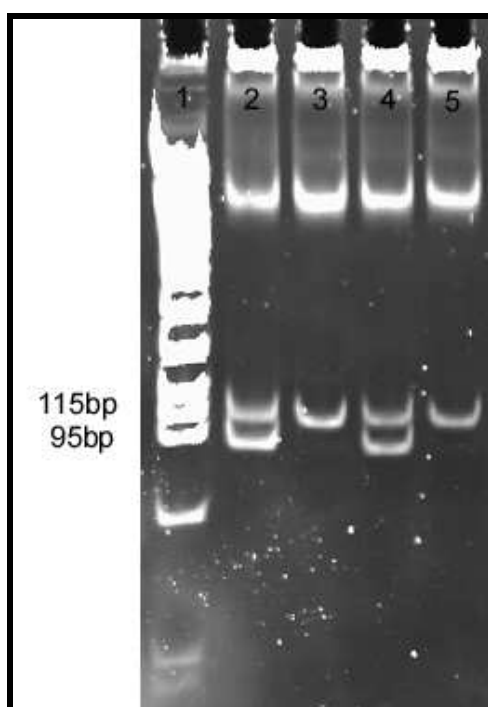


Figura 5.16: Nested ASPCR per la mutazione H515Q del gene *HSD17B4*. I campioni sono stati così caricati: 1) marcatore di peso molecolare Marker VIII (Roche); 2) DNA genomico eterozigote per la mutazione; 3) DNA genomico wt per la mutazione; 4) caso 5; 5) DNA estratto da plasma wt per la mutazione.

I risultati ottenuti sono stati successivamente confermati dall'analisi molecolare su villi coriali.

6 CONCLUSIONI

Le strategie di diagnosi genetica prenatale stanno subendo rapidi cambiamenti a causa degli avanzamenti tecnologici nel campo della biologia. Per decenni, l'analisi del cariotipo convenzionale è stato il *gold-standard* in questo tipo di diagnosi, mentre ora è stato sostituito da tecniche di biologia e citogenetica molecolare che consentono una maggior portata diagnostica. Ma questo inevitabilmente solleva interrogativi riguardo le condizioni per le quali questi test dovrebbero essere consigliati, soprattutto in considerazione del rischio di aborto legato alle procedure di prelievo del materiale fetale.

L'introduzione di un test realmente alternativo di diagnosi prenatale non invasiva che permetta la diagnosi di malattia di origine genetica e l'eliminazione del rischio di aborto legato all'amniocentesi e alla villocentesi è quindi fortemente attesa.

Nel 1997 uno studio (Lo *et al.*, 1997) ha dimostrato la presenza di DNA libero fetale nel plasma materno e ha evidenziato la sua potenzialità per una diagnosi prenatale non invasiva. Per poter sviluppare strategie diagnostiche da utilizzare in larga scala è stato inizialmente necessario stabilire da quando il DNA libero fetale è rilevabile nella circolazione materna, quanto a lungo persiste dopo il parto e soprattutto se è presente in tutte le donne gravide in quantità sufficienti da poter essere analizzato. Per questo motivo numerosi studi si sono concentrati sulla *clearance* e sull'andamento quantitativo del DNA libero fetale durante le varie epoche gestazionali.

Nei 15 anni successivi alla scoperta del cfDNA nel circolo materno molti progressi sono stati fatti e ormai la comunità scientifica è concorde nell'affermare che il DNA libero fetale comprende circa il 3-6% del DNA libero totale nel circolo sanguigno materno (Lo *et al.* 1998a), è costituito da corti frammenti di DNA (<200bp) piuttosto che interi cromosomi (Chan *et al.*, 2004), è rilevabile nella circolazione materna già a 32 giorni circa di gestazione (Illanes *et al.*, 2007) ma in quantità affidabile solo dopo le 7 settimane, la sua concentrazione aumenta con l'età gestazionale del 21% ogni settimana nel primo trimestre, con un forte picco durante le ultime 8 settimane di gravidanza (Lo *et al.*, 1998a; Birch *et al.*, 2005) e viene rapidamente rimosso dalla circolazione materna (Lo *et al.* 1999a).

Questi dati evidenziano due vantaggi fondamentali nell'utilizzo del DNA libero fetale per una diagnosi genetica prenatale non invasiva: permette l'analisi del materiale genetico

fetale senza alcun rischio fisico ed è applicabile prima di qualsiasi altra tecnica di *screening* e/o diagnosi (figura 6.1).

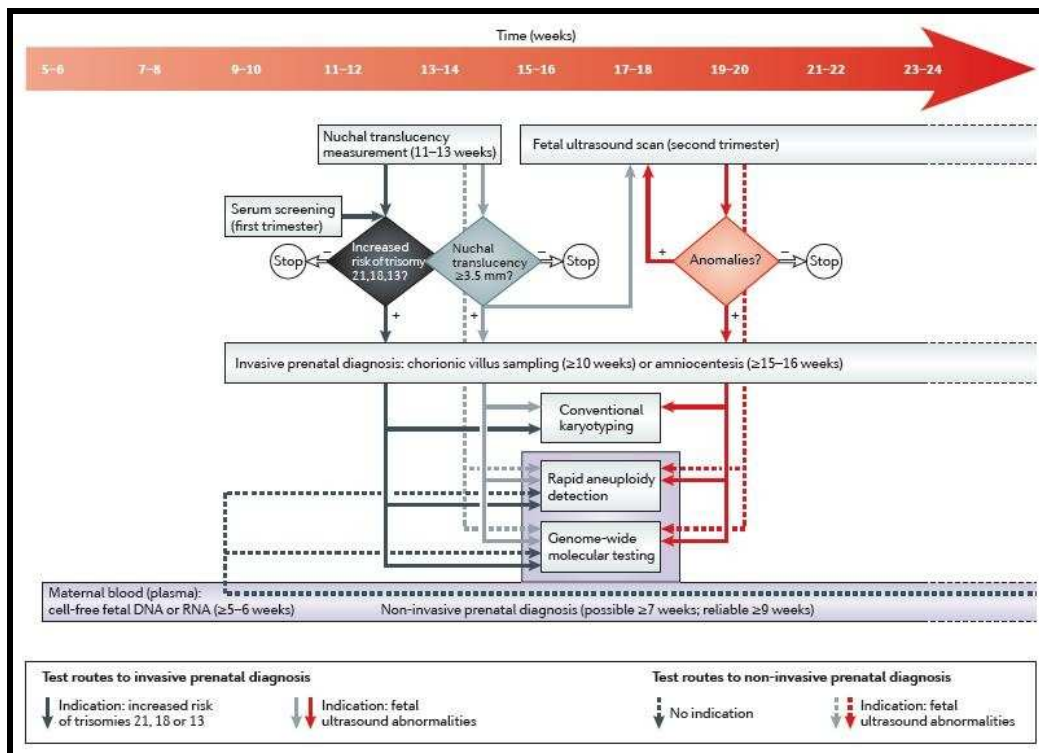


Figura 6.1: iter diagnostico dello screening prenatale (de Jong *et al.*, 2011).

L'utilizzo del DNA fetale libero come mezzo per la diagnosi prenatale non invasiva di malattie genetiche fino ad ora è fortemente limitato dall'elevato *background* di DNA materno pertanto le prime strategie messe a punto per l'identificazione del DNA libero fetale si sono basate sul rilevamento di sequenze assenti nel genoma materno, come le sequenze Y-specifiche, la determinazione del genotipo *RhD* fetale in donne *RhD*-negative e l'identificazione di sequenze fetali con mutazioni ereditate dal padre.

L'amplificazione tramite *Real Time* qPCR di sequenze unicamente fetali nel plasma/siero di donne gravide rappresenta ad oggi il metodo di elezione per lo studio del DNA libero fetale, ma numerosi sforzi sono stati realizzati per la messa a punto di sistemi sempre più sensibili ed universali per rilevare le più piccole differenze tra il DNA fetale libero e quello materno, al fine di consentire un utilizzo su larga scala del cffDNA per la diagnosi prenatale non invasiva.

Lo scopo di questa ricerca è stato quindi, in primo luogo, la messa a punto di un protocollo valido per l'estrazione e la purificazione di DNA libero fetale da plasma materno

di donne in differente epoca gestazionale. La valutazione dell'efficienza del protocollo testato ha comportato la messa a punto di opportuni protocolli di *Real-Time* qPCR per il rilevamento e la quantificazione sia del DNA libero totale estratto sia del cffDNA estratto in gravidanze con feto di sesso maschile.

La seconda fase del progetto si è occupata di testare e sviluppare un protocollo di *mini-sequencing* affidabile per l'identificazione di sequenze geniche fetali utili al riconoscimento di cffDNA nelle gravidanze con feto di sesso femminile. La possibilità di discriminare i due *pool* di DNA estratto da plasma materno ha permesso quindi il disegno di test di diagnosi prenatale non invasiva per gravidanze a rischio di malattia genetica a trasmissione autosomica recessiva, anche in presenza di feto di sesso femminile.

L'ultima fase del progetto si è concentrata quindi sulla messa a punto di un protocollo di verifica della presenza/assenza di mutazioni paterne in plasma materno mediante *nested* PCR allele-specifica.

L'analisi dei risultati ottenuti ha dimostrato elevate affidabilità, sensibilità e capacità risolutiva per ogni tecnica sviluppata, in particolare:

- i risultati ottenuti mediante *Real-Time* qPCR su i 71 campioni di sangue raccolti da donne con gravidanza fisiologica confermano la validità del metodo sia per il controllo dell'efficienza dell'estrazione di DNA libero fetale da plasma sia per la determinazione del sesso fetale: è stato rilevato un solo caso falso negativo, per cui complessivamente la sensibilità del test è risultata del 98.6% (70/71) e non è stato rilevato nessun caso falso positivo, per cui la specificità del test è risultata del 100%;
- l'utilizzo della tecnica di *mini-sequencing* per confermare la presenza del DNA libero fetale nel campione estratto in assenza del segnale del gene *SRY* si è dimostrato essere un test estremamente sensibile e veloce, ma la sua capacità risolutiva è risultata sensibile alla presenza del *background* di DNA libero materno;
- l'utilizzo di una *nested*-ASPCR per la ricerca di mutazione si è dimostrato essere un test sensibile, veloce ed economico, consentendone l'utilizzo già nel primo trimestre di gravidanza.

Analizzando in particolare i risultati ottenuti per il caso 5, appare evidente che lo sviluppo di un metodo per confermare la presenza del DNA libero fetale, anche in presenza di feto di sesso femminile, si è rilevato indispensabile.

Tuttavia per il limitato numero di coppie analizzate, questi risultati non sono da considerarsi definitivi, e la conferma sarà possibile estendendo l'analisi ad un maggior numero di coppie in gravidanza.

Ci si propone infatti, in primo luogo, il reclutamento di un numero sufficiente di coppie al primo trimestre di gravidanza fisiologica per confermare i risultati preliminari di identificazione di alleli paterni per i polimorfismi selezionati sul cromosoma X in gravidanze con feto di sesso femminile. Per poter escludere infatti lo stato di portatore della mutazione paterna nel feto, in tutti i casi in cui non viene identificata la mutazione, è necessario disporre di un test sensibile e affidabile in grado di confermare la presenza del cffDNA nell'estratto anche in presenza di feto di sesso femminile.

In secondo luogo, si vuole estendere l'analisi di portatore alle 40 mutazioni del gene *CFTR* più frequenti in Italia. In circa il 75% delle coppie a rischio di fibrosi cistica, infatti, i coniugi sono eterozigoti per differenti mutazioni in *CFTR* ed è quindi possibile analizzare lo stato di portatore del feto andando a ricercare la mutazione del padre. L'esclusione della mutazione paterna nel feto (in circa il 50% dei casi) attraverso l'analisi su plasma materno permetterebbe quindi di evitare l'utilizzo delle tecniche invasive di diagnosi prenatale (CVS o amniocentesi) e quindi evitare le possibili complicazioni legate a queste procedure ed inoltre avere questa informazione alla 9-10 settimana di gravidanza consentirebbe di ridurre l'ansia delle coppie assicurandole molto più precocemente di qualsiasi altro test diagnostico di *routine*.

7 BIBLIOGRAFIA

- Alberry MS, Maddocks DG, Hadi MA, Metani H, Hunt LP, Abdel-Fattah SA, Avent ND, Soothill PW. **Quantification of cell free fetal DNA in maternal plasma in normal pregnancies and in pregnancies with placental dysfunction.** Am J Obstet Gynecol (2009); 200: 98e1-98e6.
- Amicucci P, Gennarelli M, Novelli G, Dallapiccola B. **Prenatal diagnosis of myotonic dystrophy using fetal DNA obtained from maternal plasma.** Clin Chem. (2000); 46: 301-2.
- Ariga H, Ohto H, Busch MP, Imamura S, Watson R, Reed W, Lee TH. **Kinetics of fetal cellular and cell-free DNA in the maternal circulation during and after pregnancy: implications for noninvasive prenatal diagnosis.** Transfusion (2001); 41: 1524-30.
- Avent ND, Reid ME. **The Rh blood group system: a review.** Blood (2000); 95:375–387.
- Avent ND and Chitty LS. **Non-invasive diagnosis of fetal sex; utilisation of free fetal DNA in maternal plasma and ultrasound.** Prenat Diagn (2006); 26: 598–603.
- Bartha JL, Finning K, Soothill PW. **Fetal sex determination from maternal blood at 6 weeks of gestation when at risk for 21-hydroxylase deficiency.** Obstet Gynecol (2003);101:1135–1136.
- Bauer M, Hutterer G, Eder M, Majer S, Leshane E, Johnson KL, Peter I, Bianchi DW, Pertl B. **A prospective analysis of cell-free fetal DNA concentration in maternal plasma as an indicator for adverse pregnancy outcome.** Prenat Diagn (2006);26:831–836.
- Benachi A, Yamgnane A, Olivi M, Dumez Y, Gautier E, Costa JM. **Impact of formaldehyde on the in vitro proportion of fetal DNA in maternal plasma and serum.** Clin Chem (2005);51:242–244.

- Bianchi DW, Flint AF, Pizzimenti MF, Knoll JHM, Latt SA. **Isolation of fetal DNA from nucleated erythrocytes in maternal blood.** Proc. Natk. Acad. Sci (1990) USA. 87: 3279-3283.
- Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, De Maria M. **Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years post-partum.** Proc Natl Acad Sci USA (1996); 93: 705-708.
- Bianchi DW, Williams JM, Sullivan LM, Hanson FW, Klinger KW, Shuber AP. **PCR quantitation of fetal cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies.** Am J Hum Genet (1997) 61: 822-829.
- Bianchi DW. **Fetal cells in the maternal circulation: feasibility for prenatal diagnosis.** Br J Haematol (1999);105:574–83.
- Bianchi DW, LeShane ES, Cowan JM. **Large amounts of cell-free fetal DNA are present in amniotic fluid.** Clin Chem. (2001) 47: 1867-9.
- Bianchi DW. **Circulating Fetal DNA: Its Origin and Diagnostic Potential—A Review.** Placenta (2004); 25, Supplement A, Trophoblast Research, Vol. 18, S93–S101.
- Birch L, English CA, O’Donoghue K, Barigye O, Fisk NM, Keer JT. **Accurate and robust quantification of circulating fetal and total DNA in maternal plasma from 5 to 41 weeks of gestation.** Clin Chem (2005); 51: 312–20.
- Bischoff FZ, Lewis DE, Simpson JL. **Cell-free fetal DNA in maternal blood: kinetics, source and structure.** Human Reproduction Update (2005); Vol 11, N 1: 59-67.
- Bustamante-Aragones A, Gallego-Merlo J, Trujillo-Tiebas MJ, Rodriguez de Alba M, Gonzalez-Gonzalez C, Glover G, Diego-Alvarez D, Ayuso C, Ramos C. **New strategy for the prenatal detection/exclusion of paternal cystic fibrosis mutations in maternal plasma.** Journal of Cystic Fibrosis 7 (2008) 505–510

- Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. **Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow.** *Blood* (2001) 98: 2396-402.
- Chan LY, Leung TN, Chan KC, Tai HL, Lau TK, Wong EM, Lo YM. **Serial analysis of fetal DNA concentrations in maternal plasma in late pregnancy.** *Clin Chem* (2003); 49: 678-80.
- Chan LY, Zhang J, Hui AB, Wong N, Lau TK, Leung TN, Lo KW, Huang DW, Lo YM. **Size distributions of maternal and fetal DNA in maternal plasma.** *Clin Chem* (2004); 50: 88-92.
- Chan KC, Ding C, Gerovassili A, Yeung SW, Chiu RW, Leung TN, Lau TK, Chim SS, Chung GT, Nicolaides KH, Lo YM. **Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: A universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis.** *Clin Chem* (2006); 52: 2211-8.
- Chen EZ, Chiu RW, Sun H, Akolekar R, Chan KC, Leung TY, Jiang P, Zheng YW, Lun FM, Chan LY, Jin Y, Go AT, Lau ET, To WW, Leung WC, Tang RY, Au-Yeung SK, Lam H, Kung YY, Zhang X, van Vugt JM, Minekawa R, Tang MH, Wang J, Oudejans CB, Lau TK, Nicolaides KH, Lo YM. **Noninvasive Prenatal Diagnosis of Fetal Trisomy 18 and Trisomy 13 by Maternal Plasma DNA Sequencing.** *PLoS One*. (2011);6(7):e21791.
- Chim SS, Tong YK, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chan LY, Oudejans CB, Ding C, Lo YM. **Detection of the placental epigenetic signature of the maspin gene in maternal plasma.** *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005); 102: 14753-8.
- Chinnapapagari SKR, Holzgreve W, Lapaire O, Zimmermann B, Hahn S. **Treatment of maternal blood samples with formaldehyde does not alter the proportion of circulatory fetal nucleic acids (DNA and mRNA) in maternal plasma.** *Clin Chem* (2005);51:652–655.

- Chiu RWK, Poon LLM, Lau TK, Leung TN, Wong EMC, Lo YMD. **Effects of blood-processing protocols on fetal and total DNA quantification in maternal plasma.** Clin Chem (2001);47:1607–1613.
- Chiu RWK, Lau TK, Leung TN, Chow KCK, Chui DH, Lo YD. **Prenatal exclusion of [beta] thalassaemia major by examination of maternal plasma.** Lancet (2002a);360:998–1000.
- Chiu RWK, Lau TK, Cheung PT, Gong ZQ, Leung TN, Lo YMD. **Noninvasive prenatal exclusion of congenital adrenal hyperplasia by maternal plasma analysis: a feasibility study.** Clin Chem (2002b); 48:778–780.
- Chiu RWK and Lo YMD. **Non-invasive prenatal diagnosis by fetal nucleic acid analysis in maternal plasma: the coming of age.** Seminars in Fetal & Neonatal Medicine 16 (2011) 88e93.
- Chung GTY, Chiu RWK, Chan KCA, Lau TK, Leung TN, Lo YMD. **Lack of dramatic enrichment of fetal DNA in maternal plasma by formaldehyde treatment.** Clin Chem (2005);51:655–658.
- Daniels G. **The molecular genetics of blood group polymorphism.** Transplant Immunol (2005);14:143–153.
- de Jong A, Dondorp WJ, Frints SG, de Die-Smulders CE, de Wert GM. **Advances in prenatal screening: the ethical dimension.** Nat Rev Genet. (2011) 18;12(9):657-63.
- Devaney SA, Palomaki GE, Scott JA, Bianchi DW. **Noninvasive Fetal Sex Determination Using Cell-Free Fetal DNA. A Systematic Review and Meta-analysis.** JAMA (2011) 10; 306 (6): 627-36.
- Dhallan R, Au WC, Mattagajasingh S, Emche S, Bayliss P, Damewood M, Cronin M, Chou V, Mohr M. **Methods to increase the percentage of free fetal DNA recovered from the maternal circulation.** JAMA (2004); 291: 1114–1119.

- Dhallan R, Guo X, Emche S, Damewood M, Bayliss P, Cronin M, Barry J, Betz J, Franz K, Gold K, Vallecillo B, Varney J. **A non-invasive test for prenatal diagnosis based on fetal DNA present in maternal blood: a preliminary study.** *Lancet* (2007); 369: 474–481.
- Ding C, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chan LC, Chan AY, Charoenkwan P, Ng IS, Law HY, Ma ES, Xu X, Wanapirak C, Sanguansermisri T, Liao C, Ai MA, Chui DH, Cantor CR, Lo YM. **MS analysis of single-nucleotide differences in circulating nucleic acids: application to noninvasive prenatal diagnosis.** *Proc Natl Acad Sci USA* (2004); 101: 10762–10767.
- Fan HC, Blumenfeld YJ, Chitkara U, Hudgins L, Quake SR. **Noninvasive diagnosis of fetal aneuploidy by shotgun sequencing DNA from maternal blood.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2008) Oct 21;105(42):16266-71.
- Farina A, LeShane ES, Romero R, Gomez R, Chaiworapongsa T, Rizzo N, Bianchi DW. **High levels of fetal cell-free DNA in maternal serum: a risk factor for spontaneous preterm delivery.** *Am J Obstet Gynecol.* (2005) 193: 421-5.
- Finning KM, Martin PG, Soothill PW, Avent ND. **Prediction of fetal D status from maternal plasma: introduction of a new noninvasive fetal RHD genotyping service.** *Transfusion* (2002); 42: 1079-85.
- Finning K, Martin P, Summers J, Massey E, Poole G, Daniels G. **Effect of high throughput RHD typing of fetal DNA in maternal plasma on use of anti-RhD immunoglobulin in RhD negative pregnant women: prospective feasibility study.** *Br Med J* (2008); 336:816–818.
- Flori E, Doray B, Gautier E, Kohler M, Ernault P, Flori J, Costa JM. **Circulating cell-free fetal DNA in maternal serum appears to originate from cyto- and syncytiotrophoblastic cells. Case report.** *Hum Reprod.* (2004) 19: 723-4.

- Fucharoen G, Tungwiwat W, Ratanasiri T, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. **Prenatal diagnosis of fetal hemoglobin E gene from maternal plasma.** *Prenat Diagn* (2003);23:393–396.
- Geifman-Holzman O, Grotegut CA, Gaughan JP. **Diagnostic accuracy of noninvasive fetal Rh genotyping from maternal blood—a meta-analysis.** *Am J Obstet Gynecol* (2006);195:1163–1173.
- Gerovassili A, Garner C, Nicolaidis KH, Thein SL, Rees DC. **Free fetal DNA in maternal circulation: a potential prognostic marker for chromosomal abnormalities?** *Prenat Diagn.* (2007) 27: 104-10.
- Giacona MB, Ruben GC, Iczkowski KA, Roos TB, Porter DM, Sorenson GC. **Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls.** *Pancreas* (1998) 17: 89-97
- Goldberg JD. **Fetal cells in maternal circulation: progress in analysis of rare event.** *Am J Hum Genet* (1997); 61: 806-9.
- Gonzalez-Gonzalez C, Garcia-Hoyos M, Trujillo-Tiebas MJ, Rodriguez de Alba M, Lorda-Sanchez I, Diaz-Recasens J, Gallardo E, Ayuso C, Ramos C. **Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma.** *Prenat Diagn* (2002);22:946–948.
- Gonzalez-Gonzalez MC, Trujillo MJ, Rodriguez de Alba M, Garcia-Hoyos M, Lorda-Sanchez I, Diaz-Recasens J, Ayuso C, Ramos C. **Huntington disease-unaffected fetus diagnosed from maternal plasma using QF-PCR.** *Prenat Diagn.* (2003); 23: 232-4.
- Grati FR, Barlocco A, Grimi B, Milani S, Frascoli G, Di Meco AM, Liuti R, Trotta A, Chinetti S, Dulcetti F, Ruggeri AM, De Toffol S, Clementi M, Maggi F, Simoni G. **Chromosome abnormalities investigated by non-invasive prenatal testing account for approximately 50% of fetal unbalances associated with relevant clinical phenotypes.** *Am J Med Genet* (2010) Part A 152A:1434–1442.

- Hahn S, Zhong XY, Burk MR, Troeger C, Kang A, Holzgreve W. **Both maternal and fetal cell-free DNA in plasma fluctuate.** Ann NY Acad Sci (2001);945:141–144.
- Hahn S., Ruppertz B., Holzgreve W. **Fetal cells and cellfree fetal nucleic acids in maternal blood: new tools to study abnormal placentation?** Placenta (2005); 26: 515-26.
- Hamada H., Arinami T., Kubo T., Hamaguchi H., Iwasaki H. **Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood: frequency and relationship to gestational age.** Hum Genet (1993) 91: 427-32
- Herzenberg L.A., Bianchi D.W., Schroder J., Cann HM, Iverson GM. **Fetal cells in the blood of pregnant women: detection and enrichment by fluorescent activated cell sorting.** Proc Natl Acad Sci USA. (1979) 76: 1453-1457
- Hromadnikova I, Houbova B, Hridelova D, Voslarova S, Calda P, Nekolarova K, Kofer J, Stejskal D, Doucha J, Cinek O, Vavriec J. **Quantitative analysis of DNA levels in maternal plasma in normal and Down syndrome pregnancies.** BMC Pregnancy Childbirth (2002) 2: 4.
- Hromadnikova I, Houbova B, Hridelova D, Voslarova S, Kofer J, Komrska V, Habart D. **Replicate real-time PCR testing of DNA in maternal plasma increases the sensitivity of non-invasive fetal sex determination.** Prenat Diagn. (2003); 23(3):235-8.
- Hromadnikova I, Zejskova L, Doucha J, Codl D. **Quantification of fetal and total circulatory DNA in maternal plasma samples before and after size fractionation by agarose gel electrophoresis.** DNA Cell Biol. (2006); 25(11): 635-40.
- Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R. **DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells.** Cancer Res (2001) 61,1659–65.

- Jimbo M, Sekizawa A, Sugito Y, Matsuoka R, Ichizuka K, Saito H, Okai T. **Placenta increta: Postpartum monitoring of plasmacell-free fetal DNA.** Clin Chem. (2003); 49: 1540-1.
- Kølvraa S, Christensen B, Lykke-Hansen L, Philip J. **The fetal erythroblast is not the optimal target for non-invasive prenatal diagnosis: preliminary results.** J Histochem Cytochem (2005); 53: 331-6.
- Illanes S, Denbow M, Kailasam C, Finning K, Soothill PW. **Early detection of cell-free fetal DNA in maternal plasma.** Early Human Development (2007) 83, 563–566.
- Lau TW, Leung TN, Chan LY, Lau TK, Chan KC, Tam WH, Lo YM. **Fetal DNA clearance from maternal plasma is impaired in preeclampsia.** Clin Chem. (2002) 48: 2141-6.
- Lazaros L, Hatzi E, Bouba I, Paraskevaidis E, Georgiou I. **Non-invasive prenatal detection of paternal origin Hb Lepore in a male fetus at the 7th week of gestation.** Fetal Diagn Ther (2006);21:506–509.
- Legler TJ, Liu Z, Mavrou A, Finning K, Hromadnikova I, Galbiati S, Meaney C, Hulten M, Crea F, Olsson ML, Maddocks DG, Huang D, Fisher SA, Sprenger-Haussels M, Soussan AA, van der Schoot E. **Workshop report on the extraction of foetal DNA from maternal plasma.** Prenat Diagn (2007);27:824–829.
- Leon SA, Ehrlich GE, Shapiro B, Labbate VA. **Free DNA in the serum of rheumatoid arthritis patients.** J Rheumatol. (1977a) 4:139-43.
- Leon S.A., Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. **Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy.** Cancer Res. (1977b) 37: 646-50
- Leung TN, Zhang J, Lau TK, Hjelm NM, Lo YM. **Maternal plasma fetal DNA as a marker for preterm labour.** The Lancet (1998) 354: 780.

- Li Y, Zimmermann B, Rusterholz C, Kang A, Holzgreve W and Hahn S. **Size separation of circulatory DNA in maternal plasma permits ready detection of fetal DNA polymorphisms.** Clin Chem. (2004a); 50: 1002–11.
- Li Y, Holzgreve W, Page-Christiaens GC, Gille JJ, Hahn S. **Improved prenatal detection of a fetal point mutation for achondroplasia by the use of size-fractionated circulatory DNA in maternal plasma. Case report.** Prenat Diagn. (2004b); 24: 896-8.
- Li Y, Wenzel F, Holzgreve W, Hahn S. **Genotyping fetal paternally inherited SNPs by MALDI-TOF MS using cell-free fetal DNA in maternal plasma: influence of size fractionation.** Electrophoresis (2006); 27: 3889–3896.
- Li Y, Paget-Christiaens LGC, Gille JJP, Holzgreve W. **Non-invasive prenatal detection of achondroplasia in size-fractionated cell-free DNA by MALDI-TOF MS assay.** Prenat Diagn (2007);27:11–17.
- Little M.T., Langlois S., Wilson R.D., Lansdorp P.M. **Frequency of fetal cells in sorted subpopulation nucleated erythroid and CD34+ hematopoietic progenitor cells from maternal peripheral blood.** Blood (1997) 89: 2347-58
- Liu FM, Wang XY, Feng X, Wang W, Ye YX, Chen H. **Feasibility study of using fetal DNA in maternal plasma for non-invasive prenatal diagnosis.** Acta Obstet Gyn Scand (2007);86:535–541.
- Lo YMD, Corbetta N, Chamberlain PF, Rain V, Sargent IL, Redman CWG and Wainscoat JS. **Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum.** The Lancet (1997); 350: 485-87.
- Lo YMD, Tein MSC, Lau TK, Haines CJ, Leung TN, Poon PMK, Wainscoat JS, Johnson PJ, Chang AM, Hjelm NM. **Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for non-invasive prenatal diagnosis.** Am J Hum Genet (1998a); 62: 768-75.

- Lo YMD, Hjelm NM, Fidler C, Sargent IL, Murphy MF, Chamberlain PF, Poon PMK, Redman CWG, Wainscoat JS. **Prenatal diagnosis of fetal RhD status by molecular analysis of maternal plasma.** *N Engl J Med* (1998b);339:1734–1738.
- Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AMZ, Hjelm NM. **Rapid Clearance of Fetal DNA from Maternal Plasma.** *Am. J. Hum. Genet.* (1999a); 64:218–224.
- Lo YMD, Leung TN, Tein MSC, Sargent IL, Zhang J, Lau TK, Haines CJ, Redman CWG. **Quantitative abnormalities of fetal DNA in maternal serum in preeclampsia.** *Clin Chem* (1999b);45:184–188.
- Lo YMD, Lau TK, Zhang J, Leung TN, Chang AMZ, Hjelm NM, Elmes RS, Bianchi DW. **Increased fetal DNA concentrations in the plasma of pregnant women carrying fetuses with trisomy 21.** *Clin Chem* (1999c); 45:1747–1751.
- Lo YMD, Lun FMF, Chan KCA, Tsui NBY, Chong KC, Lau TK, Leung TY, Zee BCY, Cantor CR, Chiu RWK. **From the cover: digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy.** *Proc Natl Acad Sci USA* (2007);104:13116–13121.
- Minon JM, Gerard C, Senterre JM, Schaaps JP, Foidart JM. **Routine fetal RHD genotyping with maternal plasma: a four-year experience in Belgium.** *Transfusion* (2008);48:373–381.
- Nasis O, Thompson S, Hong T, Sherwood M, Radcliffe S, Jackson L, Otevrel T. **Improvement in sensitivity of allele-specific PCR facilitates reliable noninvasive prenatal detection of cystic fibrosis.** *Clin Chem* (2004);50: 694–701.
- Ng EK, Tsui NB, Lau TK, Leung TN, Chiu RW, Panesar NS, Lit LC, Chan KW, Lo YM. **mRNA of placental origin is readily detectable in maternal plasma.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2003) Apr 15;100(8):4748-53.
- Norbury G, Norbury CJ. **Non-invasive prenatal diagnosis of single gene disorders: how close are we.** *Sem Fetal Neonat Med* (2008);13:76–83.

- O'Donoghue K, Choolani M, Chan J, de la Fuente J, Kumar S, Campagnoli C, Bennett PR, Roberts IA, Fisk NM. **Identification of fetal mesenchymal stem cells in maternal blood: implications for non-invasive prenatal diagnosis.** *Mol Hum Reprod* 2003 9: 497-502.
- Ohashi Y, Miharu N, Honda H, Samura O, Ohama K. **Quantitation of fetal DNA in maternal serum in normal and aneuploid pregnancies.** *Hum Genet* (2001) 108: 123-7.
- Page-Christiaens LGC, Bossers B, van der Schoot CE, de Haas M. **Use of bi-allelic insertion/deletion polymorphisms as a positive control for fetal genotyping in maternal blood: first clinical experience.** *Ann NY Acad Sci* (2006);1075:123–129.
- Pertl B, Sekizawa A, Samura O, Orescovic I, Rahaim PT, Bianchi DW. **Detection of male and female fetal DNA in maternal plasma by multiplex fluorescent polymerase chain reaction amplification of short tandem repeats.** *Hum Genet* (2000);106:45–49.
- Picchiassi E, Coata G, Fanetti A, Centra M, Pennacchi L, Di Renzo GC. **The best approach for early prediction of fetal gender by using free fetal DNA from maternal plasma.** *Prenat Diagn.* (2008); 28:525-530.
- Pilgrim H, Lloyd-Jones M, Rees A. **Routine antenatal anti-D prophylaxis for RhD-negative women: a systematic review and economic evaluation.** *Health Technol Assess.* (2009) Feb;13(10):iii, ix-xi, 1-103.
- Poon LLM, Leung TN, Lau TK, Lo YMD. **Presence of fetal RNA in maternal plasma.** *Cin Chem* (2000); 46: 1832-1834.
- Redman CW, Sargent IL. **Pre-eclampsia, the placenta and the maternal systemic inflammatory response--a review.** *Placenta.* (2003) 24 Suppl A: S21-7.

- Rijnders RJP, van der Schoot CE, Bossers B, de Vroede MAMJ, Christiaens GCML. **Fetal sex determination from maternal plasma in pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia.** *Obstet Gynecol* (2001);98:374–378.
- Roberts L, Sebire NJ, Fowler D, Nicolaides KH. **Histomorphological features of chorionic villi at 10-14 weeks of gestation in trisomic and chromosomally normal pregnancies.** *Placenta.* (2000) 21: 678-83.
- Roberts JM, Lain KY. **Recent Insights into the pathogenesis of pre-eclampsia.** *Placenta.* (2002) 23: 359-72.
- Saito H, Sekizawa A, Morimoto T, Suzuki M, Yanaihara T. **Prenatal DNA diagnosis of a single-gene disorder from maternal plasma.** *Lancet* (2000); 356: 1170.
- Samura O, Miharu N, Hyodo M, Honda H, Ohashi Y, Honda N, Hara T, Ohama K. **Cell-free fetal DNA in maternal circulation after amniocentesis.** *Clin Chem.* (2003) 49: 1193-5.
- Sargent, I.L., Johansen, M., Chau, S. & Redma, C.W.G. **Clinical experience: isolating trophoblasts from maternal blood.** *Annals of the New York Academy of Sciences* (1994) 731: 154–61.
- Sekizawa A, Sugito Y, Iwasaki M, Watanabe A, Jimbo M, Hoshi S, Saito H, Okai T. **Cell-free fetal DNA is increased in plasma of women with hyperemesis gravidarum.** *Clin Chem.* (2001) 47: 2164-5.
- Sekizawa A, Jimbo M, Saito H, Iwasaki M, Sugito Y, Yukimoto Y, Otsuka J, Okai T. **Increased cell-free fetal DNA in plasma of two women with invasive placenta.** *Clin Chem.* (2002) 48: 353-4.
- Slunga-Tallberg A., El-Rifai W., Keinanen M., Ylinen K., Kurki T., Kinger K., Ylikorkala O., Knuutila S. **Maternal origin of nucleated erythrocytes in peripheral venous blood of pregnant women.** *Hum Genet* (1995) 96: 53-57.

- Sohda S., Arinami T., Hamada H., Nakauchi H., Kubo T. **The proportion of fetal nucleated red blood cells in maternal blood: estimation by FACS analysis.** *Prenat Diagn* (1997) 8: 743-752.
- Spencer K, de Kok JB, Swinkels DW. **Increased total cell-free DNA in the serum of pregnant women carrying a fetus affected by trisomy 21.** *Prenat Diagn* (2003);23:580–583.
- Sugito Y, Sekizawa A, Farina A, Yukimoto Y, Saito H, Iwasaki M, Rizzo N, Okai T. **Relationship between severity of hyperemesis gravidarum and fetal DNA concentration in maternal plasma.** *Clin Chem.* (2003) 49: 1667-9.
- Tan E.M., Schur PH, Carr RI, Kunkel HG. **Deoxyribonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus.** *J. Clin. Invest* (1966) 45: 1732-40.
- Tjoa ML, Cindrova-Davies T, Spasic-Boskovic O, Bianchi DW, Burton GJ. **Trophoblastic oxidative stress and the release of cell-free feto-placental DNA.** *Am J Pathol* (2006); 169: 400-4.
- Tong YK, Ding C, Chiu RWK, Gerovassili A, Chim SSC, Leung TY, Leung TN, Lau TK, Nicolaidis KH, Lo YMD. **Noninvasive prenatal detection of fetal trisomy 18 by epigenetic allelic ratio analysis in maternal plasma: theoretical and empirical considerations.** *Clin Chem* (2006);52: 2194–2202.
- Tong YK, Chiu RW, Akolekar R, Leung TY, Lau TK, Nicolaidis KH, Lo YM. **Epigenetic-genetic chromosome dosage approach for fetal trisomy 21 detection using an autosomal genetic reference marker.** *PLoS One.* 2010 Dec 20;5(12):e15244.
- Traeger-Synodinos J. **Real-time PCR for prenatal and preimplantation genetic diagnosis of monogenic diseases.** *Mol Aspects Med* (2006);27: 176–191.

- Tsui DW, Chiu RW, Lo YD. **Epigenetic approaches for the detection of fetal DNA in maternal plasma.** *Chimerism.* (2010);1(1):30-35.
- van der Schoot CE, Soussan AA, Koelewijn J, Bonsel G, Paget-Christiaens LGC, de Haas M. **Non-invasive antenatal RHD typing.** *Transfus Clin Biol* (2006);13:53–57.
- van der Velden VH, Cazzaniga G, Schrauder A, Hancock J, Bader P, Panzer-Grumayer ER, Flohr T, Sutton R, Cave H, Madsen HO, Cayuela JM, Trka J, Eckert C, Foroni L, Zur Stadt U, Beldjord K, Raff T, van der Schoot CE, van Dongen JJ; European Study Group on MRD detection in ALL (ESG-MRD-ALL). **Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data.** *Leukemia* (2007) Apr;21(4):604-11.
- Von Eggeling F., Michel S., Günther M., Schimmel B., Claussen U. **Determination of the origin of nucleated cells in maternal circulation by means of random PCR and a set of length polymorphisms.** *Hum Genet* (1997) 99: 266-70.
- Wataganara T, LeShane ES, Farina A, Messerlian GM, Lee T, Canick JA, Bianchi DW. **Maternal serum cell-free fetal DNA levels are increased in cases of trisomy 13 but not trisomy 18.** *Hum Genet* (2003); 112:204–208.
- Wright CF and Burton H. **The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis.** *Human Reproduction Update* (2009); 15, 1: 139-151.
- Zhong XY, Holzgreve W, Li JC, Aydinli K, Hahn S. **High levels of fetal erythroblasts and fetal extracellular DNA in the peripheral blood of a pregnant woman with idiopathic polyhydramnios: case report.** *Prenat Diagn.* (2000) 20: 838-41.
- Zhong XY, Holzgreve W, Hahn S. **Cell-free fetal DNA in the maternal circulation does not stem from the transplacental passage of fetal erythroblasts.** *Molecular Human Reproduction* (2002); Vol 8, N 9: 864-870.

Zhong XY, Steinborn A, Sohn C, Holzgreve W, Hahn S. **High levels of circulatory erythroblasts and cell-free DNA prior to intrauterine fetal death.** *Prenat Diagn.* (2006) 26: 1272-3.



XIV Congresso Nazionale SIGU, Milano • 13-16 Novembre 2011

DIAGNOSI PRENATALE DI FIBROSI CISTICA UTILIZZANDO DNA LIBERO FETALE IN PLASMA MATERNO

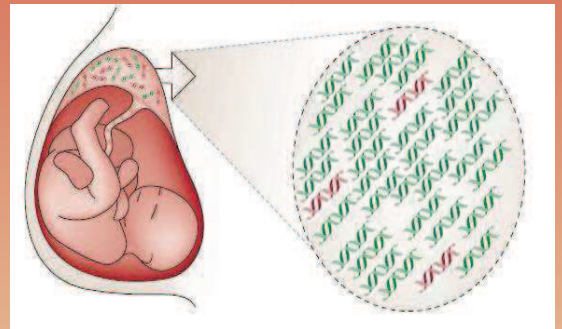
Bruson A., Forzan M., Rigon C., Casarin A., Salviati L., Clementi M.
 Servizio di Genetica Clinica, Padova, Italy

INTRODUZIONE

La fibrosi cistica, causata da mutazioni nel gene CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), è la malattia genetica autosomica recessiva più frequente nella popolazione caucasica. In Europa ne è affetto un neonato ogni 2500-2700 nati vivi [1] e la frequenza di portatori eterozigoti è mediamente di 1 su 25 [2]. Ad oggi sono state identificate più di 1600 mutazioni del gene CFTR [1]. La mutazione più diffusa è la delezione dell'aminoacido fenilalanina al codone 508 ($\Delta F508$), la cui frequenza varia notevolmente nelle diverse popolazioni: rappresenta il 50% delle mutazioni nell'Europa meridionale (Italia, Spagna, Grecia) e l'80-90% circa nelle popolazioni del Nord-Europa (Danimarca, Olanda, Regno Unito) [3]. Nelle coppie in cui entrambi i genitori sono portatori di una mutazione in CFTR, la diagnosi prenatale è raccomandata. Al momento attuale la diagnostica prenatale di routine richiede il prelievo di cellule fetali ottenibili con metodiche invasive, la villocentesi e l'amniocentesi. Queste tecniche comportano un rischio di provocare un aborto compreso fra 0.5% e 1% [4].

Nel 1997 uno studio [5] ha dimostrato la presenza di DNA libero fetale (cffDNA) nel plasma materno e ha evidenziato la sua potenzialità per una diagnosi prenatale non invasiva (NIPD). Il cffDNA ha un'origine placentare, dovuta all'apoptosi dei sinciziotrofoblasti costantemente rimpiazzati sulla superficie della placenta [6] e comprende circa il 3-6% del DNA libero totale nella circolazione materna. L'elevato background di DNA libero materno, la quantità estremamente variabile nella popolazione e la bassa concentrazione (tra 0.8 e 562.5 GE/mL di sangue) limitano ancora fortemente l'utilizzo del cffDNA come mezzo per la NIPD di malattie genetiche [4]. Numerosi sforzi sono stati realizzati per la messa a punto di sistemi sempre più sensibili ed universali per rilevare le più piccole differenze tra il DNA libero fetale e quello materno, al fine di consentire un utilizzo su larga scala del cffDNA per la diagnosi prenatale non invasiva.

Le potenziali applicazioni di questa diagnosi sono: l'analisi in famiglie ad alto rischio di malattie monogeniche ereditarie, compresa la determinazione del sesso nei casi a rischio di malattie X-linked e l'individuazione di sequenze ereditate di origine paterna, lo screening routinario prenatale per diagnosi dello stato del fattore Rh e la diagnosi di aneuploidia.



MATERIALI E METODI

Sono stati raccolti, dopo consenso informato, i prelievi di sangue periferico in EDTA di 3 coppie con gravidanza a rischio di Fibrosi Cistica. I campioni di sangue sono stati processati immediatamente per separare il plasma dalla frazione cellulare. L'estrazione di DNA libero da plasma è stata eseguita con QIAamp DSP Virus Kit (Qiagen), seguendo il protocollo descritto dal SAFE (The Special Non-Invasive Advances in Fetal and Neonatal Evaluation) Network.

L'analisi è stata condotta utilizzando Real-Time qPCR per monitorare l'efficienza del protocollo di estrazione e per rilevare la presenza del DNA fetale. Si è scelto di amplificare un tratto del promotore del gene della β -actina (ACTB) per quantificare il DNA libero estratto (Figura 1) ed una regione Y-specifica nel gene SRY per verificare la presenza del cffDNA (Figura 2). I primers sono stati ricavati dalla letteratura (Chan et al. 2006 [7] and Pichiassi et al. 2008 [8], rispettivamente), mentre le condizioni ottimali di amplificazione sono state messe a punto sperimentalmente su Rotor-Gene 6000. Per accertare la presenza/assenza della mutazione paterna $\Delta F508$ nel plasma materno sono stati disegnati tre primers utilizzando il software, disponibile online, Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>): due forward ed un solo reverse. E' stato scelto di procedere inizialmente con una reazione di amplificazione standard con primers esterni alla delezione (FORWARD-ext/reverse: 108bp) e successivamente il prodotto ottenuto è stato utilizzato come template per una nested PCR allele-specifica (ASPCR) con primer forward specifico per il riconoscimento dell'allele con delezione (FORWARD-del/reverse: 82bp).

RISULTATI

La presenza del cffDNA nei campioni estratti da plasma è stata confermata in tutti e tre i casi, mentre la mutazione paterna è stata identificata solo nel caso 1. I risultati ottenuti sono stati successivamente confermati dall'analisi molecolare su villi coriali. In figura 3 sono riportati i risultati dell'analisi di mutazione delta F508, con i campioni sono stati amplificati dei controlli, positivo e negativo. Come controlli sono stati utilizzati sia DNA genomico (gDNA) estratto da sangue periferico che DNA libero (cffDNA) estratto da plasma.

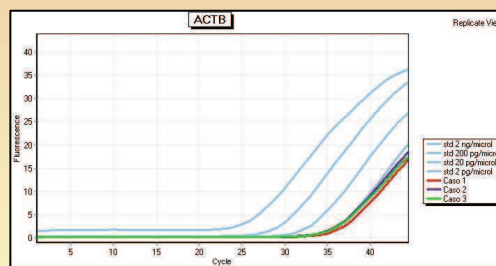


Figura 1: curva di amplificazione di ACTB.

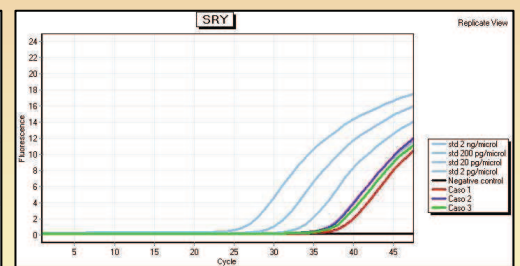
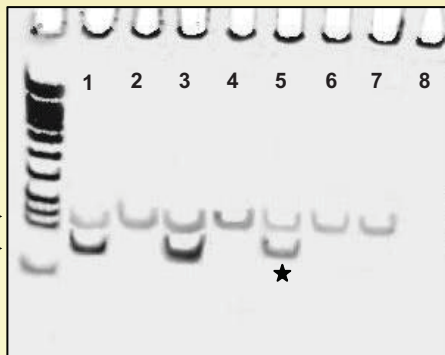


Figura 2: curva di amplificazione di SRY.



CONCLUSIONI

L'analisi dei risultati di Real-Time qPCR dimostra che il protocollo testato risulta essere un valido metodo per l'estrazione di DNA libero fetale da plasma materno. L'utilizzo di una nested-ASPCR per la ricerca di mutazione si è dimostrato essere un test sensibile, veloce ed economico, consentendone l'utilizzo già nel primo trimestre di gravidanza. L'esclusione della mutazione paterna nel feto attraverso l'analisi su plasma materno permetterebbe quindi di evitare l'utilizzo di procedure invasive per il prelievo di cellule fetali e di rassicurare la coppia prima di qualsiasi altro test diagnostico di routine.

Figura 3: PCR allele-specifica per la detection della mutazione $\Delta F508del$ in plasma materno.

- Lane 1: cDNA controllo positivo
- Lane 2: cDNA controllo negativo
- Lane 3: DNA genomico controllo positivo
- Lane 4: DNA genomico controllo negativo
- Lane 5: Caso 1 (in evidenza la banda prodotta dalla presenza della mutazione $\Delta F508$ nel feto)
- Lane 6: Caso 2
- Lane 7: Caso 3
- Lane 8: controllo negativo di amplificazione

REFERENCE: [1] Davies Jane C et al, Cystic fibrosis. BMJ 2007 Dec 15;335(7632):1255-9. [2] Konialis Christopher P et al, CFTR $\Delta F508$ Mutation Detection from Dried Blood Samples in the First Trimester of Pregnancy: A Possible Routine Prenatal Screening Strategy for Cystic Fibrosis? Fetal Diagn Ther 2007;22:41-44. [3] Morral N et al, The origin of the major cystic fibrosis mutation (DeltaF508) in European populations. Nat Genet 1994 Jun;7(2):169-75. [4] Wright Caroline F and Burton Hilary. The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. Human Reproduction Update, 2009 Jan-Feb;15(1):139-51. [5] Lo YMD et al, Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. The Lancet 1997; 350: 485-87. [6] Tjoa ML et al, Trophoblastic oxidative stress and the release of cell-free fetal-placental DNA. Am J Pathol 2006 Aug;169(2):400-4. [7] Chan KC et al, Hypermethylated RASSF1A in maternal plasma: a universal fetal DNA marker that improves the reliability of noninvasive prenatal diagnosis. Clin Chem 2006; 52: 2211-8. [8] Pichiassi E et al, The best approach for early prediction of fetal gender by using free fetal DNA from maternal plasma. Prenat Diagn. 2008; 28:525-530.