

UN MERAVIGLIOSO DONO PER SALIRE IN ALTA RISOLUZIONE

di Nadia Ceschini e Paolo Gottardi

Il **laboratorio di Trento per la tipizzazione HLA** (antigeni dei globuli bianchi umani) è nato nel lontano 1992, ha assunto una sede specifica presso la Banca del Sangue ed un programma di crescita continua dal 1996, quando la dr.ssa Ceschini ha iniziato a lavorare in tale settore affiancando il dr. Gottardi.

Il compito di questo laboratorio è quello di studiare alcune particolari molecole (HLA) di natura proteica presenti sui globuli bianchi: queste molecole rappresentano assieme **segnali di riconoscimento delle cellule e meccanismi di legame e distruzione** di quanto viene a contatto della cellula e non presenta caratteristiche riconosciute come omologhe a quelle della cellula stessa (riconoscimento del self).

Questi meccanismi di riconoscimento ed accettazione o rifiuto e distruzione, in altre parole **compatibilità e rigetto**,

entrano in gioco nei casi di **trapianto** e di **malattie con componente autoimmune**.

Studiare e classificare queste proteine permette anche di gestire un nutrito gruppo di **donatori di midollo osseo**, le cui caratteristiche di compatibilità sono descritte in un **archivio mondiale** e sono consultabili dai centri di trapianto.

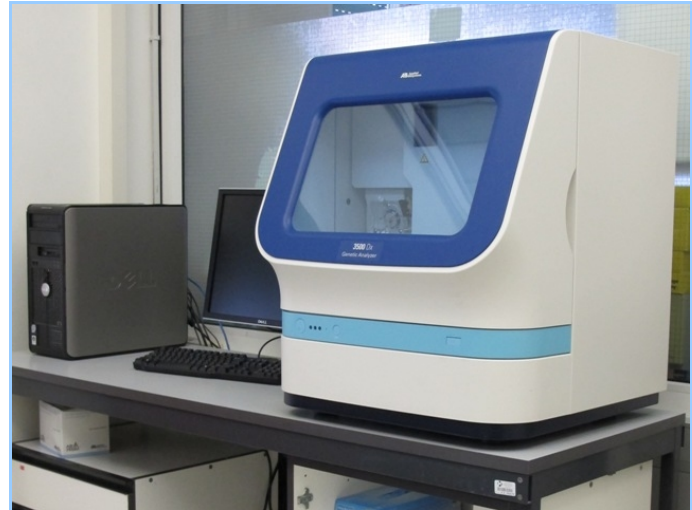
Lo studio delle molecole HLA, vent'anni or sono, si realizzava facendo reagire i linfociti (un tipo di globuli bianchi) con un certo numero di molecole di riconoscimento (anticorpi), che - se trovano sulla cellula una struttura complementare (antigene) capace di combinarsi con loro - legano la cellula stessa e ne permettono l'identificazione.

L'enorme, continuamente in aumento, numero di variabili in queste molecole rende insufficiente il numero di anticorpi di riconoscimento ed ha costretto anche il Laboratorio di Trento ad adottare metodiche di studio più sofisticate.

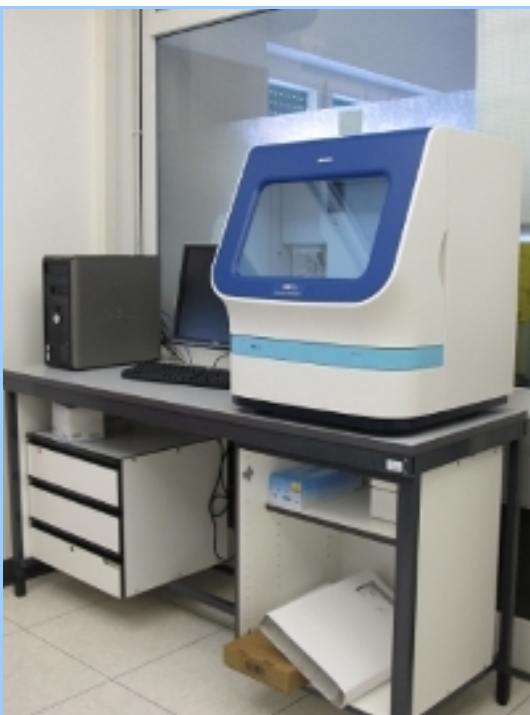
Nel 2002 è stato introdotto lo **studio del materiale genetico** contenuto nel nucleo delle cellule e recante nel suo interno le informazioni necessarie anche per costruire le molecole HLA: il materiale genetico (DNA) è estratto dal nucleo della cellula, i segmenti di nostro interesse (sequenze) sono separati nei due filamenti costituenti e ciascuno riappaiato con un nuovo segmento complementare, così da moltiplicarli nel termociclatore per trenta volte ottenendo circa un miliardo di copie dell'originale e quindi sono fatti correre con l'elettroforesi, che ne permette la distinzione in base a dimensioni, carica elettrica e peso molecolare.

Nel 2008 il laboratorio ha ottenuto l'**accreditamento a livello internazionale**, superando con esito positivo un insieme di controlli di qualità e l'ispezione da parte degli esperti dell'**EFI (European Federation of Immunogenetics)**, portando anche nell'occasione il livello di competenza alla cosiddetta **alta risoluzione**, cioè alla capacità/autorizzazione di definire con maggior specificità le caratteristiche delle sequenze di DNA nelle loro regioni più variabili.

Anche questo traguardo però si va configurando come probabilmente insufficiente in un prossimo futuro, sia per la necessità di dimostrare la capacità di analizzare ad alta risoluzione un maggior numero di caratteristiche (oltre a DR, anche A, B, C) sia per la difficoltà di moltiplicare



specificamente nel termociclatore le sequenze nuove che compaiono nella popolazione per ricombinazione (sono come l'aspetto di un mosaico, che cambia continuamente per la diversa disposizione dei suoi pezzi).



Ecco allora il **nuovo salto di qualità**, l'introduzione della nuova metodica di analisi che è il **sequenziamento**: con lo strumento, avuto in dono dall'AIL, è possibile **analizzare le sequenze** (di cui si è accennato sopra) non più "grossolanamente" considerando peso, dimensione e carica elettrica per mezzo dell'elettroforesi, **ma definendo una per una le molecole chiave** (basi azotate nei nucleotidi) che le compongono.

Nel termociclatore non viene più riprodotta e moltiplicata l'intera sequenza, bensì di essa si ottengono i vari segmenti di allungamento (1, 2, 3, ..., 100, ..., 200, ... basi azotate), usando un espediente: se ogni base azotata si lega nel filamento a quella precedente ed a quella seguente per formare la sequenza e se si aggiunge alla miscela un certo numero di basi azotate capaci di legarsi a quella precedente ma non di offrire l'aggancio a quella successiva (nucleotide terminator), ecco che il sequenziatore produrrà copie interrotte a 1, 2, 3, ..., 100, ..., 200, ... basi azotate: se tutte queste copie sono fatte correre con l'elettroforesi in un capillare, la copia più corta e leggera arriverà al termine per prima, mentre la più lunga e più pesante uscirà per ultima; se ogni base azotata ha un marcatore specifico (fluorocromo) analizzabile da una fotocamera all'uscita dal capillare, è possibile determinare ("sequenziare") la successione delle basi che compongono il gene

analizzato. Con la successiva analisi delle sequenze con interpretazione della successione delle basi e confronto tramite software con il database contenente tutte le sequenze note, è possibile **definire la denominazione specifica della sequenza** da noi **analizzata ad alta o altissima risoluzione** e quindi **inserire il dato della tipizzazione nel nostro registro**.

Dal momento della completa operatività dello strumento sono stati tipizzati correttamente 44 campioni, confrontandoli con le precedenti determinazioni in alta risoluzione. In questo momento stiamo processando sei campioni che costituiscono il nostro controllo di qualità, proveniente dall'Università della California: abbiamo esteso lo studio su tutte le caratteristiche utilizzate per determinare la compatibilità per il trapianto di un paziente, cioè gli alleli HLA A*, B*, C*, DRB1*, DQB1*, DQA1*, DRB3, DRB4, DRB5. Il superamento di questo e del prossimo controllo ci consentirà di poter richiedere, in occasione dell'ispezione EFI, l'estensione dell'accreditamento anche per questa metodica e quindi di diventare completamente autonomi.

Grazie di cuore.

Trento, 13 ottobre 2011

Nadia Ceschini e Paolo Gottardi