

**SESSIONE INTERATTIVA:
IL PUBBLICO DOMANDA E GLI ESPERTI RISPONDONO**

LE PROBLEMATICHE DELLA TECNICA DI SEQUENZIAMENTO

C. Carcassi

Cattedra di Genetica Medica, Università degli Studi di Cagliari

La complessità genetica del sistema maggiore di istocompatibilità (CMI) richiede l'impiego di diversi metodi di tipizzazione molecolare per l'identificazione di alleli specifici. I primers sequenza-specifici (SSP), le sonde oligonucleotidiche sequenza specifiche (SSOP) e la tipizzazione basata su sequenza (SBT) sono soltanto alcuni dei metodi utilizzati negli ultimi anni dalla comunità HLA. Il SBT è sicuramente uno dei metodi più comprensibili tra quelli utilizzati per la tipizzazione HLA completa. Tale metodo è stato valutato per la capacità di fornire una tipizzazione completa ad alta risoluzione a confronto con altri metodi utilizzati nel laboratorio standard di tipizzazione HLA. Si è così potuto constatare che la SBT fornisce la più alta risoluzione possibile, il che riveste la metodica di particolare importanza non solo per quanto riguarda la scoperta di nuovi alleli ma anche per l'impatto potenziale che il suo impiego può avere sui trapianti. Il metodo SBT è l'unico mezzo attualmente disponibile per la definizione di nuovi alleli. Grazie ad alcuni recenti avanzamenti tecnologici, è stato trovato il modo di ottenere un alto livello di produttività con la SBT nel laboratorio di routine. Ciò non toglie che sono tanti i fattori che il laboratorio di HLA deve prendere in considerazione quando decide di valutare la possibilità di sequenziare su ampia scala. L'approccio generale alla tipizzazione HLA tramite SBT comprende diverse fasi. La prima riguarda l'isolamento del DNA con un metodo di estrazione con una buona resa qualitativa. Una buona qualità del DNA è indispensabile ai fini dell'efficienza e della robustezza dell'amplificazione primaria in PCR. Invece una scarsa qualità del DNA estratto può esitare in un esubero di cicli di amplificazione. Superato quest'ostacolo si può procedere con l'amplificazione locus specifico in PCR. La dimensione dell'amplicone primario varia in base al locus HLA da tipizzare. Di solito, l'amplicone comprende una porzione degli esoni 2-3 (4) per la classe I e dell'esone 2 per la classe II. Dopo aver prodotto l'amplicone si passa alla seguente fase di purificazione. Per garantire l'efficienza delle reazioni di sequenziamento, esistono diversi metodi affidabili per la rimozione dei primers e dei deossiribonucleotidi trifosfati (dNTPs) in eccesso. L'amplificato primario viene poi utilizzato come stampo nelle reazioni di sequenziamento bi-direzionale sviluppate per gli esoni 2 o 3 (esone 4 in alcuni sistemi) degli alleli di classe I oppure soltanto per l'esone 2 degli alleli di classe II. Terminate le reazioni di sequenziamento, è necessario rimuovere il colorante in eccesso prima di analizzare i prodotti con il sequenziatore. Vari metodi possono essere impiegati per la rimozione del colorante in eccesso. L'utilizzo di un sistema multicapillare richiede una purificazione in condizioni di stringenza più alta per la rimozione di sali, proteine ecc. Una volta resi idonei alla ricostituzione, i prodotti delle reazioni di sequenziamento possono essere caricati sul sequenziatore. L'introduzione nel corso degli ultimi anni di nuove tecnologie ha reso molto più semplice questa fase della tipizzazione HLA basata sulla sequenza dei loci. Per esempio, sono stati sviluppati dei protocolli che prevedono l'impiego di un formato di piastra standard di 96/384 pozzetti. Questi protocolli rendono più facile le procedure di allestimento e riducono, per mezzo di pipette ripetitivi/multicanali, la possibilità di mischiare i campioni in esame. Inoltre è utile sottolineare che per poter

eseguire con successo un sequenziamento ad alto rendimento, viene ritenuta indispensabile la disponibilità di protocolli che riducono al massimo il trasferimento e la manipolazione dei campioni. Nel contemplare l'esecuzione della SBT nel proprio laboratorio è necessario confrontare i vantaggi e gli svantaggi dei sistemi multicapillari con quelli dei sistemi basati sui slab gel (gel molto sottili). Il mercato attorno alla SBT ha subito dei cambiamenti radicali nel corso degli ultimi anni a causa della disponibilità di sequenziatori multicapillari e di sistemi slab gel a 96 corsie. L'utilizzo di questi strumenti si riflette poi sul laboratorio di HLA che può spostare i propri orizzonti in considerazione della possibilità di effettuare 192-256 tipizzazioni di loci HLA al giorno con un sistema a 96 capillari. Sono stati sviluppati diversi sequenziatori multicapillari altamente automatizzati per la produzione di dati di sequenze. Questi strumenti possono lavorare autonomamente per parecchio tempo senza l'intervento manuale dell'operatore. In base al fornitore, i sistemi multicapillari possono essere a 16-96 capillari con una ripercussione notevole sui tempi di laboratorio visto l'eliminazione delle lunghe operazioni necessarie per la preparazione dei gel e la corsa elettroforetica. I sistemi multicapillari attualmente in commercio prevedono l'utilizzo di un autoricaricatore robotico che per mezzo di un meccanismo di iniezione elettrocinetica trasferisce i campioni da sequenziare nell'ordine specificato dall'operatore da una piastra di 96/384 pozzetti ai rispettivi capillari. Nell'iniezione elettrocinetica, l'elevata forza ionica del campione fa sì che gli ioni carichi si trasferiscono in un campo elettrico sulla matrice di separazione capillare. L'autocampionatura dei sistemi multicapillari riduce notevolmente l'impegno dell'operatore rispetto ai sistemi degli slab-gel tradizionali che invece devono essere caricati manualmente. Il risparmio di tempo varia in base al sistema capillare utilizzato. È possibile comunque raggiungere sino a 24 ore di operatività incustodita. Il vantaggio maggiore dei sistemi multicapillari è rappresentato dall'eliminazione delle operazioni di assemblaggio delle micropiastre e versamento del gel. Le piattaforme di elettroforesi capillare generalmente utilizzano una matrice di separazione a flusso che viene automaticamente iniettata in ciascun capillare prima del caricamento dei campioni. I sistemi capillari hanno matrici diverse ognuna sviluppata ad hoc in base alla configurazione stessa del sequenziatore. Essendo parte integrante dell'apparecchio non sono intercambiabili tra di loro. La matrice di separazione serve a risolvere i frammenti di sequenza nel campo elettrico applicato oltre che a determinare il limite di risoluzione degli stessi. Anche i sistemi di rivelazione sono molto diversi tra i vari strumenti in commercio. Ogni sistema di rivelazione ha dei vantaggi e degli svantaggi che possono essere valutati da ogni laboratorio in base alle esigenze. Un altro passaggio impegnativo eliminato dall'utilizzo del sistema multicapillare è la rintracciabilità alla fine della corsa elettroforetica. Con l'utilizzo dei capillari, la rintracciabilità viene superata in quanto la raccolta dei dati avviene in spazi predeterminati che corrispondono ad ogni capillare nella colonna. In conclusione possiamo dire che anche se i recenti progressi tecnologici hanno reso possibile eseguire la SBT ad alta risoluzione su ampia scala nel laboratorio di routine, sono molti gli aspetti da considerare prima di decidere di implementare questa tecnologia nel proprio laboratorio. La capacità di poter fornire tipizzazioni di alleli HLA ad alta risoluzione sicuramente ci porterà lontano e non soltanto per il trasferimento di conoscenze alla comunità HLA ma anche per i potenziali benefici clinici che ne possano derivare. Considerando la stretta connessione tra HLA e risposta immune la tipizzazione HLA ad alta risoluzione costituisce un prezioso aiuto per gli studi clinici sui vaccini, il trapianto di midollo osseo non correlato e molte aree ancora di interesse clinico.