



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Facoltà di Ingegneria
Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione

Tesi di Laurea

SENSORI ELETTROCHIMICI PER APPLICAZIONI BIOMEDICALI NEL CAMPO DELLA DIAGNOSTICA PRENATALE

Relatore: Ch.mo Prof. Alessandro Paccagnella
Correlatore: Dott. Matteo Scaramuzza

Laureando: Danieli Giorgia

Anno Accademico 2012 – 2013

Indice

Sommario.....	4
1 INTRODUZIONE.....	5
1.1 Cos'è la Fibrosi Cistica?.....	5
1.2 Diagnosi.....	6
1.3 Tecniche di analisi genetica per la Fibrosi Cistica.....	10
Analisi di I livello.....	10
Analisi di II livello.....	11
Analisi di III livello.....	11
2 Il DNA.....	12
2.1 La struttura del DNA.....	12
2.1.1 I nucleotidi.....	12
2.1.2 La doppia elica.....	14
2.2 Il genoma.....	16
2.3 Organizzazione del DNA.....	16
2.4 Processi legati al DNA.....	17
2.4.1 La replicazione.....	17
2.4.2 Trascrizione e traduzione.....	18
2.4.3 Denaturazione e riassociazione.....	18
2.5 Tecniche di biologia molecolare.....	20
2.5.1 L'ibridazione.....	20
2.5.2 Il sequenziamento del DNA.....	21
2.5.3 La reazione a catena della polimerasi (PCR).....	23
3 Biosensori per l'analisi del DNA.....	25
3.1 Biosensori.....	25
3.1.1 Definizione.....	25
3.1.2 Elementi principali.....	25
Il substrato.....	26

Il componente biologico.....	26
I metodi di immobilizzazione.....	26
Il trasduttore.....	27
3.1.3 Fattori di prestazione.....	28
La selettività.....	28
La sensibilità.....	28
Il limite di rilevazione.....	29
L'accuratezza.....	29
La precisione.....	29
Le condizioni di misura.....	29
Il tempo.....	29
3.2 Sensori elettrochimici di DNA.....	29
3.2.1 Principio di funzionamento.....	29
3.2.2 Tipologie di dispositivi.....	30
3.2.2.1 Rivelazione dell'ibridazione di tipo labeled-based.....	31
3.2.2.1.1 Molecole redox come etichette (labels).....	31
3.2.2.1.2 Enzimi come etichette.....	33
3.2.2.1.3 Biosensori per il DNA coniugati alla nanotecnologia.....	34
3.2.2.2 Rivelazione dell'ibridazione di tipo label-free.....	35
3.2.2.2.1 La carica elettrica fluisce attraverso il DNA.....	35
3.2.2.2.2 Segnali intrinseci.....	36
3.2.2.2.3 Impedenza elettrochimica.....	37
4 Diagnosi prenatale della Fibrosi Cistica.....	39
4.1 Indagini prenatali.....	39
4.2 Biosensori elettrochimici per la diagnosi.....	41
4.2.1 Biosensore voltammetrico per il DNA.....	41
4.2.2 Biosensori con limiti di rilevazione molto bassi.....	42
4.2.2.1 Trasduzione basata sulla chemiluminescenza.....	43

4.2.2.2	Trasduzione con sensore potenziometrico.....	43
4.2.2.3	Trasduzione voltammetrica	44
4.2.3	Sensore basato su nanoparticelle d'oro	45
4.2.4	Dispositivo label-free basato sulla spettroscopia d'impedenza.....	47
5	Conclusioni	51
	Bibliografia.....	52

Sommario

Nella parte iniziale del lavoro di Tesi si introdurrà la malattia della Fibrosi Cistica, in quanto la sua diagnosi è l'obiettivo finale del biosensore elettrochimico per il riconoscimento del DNA in fase di sviluppo presso il laboratorio BioDevices del Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione dell'Università di Padova. Successivamente si vedrà una breve spiegazione della struttura del DNA e di tutti i processi che lo coinvolgono. I capitoli seguenti invece descriveranno prima i biosensori elettrochimici in modo più generale e in base ai vari principi di funzionamento, per poi concentrarsi sui meccanismi di rilevazione dei dispositivi più recenti, utilizzabili specificatamente per la diagnosi della Fibrosi Cistica.

1 INTRODUZIONE

1.1 Cos'è la Fibrosi Cistica?

La Fibrosi Cistica è una malattia autosomica recessiva¹ causata dalla mutazione del gene CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) che codifica una proteina che trasporta il cloro attraverso le membrane cellulari delle cellule epiteliali che tappezzano le vie respiratorie polmonari. Queste cellule, a causa di una alterata secrezione, provocano uno squilibrio ionico e inducono un maggior riassorbimento di sodio e acqua [1][2][3].

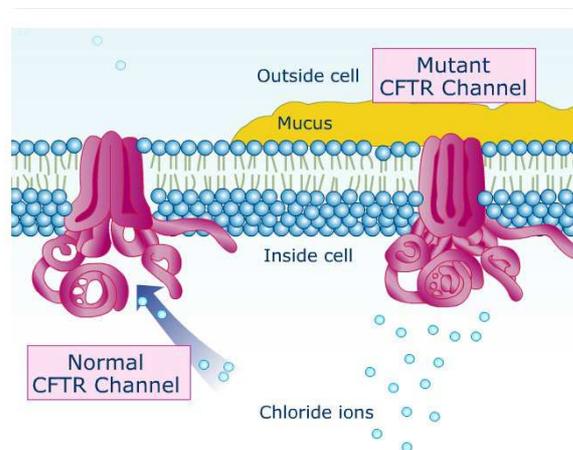


Figura 1.1 - nella parte sinistra vediamo un normale canale CFTR che porta all'esterno della cellula gli ioni di cloro, mentre nella parte destra un canale mutato non svolge il suo compito, creando un muco denso e appiccicoso difficilmente rimovibile dalle ciglia delle cellule epiteliali

L'anomalia nel trasporto del cloro induce le ghiandole a secrezione esterna a produrre un muco denso e viscoso che ostruisce i dotti principali. Per tale motivo le manifestazioni più rilevanti sono le infezioni polmonari, l'insufficienza pancreatica, l'ostruzione intestinale, la cirrosi epatica e l'infertilità maschile. Alcuni segni distintivi che permettono di identificare la malattia sono la pelle salata, la scarsa crescita, l'aumento di peso, l'accumulo di muco denso e le frequenti infezioni polmonari.

Negli ultimi 70 anni le aspettative di vita sono migliorate notevolmente grazie ai nuovi trattamenti anche se non è ancora stata trovata una cura.

¹ Le malattie autosomiche recessive richiedono l'eredità di due alleli, ovvero una variante di una sequenza di un gene, difettosi. Ciò significa che non vi sono copie funzionanti di quello specifico gene.

L'incidenza della malattia è molto variabile e dipendente dall'area geografica, come ci mostrano i dati seguenti:

<i>GRUPPO ETNICO</i>	<i>INCIDENZA DELLA FIBROSI CISTICA</i>	<i>FREQUENZA DEL PORTATORE (%)</i>
CAUCASICI	1/2500	1/25 (4%)
EBREI ASHKENAZI	1/3300	1/29 (3.4%)
ISPANICI (AMERICA LATINA)	1/8000	1/46 (2.1%)
AFRICANI AMERICANI	1/15000	1/65 (1.5%)
ASIATICI AMERICANI	1/30000	1/150 (0.7%)

Figura 1.2 - incidenza della malattie nelle diverse etnie del mondo [4]

1.2 Diagnosi

I test diagnostici più frequentemente usati e con maggiori riscontri pratici sono lo screening neonatale, il test del sudore (*sweat test*) e il test genetico.

Il pannello di consenso² prevede che la diagnosi della FC sia basata sulla presenza di almeno una tra le caratteristiche cliniche, un precedente caso di FC nell'ambito familiare o uno screening neonatale positivo, più dei test di laboratorio che mostrino delle anomalie nel gene CFTR [5].

Solitamente il primo test di diagnosi è lo screening neonatale, un insieme di esami volti all'identificazione di patologie generiche per le quali esiste una terapia. L'attuale metodo si basa sulla misura del quantitativo di tripsina immunoreattiva (IRT) attraverso il prelievo di una goccia di sangue durante il secondo-terzo giorno di vita. Il campione ematico viene collocato nel pozzetto con anticorpi insieme ad un tampone di eluizione contenente degli anticorpi coniugati con l'enzima. Dopo l'incubazione il pozzetto viene lavato e rivestito con un substrato chemiluminescente. Si può così costruire una curva che rispecchi le misure di RLU e dedurre le concentrazioni di tripsina. Questa sostanza risulterà elevata nelle prime settimane di vita dei neonati affetti da Fibrosi Cistica ma i limiti specifici vanno stabiliti in base al livello di efficacia del programma di screening. Lo screening rivela oltre l'80% dei bambini malati, tuttavia, per confermare la diagnosi,

² Documento redatto nel 1996 dalla Fondazione per la Fibrosi Cistica (Cystis Fibrosis Foundation) in cui degli esperti hanno stabilito dei criteri per la diagnosi della Fibrosi Cistica.

resta necessario eseguire il test del sudore. La sensibilità di una singola misura dell'IRT è dell' 87.5%, essa aumenta al 93.6% se la misura viene ripetuta dopo 20-30 giorni. Il maggior vantaggio di questa tecnica è la possibilità di ottenere una diagnosi precoce che permetterà di iniziare istantaneamente una terapia opportuna. D'altra parte il rischio più rilevante è quello di ottenere dei casi di falso-negativo, che quindi potrebbero avere una diagnosi ritardata. Il criterio tradizionale per la diagnosi della malattia è il riscontro di un test del sudore positivo associato ad un sintomo caratteristico [6].

Lo *sweat test* prevede la misura della concentrazione di elettroliti attraverso il metodo di Gibson-Cook; esso consiste nella somministrazione transdermica della pilocarpina, sostanza necessaria per stimolare le ghiandole della sudorazione, la raccolta del sudore in una garza o una carta assorbente e l'analisi della concentrazione di cloro attraverso la fotometria di fiamma secondo le direttive del Clinical Laboratory Standards Institute. Il comitato per il consenso della diagnosi ha sottolineato alcuni importanti aspetti per assicurare la riuscita del test. Innanzitutto i neonati asintomatici con uno screening positivo devono avere almeno due settimane e pesare almeno 2 kg, mentre per i sintomatici può essere valutato entro le 48 ore dalla nascita. Solitamente l'affidabilità dei risultati aumenta se vengono fatti dei test bilaterali e se la raccolta del campione e la sua analisi avvengono nello stesso giorno. Sin dall'introduzione di questa metodologia, è stata applicata a tutti i pazienti la seguente classificazione sui valori di sudore: normali (≤ 39 mmol/L), intermedi (40 to 59 mmol/L) e anomali (≥ 60 mmol/L). Dopo alcuni dati sperimentali è stata valutata fuorviante l'interpretazione dei risultati prima delle due settimane di età; i valori presentati in precedenza possono essere considerati validi per bambini al di sopra dei 6 mesi e hanno una sensibilità del 99.9%. In caso di valori intermedi si procede con la ripetizione del test o l'analisi del DNA. Nella pratica clinica questo test è considerato il gold standard³ grazie alle sue ottime prestazioni [7][5].

Un ulteriore e importante test è la differenza di potenziale elettrico della mucosa nasale, usato per decenni nella ricerca nell'ambito della FC, ma da poco introdotto nella pratica clinica per aiutare la diagnosi. Tale parametro viene misurato come differenza tra

³ Il gold standard è l'esame diagnostico più accurato per confermare un determinato dubbio diagnostico.

il potenziale delle cellule superficiali della mucosa nasale e quello di un punto qualsiasi del corpo (solitamente il braccio) con un voltmetro. Nella Fibrosi Cistica la scarsità della proteina CFTR porta ad una bassa concentrazione di cloro sulla mucosa e di conseguenza il potenziale si abbassa a valori tipici di -40 mV, contro i -20 mV degli individui sani [8].

Il test del DNA identifica le mutazioni del gene CFTR: esse possono essere in configurazione *trans* in due differenti cromosomi oppure in *cis* nello stesso cromosoma; noi assumeremo solamente l'assetto *trans*. Quest'ultimo sta ad indicare che in una molecola i gruppi funzionali si trovano da parti opposte rispetto ad un elemento che impedisce la rotazione (ad esempio un doppio legame o un anello); viceversa nelle molecole *cis* i gruppi funzionali si troveranno dalla stessa parte.

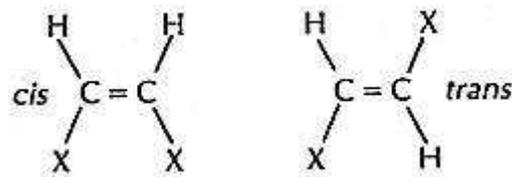


Figura 1.3 - a sinistra: configurazione *cis*, i due gruppi funzionali, indicati con X, si trovano entrambi al di sotto del doppio legame tra i C. A destra: configurazione *trans*, i gruppi X si trovano da parti opposte

Le mutazioni genetiche sono dei cambiamenti stabili ed ereditabili della sequenza dei nucleotidi che compongono la sequenza di DNA, possono essere dovuti al caso o ad agenti esterni, alterano il genotipo dell'individuo e talvolta anche il suo fenotipo. Le tipologie di mutazioni sono svariate: cancellazione, duplicazione, inversione, inserzione, traslocazione.

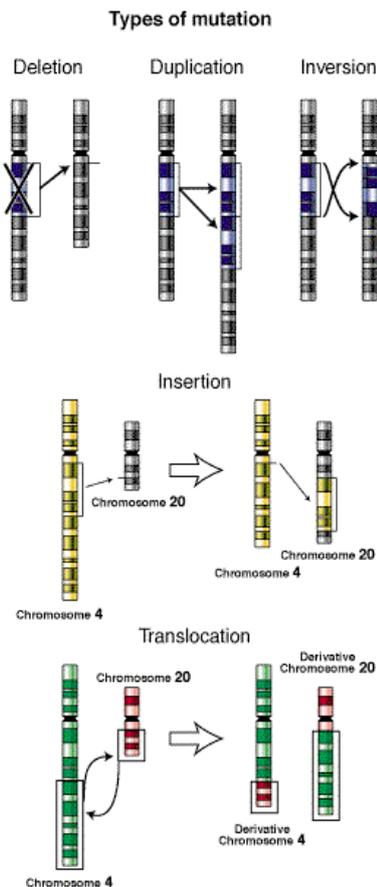


Figura 1.4 - diversi tipi di mutazioni

Anche se al giorno d'oggi l'elenco delle mutazioni può identificare il 90% delle anomalie del gene CFTR, il 9.7% degli individui del Cistic Fibrosis Foundation Registry hanno almeno una mutazione non identificata. Ciò avviene a causa della diversa natura, distribuzione e frequenza delle stesse tra le varie popolazioni. Alcuni individui con mutazioni in entrambe le copie del gene CFTR che hanno parziali fenotipi possono eventualmente ricevere una diagnosi di FC basata sui metodi attuali, mentre in altri casi si può eliminare la presenza della malattia. In altri pazienti invece la diagnosi non può né essere confermata né esclusa in quanto la linea di separazione tra presenza della malattia e le sue disfunzioni è sfumata. Tuttavia tale test permette di individuare anche i portatori dell'anomalia del gene CFTR, rendendo quindi più sensate le ipotesi sulle malattie dei figli [9].

Altri test ausiliari per la diagnosi sono utilizzati ma hanno certamente gravi controindicazioni, come la bassa sensibilità o precisione, la complessità e il costo

elevato. E' disponibile un'elevata gamma di test che determinano la funzione pancreatica, come la misura della concentrazione fecale di enzimi pancreatici endogeni.

Tuttavia nessuno di questi metodi, preso singolarmente, può diagnosticare la malattia con certezza.

1.3 Tecniche di analisi genetica per la Fibrosi Cistica

Il gene responsabile della malattia si trova lungo il braccio lungo del cromosoma 7 e si estende per più di 250000 basi e le sue mutazioni finora identificate sono più di 1300.

La mutazione principale è rappresentata dalla $\Delta F508$, presente in Italia in circa il 50% dei malati. La scoperta del gene responsabile della Fibrosi Cistica ha permesso lo sviluppo di studi più approfonditi sulla natura del difetto e ha aperto la strada a criteri più avanzati di diagnosi genetica [9].

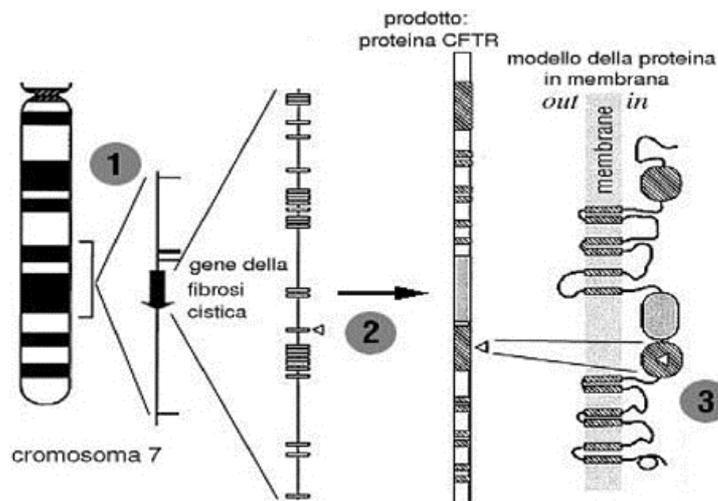


Figura 1.5 – 1: mappa cromosomica; 2: struttura genica; 3: struttura proteica [9]

Si possono distinguere diversi livelli di analisi genetica in base alla sensibilità nei confronti del numero di mutazioni rilevabili, i costi, la ripetibilità dei risultati, i tempi di esecuzione, le tecnologie utilizzate [10].

Analisi di I livello

Le caratteristiche principali delle analisi di I livello sono la sensibilità, la praticità e la rapidità, a causa delle richieste sempre maggiori di eseguire tale test. Da una parte vediamo le tecniche artigianali, più economiche ma difficilmente riproducibili, e dall'altra i kit da laboratorio, più costosi ma anche più veloci, più facilmente riproducibili e più uniformi nell'identificazione di un certo insieme di mutazioni. Risulta quindi

necessaria una scelta tra le mutazioni da riconoscere: in Italia, per esempio, includendo una trentina di mutazioni si ha un detection rate (tasso di individuazione) del 75%. Queste tecniche vengono utilizzate anche nelle analisi prenatali in seguito all'estrazione di un campione di DNA prelevato dai villi coriali o dal liquido amniotico e all'amplificazione tramite PCR (Par. 2.5.3) [6].

Analisi di II livello

L'analisi di secondo livello utilizza sistemi di scanning del gene che permettono il riconoscimento di variazioni in definite porzioni codificanti del gene CFTR. Tali variazioni vengono caratterizzate in seguito grazie alle tecniche di sequenziamento. Questo secondo livello permette un migliore tasso di individuazione rispetto alle analisi di I livello.

Analisi di III livello

Nel 10-15% dei soggetti malati non si riesce a identificare la o le alterazioni del gene nonostante l'analisi di tutte le porzioni codificanti. Con queste tecniche quindi si possono rivelare i riarrangiamenti genomici (delezioni o inserzioni) che possono sfuggire alle analisi precedenti.

2 Il DNA

Il DNA (acido deossiribonucleico) è la più importante molecola nella quale risiedono tutte le informazioni genetiche, per questo riveste un ruolo essenziale in tutti gli organismi viventi, è in grado di autoreplicarsi e permette la corretta sintesi delle proteine. Contrariamente al DNA che si trova esclusivamente all'interno del nucleo, l'RNA (acido ribonucleico) ha il compito di portare le informazioni del DNA all'esterno del nucleo [11].

2.1 La struttura del DNA

2.1.1 I nucleotidi

Il *nucleotide* è l'unità costitutiva degli acidi nucleici, che sono perciò detti catene polinucleotidiche. Ogni nucleotide ha tre componenti: un *gruppo fosfato*, uno *zucchero pentoso* e una *base azotata*.

Lo zucchero ciclico pentoso, ovvero a cinque atomi di carbonio, è il 2-deossiribosio per il DNA e il ribosio per l'RNA: mentre lo zucchero del DNA in posizione 2 ha solo un -H, nell'RNA troviamo un gruppo -OH.

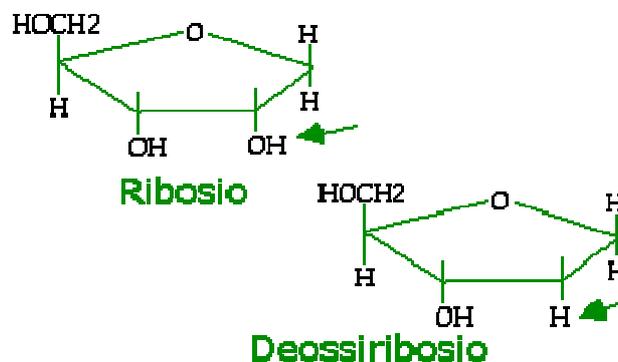


Figura 2.1 - struttura del ribosio e del deossiribosio

Le basi azotate possono avere due tipi di strutture: ad anello doppio, le purine, che sono l'adenina e la guanina o ad anello singolo, le pirimidine, la citosina, la timina e l'uracile. Solitamente le basi sono indicate con la lettera iniziale maiuscola: A, G, C, T, U.

Il DNA contiene l'adenina, la timina, la citosina e la guanina, mentre nell'RNA restano A, G, C ma la timina è sostituita dall'uracile. Le purine legano il C 1' con l'azoto 9', invece le pirimidine il C 1' con l'azoto 1'.

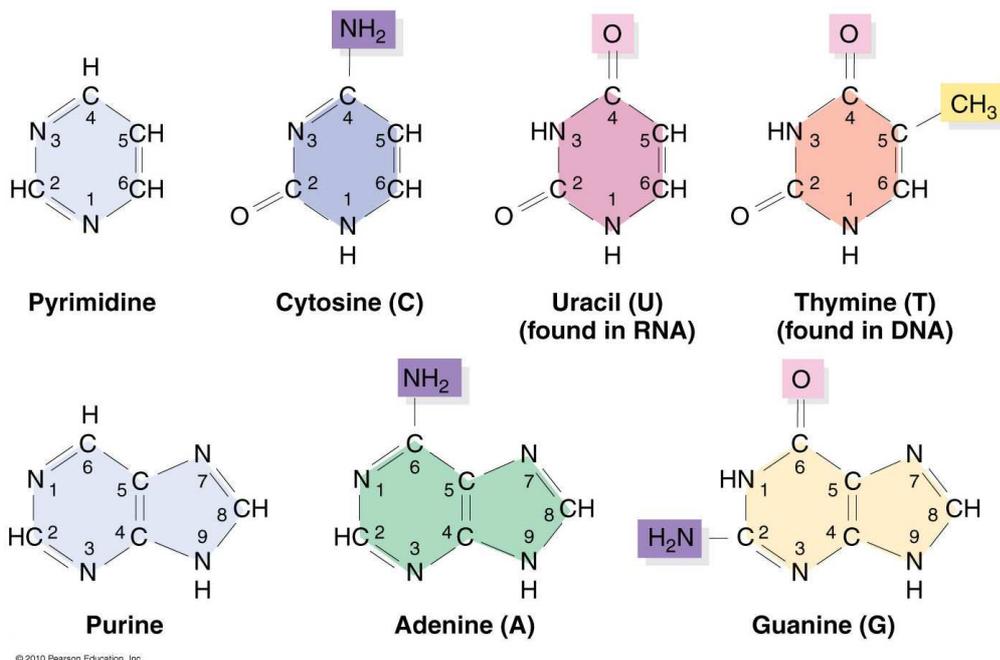


Figura 2.2 - Struttura chimica delle purine e delle pirimidine, che costituiscono le basi azotate del DNA e dell'RNA. La nomenclatura per la numerazione degli atomi di carbonio e azoto è indicata dentro le strutture.

Il sistema base-zucchero invece è detto *nucleoside*.

Perciò otteniamo un nucleotide dall'aggiunta di un gruppo fosfato al nucleoside.

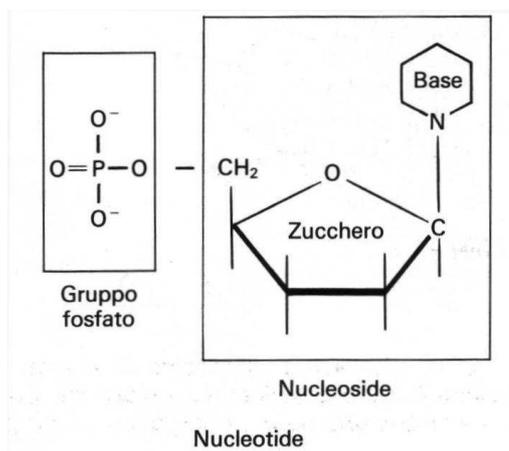


Figura 2.3 - complesso nucleotide, formato da un nucleoside (base + zucchero) e un gruppo fosfato

Nel polimero il collegamento tra i nucleotidi è realizzato da gruppi fosfato che formano legami esterei con il gruppo OH del C in posizione 5' di un monomero e con il gruppo OH del C in 3' di un secondo nucleotide. Questi legami sono quindi detti

fosfodiesteri. Per questo motivo in ogni filamento di DNA si può distinguere l'estremità 3' dalla 5' e per convenzione si legge dal terminale 5' al terminale 3' libero. Il legame sopra descritto assicura una sufficiente stabilità al polimero per fungere da depositario del codice genetico; tuttavia il DNA risulta instabile in soluzioni acide, mentre l'RNA lo è anche in soluzioni alcaline.

I gruppi fosfato e le unità carboidriche (zuccheri) costituiscono la struttura ripetitiva del polimero, lasciando quindi alla diversità delle basi azotate il ruolo di custodi dell'informazione genetica.

2.1.2 La doppia elica

Solo nel 1953 Watson e Crick scoprirono che due filamenti di DNA si associavano in una struttura elicoidale destrorsa caratterizzata da 10 residui per giro. La loro grande intuizione fu però capire che questa struttura era stabilizzata da legami a ponte idrogeno tra le basi interfacciate appartenenti ciascuna a un distinto filamento. I ponti idrogeno si formavano solo accoppiando adenina con timina (o uracile per l'RNA) e guanina con citosina. In questo modo i due filamenti risultano complementari, in quanto ciascuno può fungere da stampo per l'altro. Essi sono anche detti antiparalleli perché le orientazioni da C-5' a C-3' delle due catene sono opposte.

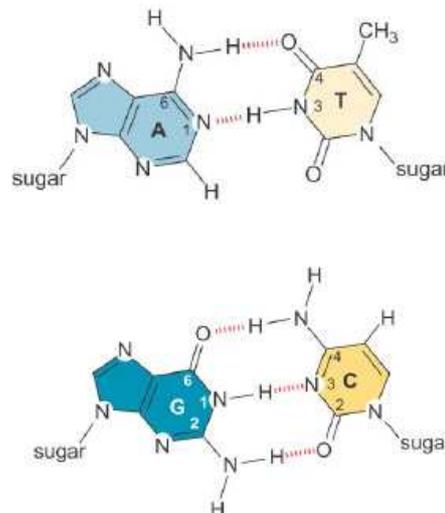


Figura 2.4 - Legami a idrogeno tra le basi complementari: adenina e timina sopra, guanina e citosina sotto

La porzione idrofila di fosfato e deossiribosio dell'elica si trova all'esterno, per interagire favorevolmente con il mezzo acquoso in cui è immerso il DNA, le basi invece

stanno all'interno, su piani perpendicolari rispetto all'asse dell'elica. Sono le interazioni di Van der Waals, dette *interazioni di impaccamento*, ad impilare i piani consecutivi di basi. Sebbene le basi siano collocate internamente alla doppia elica, queste possono essere raggiunte attraverso due profondi solchi: il *solco maggiore* e quello *minore*.

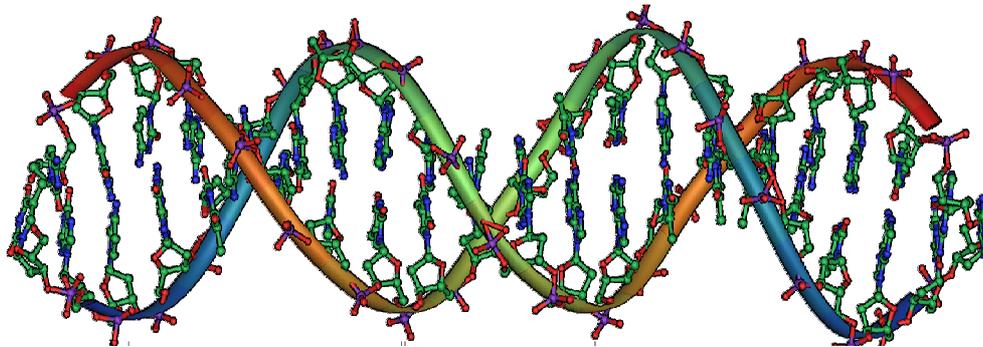


Figura 2.5 - struttura a doppia elica del DNA. In alto è indicato il passo dell'elica con 10 paia di basi (3.4 nm), in basso sono mostrati il solco maggiore e il solco minore

Quanto descritto finora si riferisce alla conformazione B della doppia elica, che però non è la sola: esistono anche le forme A e Z.

La conformazione A si ottiene da una soluzione a più basso contenuto d'acqua e ha 11 paia di basi per giro d'elica, un solco maggiore meno pronunciato e un solco minore più evidente.

La forma Z invece non presenta solchi, è di tipo sinistoso ed ha una forma allungata e sottile.

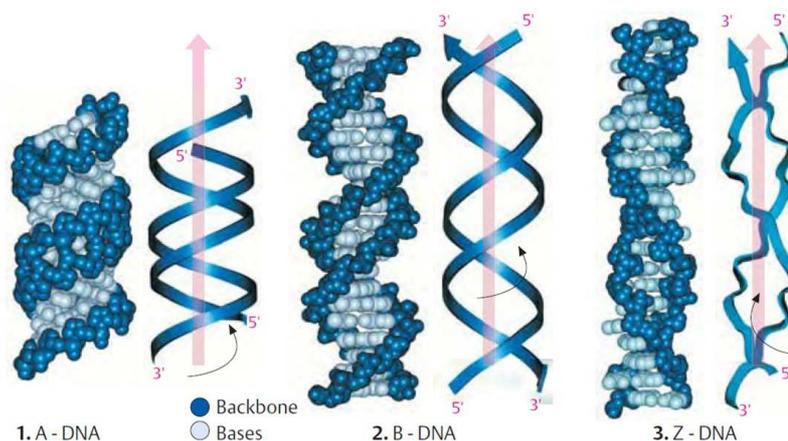


Figura 2.6 - modelli delle diverse strutture del DNA: A, B, Z

Il DNA inoltre può presentare dei tratti superavvolti; gli enzimi che si occupano di rompere, svolgere e avvolgere il DNA sono detti *topoisomerasi*.

2.2 Il genoma

Ogni organismo porta all'interno delle proprie cellule almeno una copia dell'intera informazione genetica di cui ha bisogno, detta genoma. Normalmente le informazioni sono contenute nel DNA a doppio filamento, anche se alcuni virus utilizzano l'RNA. Il genoma umano è costituito da 3.2 miliardi di coppie di basi, organizzate in 23 coppie di cromosomi (22 coppie di autosomi e una coppia di cromosomi sessuali). Le sequenze che possono essere trascritte si dicono geni.

2.3 Organizzazione del DNA

Nelle cellule il DNA è organizzato in grandi strutture chiamate cromosomi; sebbene il DNA rappresenti la parte fondamentale del cromosoma, essi sono composti al 50% da proteine.

Negli eucarioti, la combinazione del DNA con le proteine ad esso associate formano la cromatina. L'unità fondamentale della cromatina è il *nucleosoma*: un *core* di otto proteine cariche positivamente, dette *istoni*, e attorno ad esse è avvolto il DNA. Il DNA fra ciascun nucleosoma è chiamato *DNA linker*, quello invece avvolto attorno all'ottamero istonico è detto *DNA core* ed ha una lunghezza di circa 147 paia di basi. Questo complesso nucleo-proteico assolve, nella cellula, a due importanti funzioni: compatta il DNA in modo tale che esso possa essere contenuto nel nucleo e diminuisce l'accessibilità al DNA (in modo da regolare la trascrizione e quindi l'espressione genica). Una volta impaccato nel nucleosoma, il DNA ha la possibilità di essere organizzato in strutture più compatte di ordine superiore in modo tale da determinare un'ulteriore riduzione delle dimensioni. Una catena di polinucleosomi si organizza a sua volta in anse su una struttura polisaccaridica detta *scaffold*, che costituisce lo scheletro del cromosoma. Proprio in questo tratto di DNA è possibile individuare i geni.

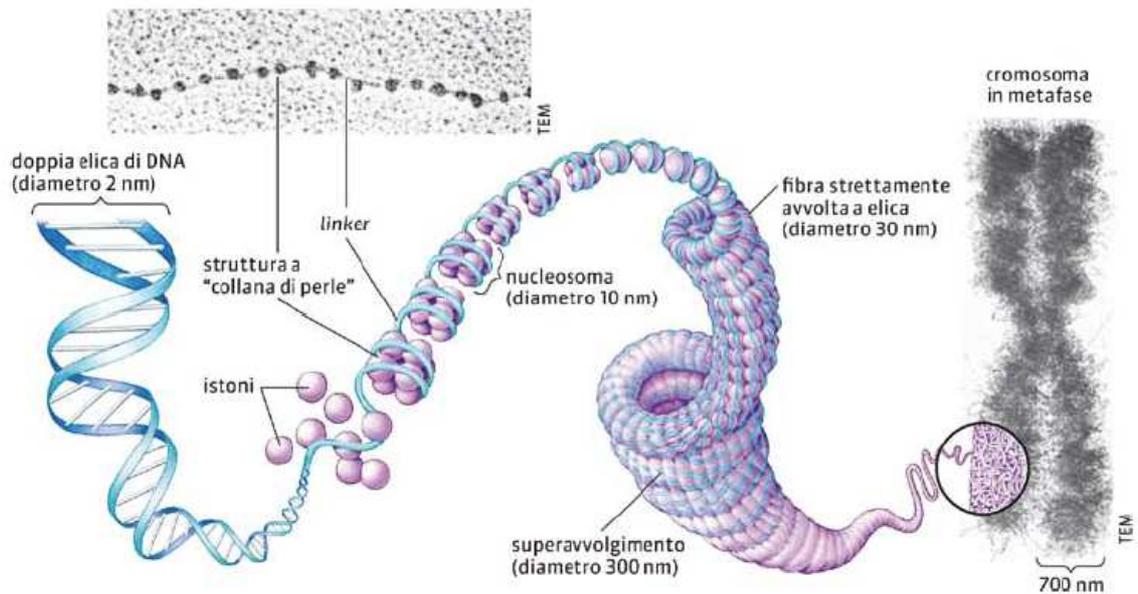


Figura 2.7 – diversi livelli di organizzazione del DNA: dalla doppia elica, all'avvolgimento attorno all'ottamero istonico, al superavvolgimento della cromatina, al cromosoma

2.4 Processi legati al DNA

2.4.1 La replicazione

La replicazione è quel processo che permette di ottenere da un solo doppio filamento di DNA una coppia di doppi filamenti identici attraverso la separazione di quelli originari e la creazione di filamenti complementari ad ognuno di essi grazie alla DNA polimerasi. I filamenti di partenza sono detti *template* perché fanno da stampo e rimangono invariati, è proprio questa caratteristica a dare il nome di *replicazione semiconservativa* a questa tecnica. Per avviare la replicazione bisogna separare i due filamenti con il processo della denaturazione per poi lasciar agire la DNA polimerasi nella direzione 5'-3'. La replicazione avverrà in modo continuo lungo uno dei due filamenti (filamento leading), mentre l'altro (filamento lagging) sarà sintetizzato prima come una serie di corti frammenti, detti di Okazaki, per poi essere uniti dalla *DNA ligasi*. Ciascun filamento di DNA è iniziato con un *primer* di RNA che deve poi essere eliminato per poter completare la reazione di replicazione. Dopo la sostituzione degli RNA primer con corrispondenti tratti di DNA, tutti i frammenti vengono uniti per formare un filamento continuo.

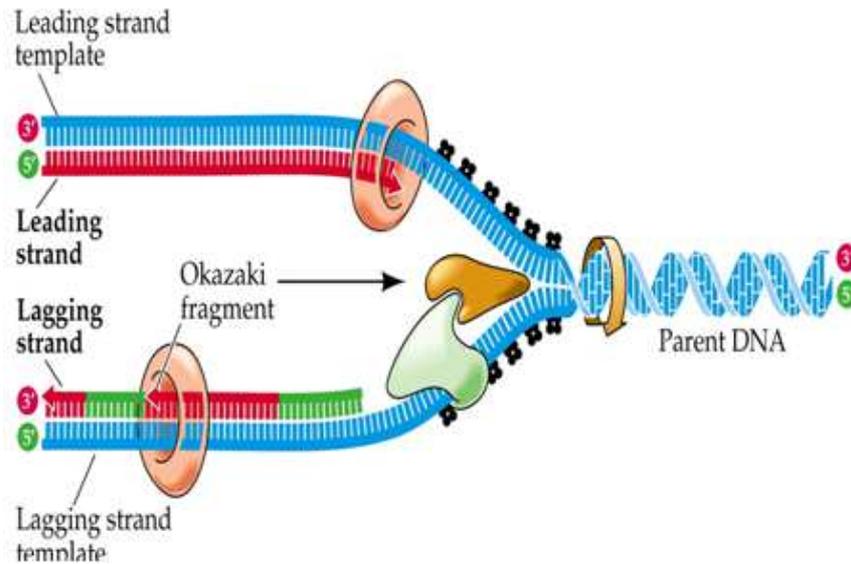


Figura 2.8 - modello schematico della replicazione del DNA. Nel filamento lagging notiamo i frammenti di Okazaki uniti tra loro dalla DNA ligasi

2.4.2 Trascrizione e traduzione

Il processo che segue la replicazione è la trascrizione del codice genetico ed avviene in modo molto simile. Analogamente a prima il DNA viene svolto e i due filamenti separati ma ora il filamento complementare sarà di RNA e rimarrà singolo. La funzione dell'RNA messaggero (mRNA) è proprio quella di portare all'esterno del nucleo l'informazione genetica, che è costituita da una sequenza di tre nucleotidi, detta *codone*. Ogni codone codifica un singolo amminoacido (per un totale di 20). Le molecole di tRNA (RNA transfer) assieme a enzimi e ribosomi traducono le triplette di basi negli amminoacidi. Una molecola di mRNA si lega ad un ribosoma, il tRNA porta gli amminoacidi al ribosoma, ciascun tRNA si lega al codone appropriato sull'mRNA e aggiunge il proprio amminoacido alla catena nascente; il ribosoma scorre lungo la molecola di mRNA fino alla traduzione dell'intera sequenza proteica.

2.4.3 Denaturazione e riassociazione

Poiché i due filamenti della doppia elica sono tenuti assieme mediante legami relativamente deboli, possiamo aspettarci che i due filamenti possano dividersi facilmente. In condizioni fisiologiche il DNA a doppio filamento è più stabile dei due separati. I filamenti complementari della doppia elica possono anche essere separati quando una soluzione di DNA viene scaldata sopra la temperatura fisiologica (vicino a 100°C) o posta in condizioni di pH elevato: questo processo è conosciuto come

denaturazione. Ad ogni modo la separazione dei filamenti è un processo reversibile. Quando la temperatura della soluzione di DNA denaturato viene abbassata lentamente, i singoli filamenti spesso incontrano quelli complementari e riformano una regolare doppia elica. La possibilità di *rinaturare* filamenti di DNA complementari, denaturati, permette la formazione di molecole ibride artificiali semplicemente abbassando la temperatura di una miscela di DNA denaturato proveniente da fonti diverse. Allo stesso modo possiamo formare ibridi mescolando filamenti complementari di DNA e RNA. La capacità di formare ibridi fra due singoli polimeri di acidi nucleici (reazione di ibridazione) è la base di alcune tecniche fondamentali in biologia molecolare.

Nel 1950 vennero eseguiti numerosi esperimenti sulla denaturazione del DNA e durante questi venne monitorato l'assorbimento di raggi ultravioletti di una soluzione di DNA. Il DNA ha un massimo di assorbimento di luce UV a 260 nm: le basi sono le principali responsabili di questo assorbimento. Quando la temperatura della soluzione viene avvicinata al punto di ebollizione dell'acqua, la densità ottica, assorbanza, misurata a 260 nm, aumenta in modo considerevole. La spiegazione di questo fenomeno è che la doppia elica assorbe una quantità di luce ultravioletta più bassa di circa il 40% rispetto al singolo filamento. Questa ipercromicità è dovuta all'impilamento delle basi che, essendo schermate dagli zuccheri-fosfato dell'impalcatura, sono meno esposte e quindi assorbono meno luce UV. Il punto di flesso della curva che rappresenta l'andamento della luce assorbita è il punto di fusione o T_m della molecola. Come il ghiaccio, il DNA fonde e va incontro ad una transizione che lo porta da una struttura a doppia elica altamente ordinata ad una struttura molto meno ordinata: il singolo filamento. La rapidità dell'aumento dell'assorbanza alla temperatura di fusione ci dice che la denaturazione o la rinaturazione è altamente cooperativa. La temperatura di fusione è caratteristica di ogni filamento ed è proporzionale alla percentuale di coppie di basi G:C, in quanto queste conferiscono una maggiore stabilità al doppio filamento. I ponti a idrogeno tra guanina e citosina infatti sono tre, mentre nella coppia A:T soltanto due; inoltre le interazioni di impilamento delle coppie G:C con le coppie adiacenti sono molto più favorite rispetto a quelle esistenti fra le coppie A:T e quelle adiacenti.

2.5 Tecniche di biologia molecolare

2.5.1 L'ibridazione

L'ibridazione è il processo di accoppiamento di basi tra polinucleotidi complementari a singolo filamento, provenienti da fonti diverse. Molte tecniche si basano sulla specificità dell'ibridazione tra due molecole di DNA con sequenza complementare, in modo da poter identificare sequenze specifiche in miscele complesse di acidi nucleici. In questo caso, una delle molecole è la sonda (*probe*): un frammento purificato o una molecola di DNA sintetizzata chimicamente. La sonda viene usata per cercare molecole con sequenza complementare (*target*) in miscele di acidi nucleici. Il probe deve essere marcato in modo tale da essere facilmente localizzato, una volta trovata la sequenza complementare.

Esistono fondamentalmente due metodi per marcare il DNA. Il primo prevede la sintesi di nuovo DNA in presenza di un precursore marcato, l'altro invece implica l'aggiunta di un marcatore all'estremità di una molecola di DNA intatta. La marcatura per incorporazione (primo meccanismo) è spesso eseguita mediante la reazione a catena della polimerasi (PCR), in cui si inserisce un precursore marcato, oppure ibridando al DNA brevi nucleotidi esamerici a sequenza casuale e consentendo alla DNA polimerasi di estenderli. I precursori marcati più comunemente usati sono nucleotidi modificati, dotati di una parte fluorescente o radioattiva. Il DNA marcato con fluorescenza può essere rilevato irradiando il campione di DNA con luce ultravioletta a lunghezza d'onda appropriata, e monitorando la luce emessa in risposta ad una lunghezza d'onda maggiore. Il DNA radioattivo può essere rilevato esponendo il campione d'interesse ad un film per raggi X o ad un fotomoltiplicatore.

Spesso è opportuno monitorare l'abbondanza o le dimensioni di una particolare molecola di DNA o RNA, in una popolazione che consta di molte molecole simili. Le tecniche di *blot*⁴ permettono di localizzare acidi nucleici specifici una volta che questi sono stati separati mediante elettroforesi.

⁴ "To blot" in inglese significa asciugare, assorbire. In questo caso la parola si riferisce alla tecnica di trasferimento del materiale da studiare su un supporto solido (normalmente una membrana di nylon), in cui il campione, in soluzione acquosa, viene "assorbito" dalla membrana.

La tecnica dell'ibridazione *Southern blot* consiste nel tagliare il DNA, separarlo mediante elettroforesi su gel e immergerlo in una soluzione alcalina per denaturarlo. Questi frammenti vengono trasferiti su una membrana carica positivamente alla quale aderiscono, creando una copia del gel, o blot, circa nella stessa posizione. Il DNA legato alla membrana viene poi incubato con una sonda a DNA che contiene una sequenza complementare ad uno dei frammenti. La procedura avverrà in condizioni in cui gli acidi nucleici si denaturano e rinaturano agevolmente. La sonda si ibriderà in modo forte solo con la sequenza complementare e la loro posizione verrà individuata facilmente grazie al DNA marcato.

Un altro metodo di ibridazione, detto *Northern blot*, in contrapposizione al precedente, viene usato solitamente per individuare un mRNA particolare in una popolazione di RNA.

2.5.2 Il sequenziamento del DNA

Il sequenziamento del DNA è un procedimento che permette di decifrare la sequenza delle basi azotate in una determinata porzione di DNA. Questa tecnica viene usata in ambiti molto diversi: dagli studi sulla genomica a quelli per fini medici, dall'identificazione di individui a utilizzi di tipo industriale.

Il sequenziamento è uno dei due grandi filoni per l'identificazione della successione delle diverse basi. Dall'altra parte invece troviamo il principio della bioaffinità, su cui si basano i biosensori, ovvero la capacità selettiva di alcune molecole di legare determinate specie chimiche.

Il principio che sottende tale metodologia è basato sulla separazione, per dimensioni, di gruppi interni di molecole di DNA. La tecnica attualmente usata è detta *di terminazione della catena*: il DNA viene copiato da uno stampo ad opera della DNA polimerasi, la quale utilizza 2'-deossinucleosidi trifosfati come substrati per la sintesi del DNA nel verso 5'→3'. I legami fosfodiesterici si formano tra il gruppo 3'-ossidrile all'estremità della catena polinucleotidica nascente con il fosfato α. Il metodo della terminazione della catena però fa uso di substrati speciali, i 2',-3' dideossiribonucleotidi (ddNTP), a cui manca il gruppo 3'-ossidrile sullo zucchero. Una volta incorporato un

ddNTP la catena non riesce più ad estendersi a causa della mancanza del gruppo 3'-ossidrilico.

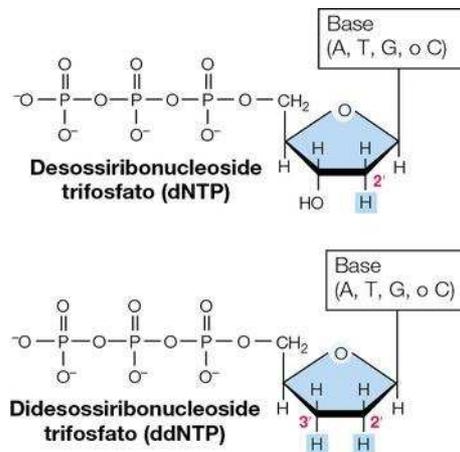


Figura 2.9 - rappresentazione del 2'-deossi NTP sopra e del 2'-3'-dideoossi NTP sotto

Supponiamo ora di introdurre nella miscela di substrati nucleotidici il substrato ddGTP, in un rapporto di una molecola di ddGTP ogni 100 di dGTP; questo porterà ad incorporare un substrato modificato ogni cento, quando la DNA polimerasi incontrerà una citosina sullo stampo. Dato che tutte le catene di DNA iniziano allo stesso punto, i nucleotidi che terminano la catena genereranno un gruppo di frammenti polinucleotidici interni, con l'estremità 5' in comune ma con terminazioni 3' diverse. La lunghezza dei frammenti quindi specifica la posizione delle C nel filamento. Se le porzioni di DNA sono state marcate ad una delle due estremità allora mediante l'elettroforesi su gel i frammenti del gruppo interno daranno una serie di bande, ciascuna delle quali rappresenta la posizione di una C nel filamento di stampo.

Analogamente, si introduce nelle diverse reazioni di sintesi ddCTP, ddATP, ddTTP in modo da produrre quattro gruppi di frammenti interni che, insieme, forniranno la sequenza completa del DNA. Per leggere la sequenza, i frammenti generati dalle quattro reazioni vengono frazionati su gel di poliacrilammide.

Un progresso tecnico molto importante è venuto dall'uso di nucleotidi fluorescenti che causano la terminazione della catena.

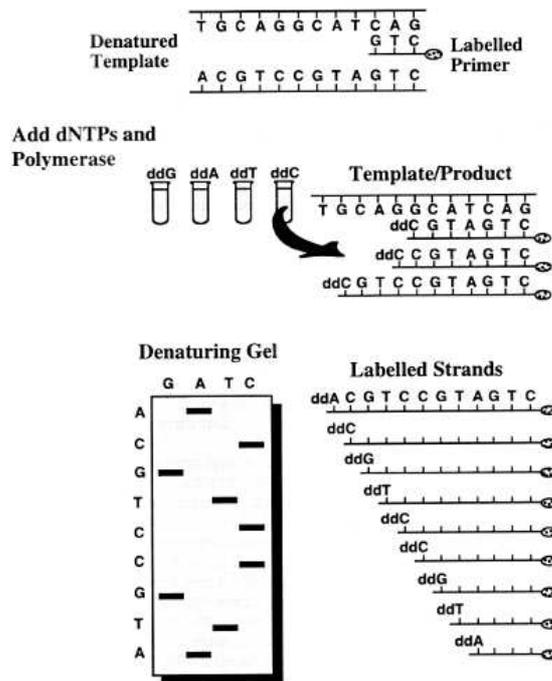


Figura 2.10 - sequenziamento del DNA con il metodo della terminazione della catena

2.5.3 La reazione a catena della polimerasi (PCR)

La reazione a catena della polimerasi (polymerase chain reaction o PCR) è un procedimento interamente biochimico, cioè *in vitro*, in grado di amplificare particolari frammenti di DNA.

Nel primo passaggio della PCR il DNA stampo viene denaturato mediante riscaldamento e ad esso si associano inneschi nucleotidici, che corrispondono all'estremità della sequenza di DNA da amplificare. La DNA polimerasi viene quindi usata per copiare lo stampo a singola elica, mediante estensione a partire dagli inneschi. Nel passaggio successivo, il DNA viene nuovamente denaturato, legato a degli inneschi ed utilizzato per un nuovo ciclo di sintesi di DNA. Si noti che nel secondo ciclo gli inneschi sono in grado di promuovere la sintesi sia dai nuovi filamenti di DNA che da quelli vecchi. Una volta completato il nuovo filamento la polimerasi si stacca; verrà, pertanto, sintetizzato del DNA che copre tutta la sequenza da amplificare. In seguito, ulteriori cicli di denaturazione, innesco e sintesi di DNA daranno origine a DNA che corrispondono all'intervallo di sequenza delimitato dagli inneschi. In tal modo, un frammento di DNA, presente in quantità irrisorie all'inizio, viene amplificato fino ad ottenere una quantità apprezzabile a doppia elica.

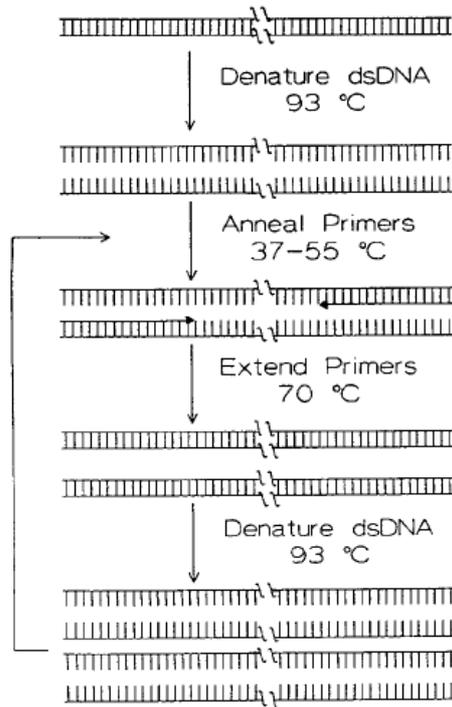


Figura 2.11 – Ciclo della reazione a catena della polimerasi [40]

3 Biosensori per l'analisi del DNA

Non appena ci si addentra nell'ambito della genetica, la prima e fondamentale esigenza è quella di riuscire a sequenziare il DNA in modo semplice, agevole, economico ed efficiente. La rivelazione del DNA può risultare molto utile sia nella diagnostica che nella valutazione del trattamento medico. La necessità di avere dispositivi di dimensioni contenute utilizzabili anche al di fuori di un laboratorio ha indotto lo sviluppo dei biosensori elettrochimici basati sull'ibridazione del DNA.

3.1 Biosensori

3.1.1 Definizione

Un *biosensore* può essere definito come *un dispositivo comprendente un elemento biologico sensibile connesso ad un trasduttore*. Il trasduttore converte un cambiamento osservabile, chimico o fisico, in un segnale misurabile, solitamente un segnale elettrico la cui intensità è proporzionale alla concentrazione di uno specifico elemento chimico o di un insieme di elementi. In questo modo vengono combinati la specificità e la selettività dei sistemi biologici con la misura precisa e quantitativa dei microprocessori [12].

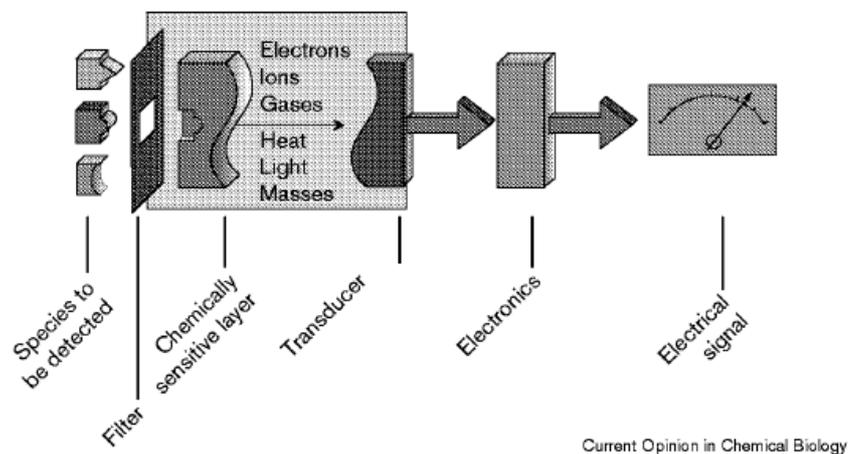


Figura 3.1- schema generale di un biosensore

3.1.2 Elementi principali

Ogni biosensore è caratterizzato da particolari elementi in grado di ottimizzare il dispositivo in base alla specifica molecola bersaglio da rilevare. Possiamo distinguere il substrato, il componente biologico, i metodi di immobilizzazione e il trasduttore.

Il substrato è una parte del biosensore in grado di reagire con il componente biologico attraverso reazioni chimiche o fisiche che possono avvenire solo in presenza dello specifico target biologico da rilevare. Tipicamente il campione liquido da analizzare viene messo in contatto con il substrato, in modo da permettere la reazione di rilevazione. Le sostanze che possono fungere da substrato non sono necessariamente di tipo biologico e sono numerosissime.

Il componente biologico è di fondamentale importanza in quanto costituisce l'elemento che conferisce maggior selettività al sensore. Esso infatti interagisce con un solo e specifico elemento del substrato per mezzo di una reazione o rimanendovi attaccato. I quattro maggiori gruppi di elementi utili a questo scopo sono gli *enzimi*, gli *anticorpi*, gli *acidi nucleici* e i *recettori*. Gli acidi nucleici sono altamente selettivi grazie ai legami esclusivi tra le coppie di basi. Il processo di immobilizzazione sulla superficie attiva dell'elettrodo di lavoro del componente biologico prende il nome di *funzionalizzazione*.

Tabella 1 - Elenco delle più diffuse combinazioni componente biologico-target

COMPONENTE BIOLOGICO	TARGET
DNA	DNA
PNA ⁵	DNA
Enzima	Molecola
Anticorpo	Antigene
Recettore	Anticorpo
Membrana lipidica	Gas

I metodi di immobilizzazione permettono di connettere il componente biologico con il trasduttore; i più importanti sono i seguenti:

- a. il più semplice, ma anche il più soggetto a disturbi o imprecisioni, è l'*adsorbimento* ad una superficie. L'adsorbimento di tipo fisico si basa sulla

⁵ L'acido peptidonucleico (o PNA) è un polimero organico simile al DNA e all'RNA ma differente nella struttura dello "scheletro". Esso non è presente in natura ma viene chimicamente sintetizzato artificialmente in ambito biologico e medico.

combinazione di interazioni di Van der Waals, ponti a idrogeno, forze ioniche per attaccare il biomateriale alla superficie del sensore, mentre quello chimico sfrutta legami covalenti [13];

- b. uno dei primi metodi è stato il *microincapsulamento*, ovvero l'intrappolamento tra due membrane, permettendo uno stretto contatto tra il biomateriale e il trasduttore. Esso è stabile ai cambiamenti di temperatura, pH, forza ionica e composizione chimica;
- c. l'*intrappolamento* consiste nel racchiudere il componente biologico, mescolato con una soluzione, in un gel polimerico. Purtroppo, questo può causare delle barriere alla diffusione del substrato, rallentando così la reazione;
- d. la stabilizzazione causata dai *legami covalenti* tra il biomateriale e il trasduttore, consolidando buoni contatti elettrici per il trasferimento della carica. Questo metodo permette di aumentare notevolmente la durata dell'immobilizzazione;
- e. il *cross-linking* agisce grazie ad un elemento bifunzionale in grado di legare sia con il componente biologico che con il supporto (la membrana o il trasduttore). Tuttavia i reagenti bifunzionali possono limitare le diffusioni o danneggiare il biomateriale.

Il trasduttore, come spiegato prima, ha il compito di determinare se la reazione è avvenuta o meno e, in tal caso, di tradurre ciò in un segnale misurabile. In base al meccanismo utilizzato si possono distinguere e raggruppare diversi tipi di trasduttori.

- *Trasduttori elettrochimici*. Si suddividono a loro volta in:
 - *potenziometrici*: coinvolgono la misura del potenziale della cella a corrente nulla. Il potenziale sarà proporzionale al logaritmo della concentrazione della sostanza da determinare;

- *voltammetrici (amperometrici)*: viene applicato un aumento (diminuzione) di potenziale alla cella elettrochimica, fino a che non si osserva una ossidazione (riduzione) della sostanza da analizzare. Questo provoca un picco nella corrente della cella elettrochimica, la cui altezza sarà proporzionale alla concentrazione del materiale elettroattivo;
 - *di conduzione*: la conduttività e la concentrazione di una sostanza contenente ioni vengono misurate in relazione al tipo di reazione che avviene.
- *Trasduttori ottici*. Si sono sviluppati maggiormente in seguito all'introduzione delle fibre ottiche. Le principali tecniche usate sono la spettroscopia di assorbimento, di fluorescenza, di luminescenza, di riflessione interna e l' SPR (surface plasmon resonance) [14].
 - *Dispositivi piezoelettrici*. Essi si basano sulla generazione di una corrente elettrica in seguito alle vibrazioni di un cristallo. La frequenza di vibrazione dipende dalla massa di materiale assorbito dalla superficie, la quale è in relazione a una reazione biochimica.
 - *Trasduttori termici*. L'idea che li supporta consiste nella misura del calore che viene prodotto o assorbito dalla reazione chimica o biochimica attraverso opportuni sensori.

3.1.3 Fattori di prestazione

La selettività è la caratteristica più importante di un biosensore [12], ovvero l'abilità di discriminare la molecola bersaglio da altre molecole simili e interferenti presenti nel campione biologico o nel substrato. Solitamente è una funzione del componente biologico ma talvolta il trasduttore aiuta ad aumentare la selettività del biosensore.

La sensibilità è la minima variazione di massa di componente biologico che può essere rivelata dal dispositivo. Normalmente dovrebbe essere inferiore alle millimoli.

Il limite di rilevazione è invece il limite inferiore di rivelazione, sotto il quale il sensore non è in grado di ottenere dei risultati validi.

L'accuratezza di un sistema di misura è il grado di vicinanza di una quantità al suo valore reale o di riferimento.

La precisione è il grado di convergenza a cui misurazioni ripetute sotto le stesse condizioni mostrano gli stessi risultati.

Le condizioni di misura indicano tutte le condizioni alle quali è stata effettuata la misura, come il pH, la temperatura, la forza ionica. Più difficoltà si incontra nella loro misurazione più il risultato ottenuto sarà considerato instabile.

Il tempo. Possiamo qui distinguere il *tempo di risposta*, tempo necessario al dispositivo per rispondere ad una sollecitazione, dovrà essere minore rispetto alle reazioni e alle possibili variazioni del sistema; il *tempo di recupero*, ovvero il tempo necessario affinché il biosensore sia pronto per analizzare il campione successivo; il *tempo di vita*, che è solitamente determinato dall'instabilità del materiale biologico.

3.2 Sensori elettrochimici di DNA

3.2.1 Principio di funzionamento

In questo Paragrafo verranno introdotti i biosensori elettrochimici per la rilevazione di specifiche sequenze di DNA. Come verrà descritto nel Paragrafo 4.2, questa tecnica di indagine si dimostra fondamentale nella diagnosi della Fibrosi Cistica.

Generalmente un biosensore per l'analisi del DNA si basa sull'immobilizzazione di un filamento singolo (single stranded) di oligonucleotidi (ssDNA), detto probe, sulla superficie di un trasduttore affinché venga riconosciuto il filamento complementare (target) attraverso l'ibridazione. Il doppio filamento formatosi è detto ibrido. Questo evento viene convertito in un segnale elettrico dal trasduttore.

In un biosensore a DNA il probe è solitamente un oligonucleotide (ODN) di circa 15-20 basi. Per la maggior parte i parametri di selettività, sensibilità e riproducibilità dipendono dalla modalità di immobilizzazione del filamento sonda (probe). Anche se l'immobilizzazione causerà una necessaria diminuzione della libertà dei filamenti, al

momento dell'ibridazione il probe e il target dovranno aver la possibilità di avvolgersi l'uno sull'altro. Un buon modo per mantenere alta l'efficienza dell'ibridazione è quello di scegliere come punto di attacco del filamento una delle due estremità libere (5' o 3'). Tuttavia incidono notevolmente nei fattori di prestazione anche altri elementi, come l'appropriata chimica di superficie o la densità di probe.

I vantaggi principali di una trasduzione elettrochimica sono un'alta sensibilità, l'indipendenza dalla torbidità della soluzione, la compatibilità con la microfabbricazione, i bassi costi, le richieste di una potenza limitata e una strumentazione semplice, compatibile con dispositivi piccoli e portatili [15][16][17][18][19]. Tuttavia, i biosensori elettrochimici in commercio presentano qualche difficoltà nei confronti della scarsa stabilità delle biomolecole. La maggior parte di esse va conservata a bassa temperatura e spesso sono necessarie operazioni preliminari complesse, come la preparazione di soluzioni o miscele, diluizioni o pretrattamenti chimici, e infine immobilizzazioni sul sensore, che richiedono un operatore specializzato [51].

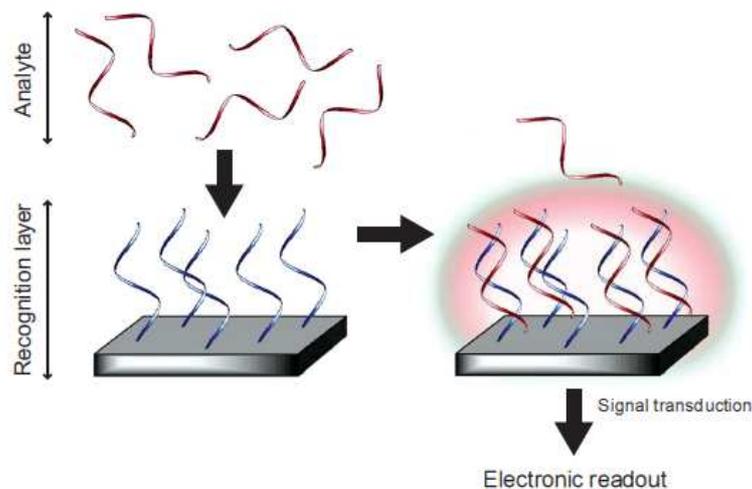


Figura 3.2 - schema di un generico biosensore per il DNA. Il DNA target viene catturato e il risultante segnale di ibridazione viene tradotto in un segnale elettrico [18]

3.2.2 Tipologie di dispositivi

Le numerose ricerche nel campo dei biosensori elettrochimici hanno permesso di ottimizzare sempre più i dispositivi consentendone anche la creazione di svariate tipologie che si differenziano per le tecniche utilizzate, le reazioni che coinvolgono,

l'utilizzo di marcatori (label) o meno o di altre molecole. In questo capitolo la prima distinzione che verrà operata sarà proprio tra i dispositivi cosiddetti *labeled-based* o quelli *label-free*.

3.2.2.1 Rivelazione dell'ibridazione di tipo labeled-based

3.2.2.1.1 Molecole redox come etichette (labels)

Lo schema generale di un dispositivo che si basa su reazioni di ossidoriduzione per la rivelazione dell'ibridazione consiste nell'immersione di un elettrodo ibrido modificato in una soluzione contenente una molecola redox⁶ in grado di legarsi al doppio filamento. Dopo un periodo di tempo necessario per l'interazione tra il DNA e la molecola, vengono applicate determinate tecniche elettrochimiche in grado di misurare diversi parametri. Se la molecola ossido-riduttiva è un interferente, esso sarà interposto tra i due filamenti, allora si osserverà un innalzamento nel segnale di ossidoriduzione. In caso contrario, se la molecola avesse affinità solo verso l'ssDNA allora noteremmo un segnale più elevato solo nella misura del probe. Questi cambiamenti nei picchi della corrente tra ssDNA e dsDNA (double strand) sono il principio su cui si basa la rilevazione labeled-based dell'ibridazione.

⁶ Con il termine redox (composto dall'inglese **re**duction, riduzione, e **ox**ide, ossidazione), o ossidoriduzione, si intendono tutte le reazioni chimiche in cui cambia il numero di ossidazione degli atomi, ovvero dove abbiamo uno scambio di elettroni.

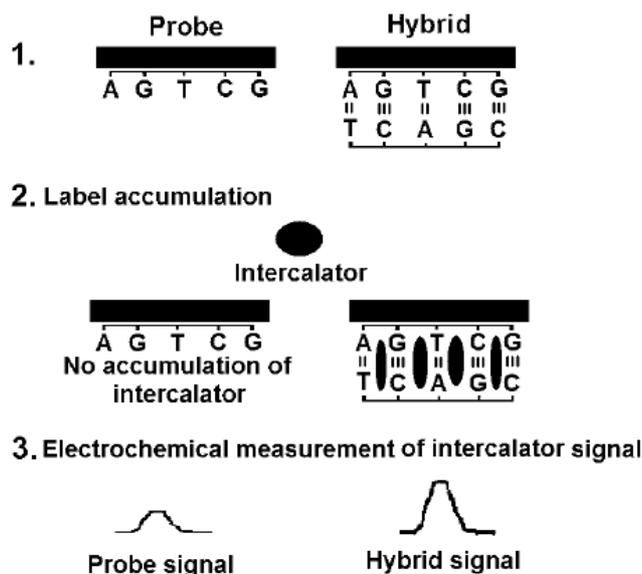


Figura 3.3 - schema della rivelazione labeled-based del DNA [15]

La potenza di questo approccio è la sua semplicità; malgrado questo, sono stati raggiunti eccellenti livelli di specificità e di limite di rilevazione.

Questa tecnica fa uso di diversi tipi di metalli, agenti anticancro e coloranti organici come etichette per la rivelazione.

Il primo esempio, realizzato da Mikkelsen e dai suoi collaboratori [20 – 22], prevede l'adsorbimento dell'ssDNA su un elettrodo di carbonio vitreo, l'esposizione del probe ad una soluzione di interesse ed infine l'introduzione della fenilalanina di cobalto come indicatore redox. Dato che quest'ultimo ha un'enorme affinità con il dsDNA si può notare una maggiore risposta elettrochimica in caso di avvenuta ibridazione, se confrontata con quella del singolo filamento.

Basati su tale principio vennero creati in seguito diversi biosensori per la diagnosi in ambito medico, per esempio per la rivelazione del virus dell'epatite B (HBV) o per una rapida analisi della carenza eterozigote riguardo al gene umano della lipoproteina lipasi (LPL).

Recenti studi hanno evidenziato anche l'efficienza derivante dall'utilizzo di blu dimetilene come marcatore redox, grazie alla sua elevata affinità con la basi di guanina esposte. L'ibridazione però limita l'interazione tra la guanina e il blu dimetilene, così una diminuzione del segnale elettrochimico è indice di ibridazione.

Un ulteriore metodo di rivelazione fa uso di un “saggio sandwich” che comprende nel dispositivo tre elementi: il probe di cattura, il target e il probe di segnalazione. Quest’ultimo viene contrassegnato con del ferrocene in modo da poter etichettare il target dopo l’ibridazione. Gli elettroni migrano verso la superficie dell’elettrodo solo quando è presente il target ed è ibridizzato ad entrambi i filamenti stampo. Il chip che realizza ciò è chiamato eSensorTM, è prodotto dalla Motorola e ha una percentuale di rivelazione corretta dell’86% dell’HPV⁷ contenuto nei campioni clinici [15].

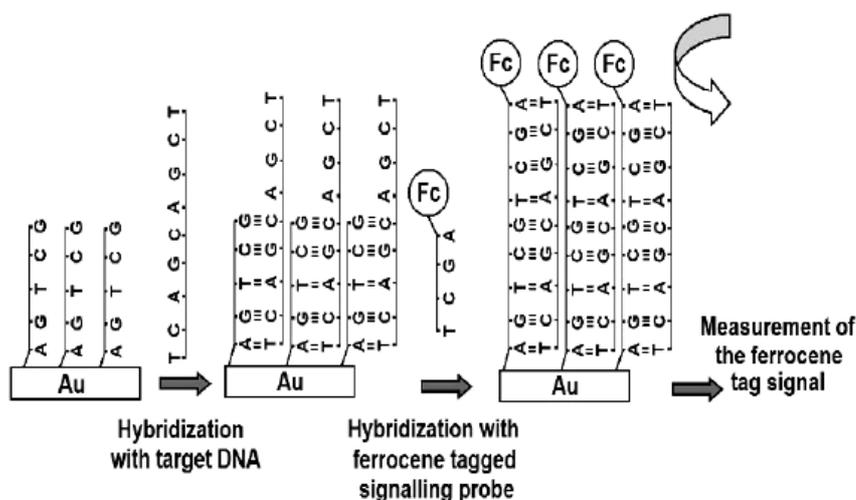


Figura 3.4 - principio di funzionamento dell'eSensorTM DNA chip [15]

3.2.2.1.2 Enzimi come etichette

Un secondo principio sfruttato per etichettare i probe è quello di usare degli enzimi come labels. Quando il substrato viene introdotto nella superficie modificata dell’elettrodo, l’attività elettrochimica del prodotto semplifica notevolmente la rivelazione dell’ibridazione del DNA.

Un esempio può essere il progetto realizzato da Heller e i suoi colleghi [23, 24]: esso fa uso di un idrogel di poliaccrilammide di tipo redox e in grado di condurre elettroni su un elettrodo di carbonio. Il target viene etichettato con un enzima perossidasi⁸, il quale, al momento dell’ibridazione riduce l’H₂O₂ aggiunto ed esso stesso si ossida. L’idrogel a tal punto riporta l’enzima alla sua forma cataliticamente attiva producendo così una

⁷ L’HPV, o Virus del Papilloma Umano, è un virus del gruppo dei Papillomavirus e le sue infezioni sono molto diffuse e possono causare malattie della pelle o delle mucose.

⁸ Grande famiglia di enzimi che catalizzano determinate reazioni.

corrente che può essere rivelata. Svolgere inoltre il procedimento ad elevate temperature permette di individuare anche i singoli disaccoppiamenti.

È stato dimostrato che la strategia di legare un enzima al filamento target del DNA seguita dalla trasduzione elettrochimica ha successo anche utilizzando la fosfatasi alcalina come enzima. In questa tecnica inoltre viene introdotto un magnete in grado di separare il target ibridizzato dal campione libero nella soluzione in modo da aumentare la selettività del dispositivo.

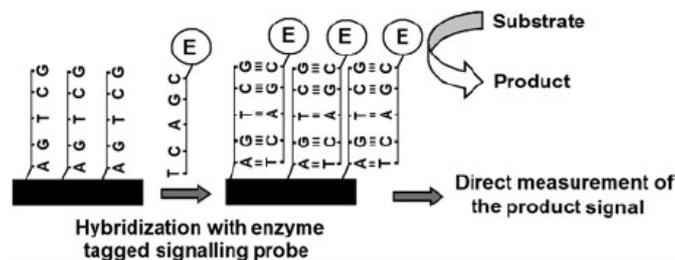


Figura 3.5 - Rivelazione elettrochimica del DNA facendo uso di enzimi come etichette [15]

3.2.2.1.3 Biosensori per il DNA coniugati alla nanotecnologia

Possiamo notare il primo esempio di nanotecnologia in questo campo nelle nanoparticelle di metallo usate come label per la rivelazione del DNA. Si distinguono tre differenti strategie: l'osservazione diretta del segnale elettrochimico intrinseco dallo stesso elettrodo, una volta avvenuta l'ibridazione [48], la misura del segnale elettrico su un ulteriore elettrodo vuoto in seguito alla dissoluzione del metallo usato per contrassegnare la molecola attraverso un trattamento acido [49] e, infine, il rivestimento delle nanoparticelle d'oro con uno strato d'argento in modo da aumentare il segnale elettrochimico dell'oro [50].

Le diverse nanoparticelle inoltre possono essere sfruttate, insieme agli enzimi, come etichette per filamenti probe aventi diverse sequenze di basi. Il punto chiave in questo protocollo sta nel riuscire a non far sovrapporre i segnali dei diversi labels l'un l'altro, pena il fallimento dell'esperimento.

3.2.2.2 Rivelazione dell'ibridazione di tipo label-free

Uno dei maggiori svantaggi dei dispositivi discussi finora è la necessità di un indicatore per poter trasdurre l'evento dell'ibridazione. Per questa ragione sono iniziati diversi studi con lo scopo di sviluppare metodi che non facciano uso di alcuna etichetta, quindi detti "label-free".

3.2.2.2.1 La carica elettrica fluisce attraverso il DNA

Intensi dibattiti si sono succeduti sulla questione se il DNA è in grado o meno di condurre la carica elettrica. Inizialmente esperimenti diversi hanno portato a conclusioni contraddittorie. La conducibilità del DNA è stata valutata dal trasferimento di elettroni come una funzione della distanza tra il donatore e l'accettore. Infine però il DNA ha iniziato ad essere considerato un trasportatore di corrente elettrica efficiente quanto un semiconduttore [15].

Esiste quindi un approccio che sfrutta la capacità del dsDNA di agire come un conduttore per spingere elettroni per lunghe distanze con una minima diminuzione del tasso di elettroni trasferiti. Questo trasferimento dipende dalla formazione della cosiddetta "π-way" quando si forma il doppio filamento di DNA; al contrario l'ssDNA non permette un proficuo trasporto di elettroni per lunghe distanze. La differenza nella quantità di elettroni trasferiti rispettivamente dal singolo e dal doppio filamento risulta un parametro molto utile per capire non solo se l'ibridazione è avvenuta o meno ma, più nello specifico, se c'è stato un accoppiamento perfetto tra tutte le basi o se si è verificato qualche *polimorfismo a singolo nucleotide (single nucleotide polymorphism o SNP)*⁹. Una volta avvenuta l'ibridazione con il target, l'elettrodo viene esposto ad una soluzione contenente un elemento in grado di intercalarsi tra le basi della molecola ibrida e viene poi applicata una corrente al dsDNA. Solamente se la corrispondenza tra le basi è totale la carica raggiungerà l'elemento prima interposto, altrimenti la presenza anche di un solo SNP bloccherà la migrazione di elettroni.

⁹ Con polimorfismo a singolo nucleotide si intende un disaccoppiamento tra due basi.

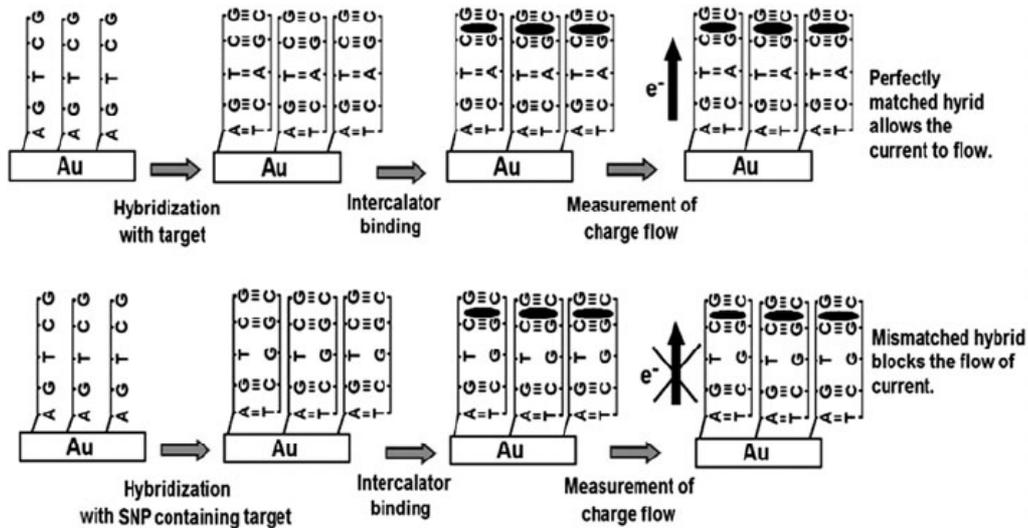


Figura 3.6 - rivelazione della sequenza di nucleotidi del DNA mediante trasferimento di corrente.

Nella sequenza superiore l'accoppiamento tra le basi è perfetto, permettendo il completo trasferimento della carica; nella sequenza inferiore gli elettroni sono bloccati da un polimorfismo a singolo nucleotide [15]

Un nuovo metodo per la rivelazione di tipo label-free è stato recentemente riportato da Goodling e i suoi collaboratori [43]. Il cambiamento della flessibilità di un singolo filamento del probe prima e dopo l'ibridazione causa un effetto di "fuga di ioni", dove la rigida struttura astiforme della doppia elica apre l'elettrodo d'oro all'accesso degli ioni.

3.2.2.2 Segnali intrinseci

La guanina e l'adenina sono le basi più elettroattive del DNA perché possono essere facilmente adsorbite e ossidate sugli elettrodi di carbonio. Monitorando i cambiamenti di questi segnali dopo la formazione della doppia elica è possibile capire se c'è stata o meno ibridazione. I segnali ottenuti dalle basi di adenina e guanina libere decrementa legandole alle loro basi complementari.

L'uso di un probe in cui la guanina è sostituita dalla inosina¹⁰ e la comparsa del segnale dell'ossidazione della guanina al momento dell'ossidazione ha permesso di determinare un nuovo metodo di rivelazione. In questo modo viene eliminato l'utilizzo di etichette esterne e accorciato il tempo di attività. I probe modificati con la inosina per

¹⁰ La inosina è un nucleoside composto da una molecola di ribosio e una ipoxantina (base purinica), e non è elettroattiva, cioè non viene coinvolta nei sistemi che subiscono ossidazioni o riduzioni.

i biosensori vennero applicati su elettrodi di ossido di indio e stagno da Thorp. Jelen mostrò invece che concentrazioni subnanomolari di DNA senza label possono essere determinate usando elettrodi di rame o *elettrodi a gocce pendenti di mercurio*¹¹ in presenza di ioni di rame.

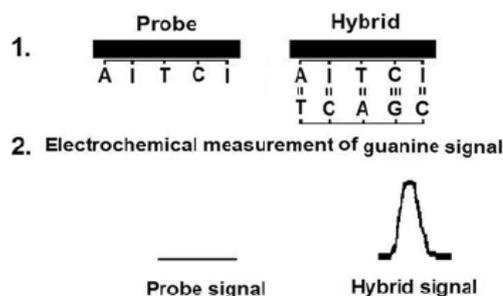


Figura 3.7 - Rivelazione label-free. Il probe in cui la guanina (G) è sostituita dalla inosina (I) mostra un segnale elettrochimico piatto, dato che la inosina non è elettroattiva. Dopo l'ibridazione con il target, la comparsa del segnale di ossidazione della guanina permette una rivelazione specifica [15]

Migliorie sui controlli della tossicità delle acque reflue sono stati introdotti grazie all'introduzione dei biosensori per il DNA [44]; questi venivano assemblati immobilizzando un doppio filamento di DNA sulla superficie di un elettrodo di carbonio monouso. Il segnale di ossidazione della guanina veniva usato come segnale analitico. La presenza di composti aventi affinità con il DNA veniva misurata dal loro effetto sull'ossidazione della guanina. Un confronto dei risultati con un test sulla tossicità basato sulla luminescenza dei batteri ha confermato l'applicabilità del metodo a campioni reali.

3.2.2.2.3 Impedenza elettrochimica

L'ibridazione dei due filamenti di DNA sulla superficie della struttura induce una variazione nella tensione di banda piatta¹² del semiconduttore portando ad avere uno spostamento della curva di impedenza lungo l'asse del potenziale. In questo modo sarà sufficiente monitorare l'impedenza per rivelare l'ibridazione, senza l'uso di etichette nel probe.

¹¹ L'elettrodo a goccia pendente di mercurio, o HDME, dall'inglese Hanging Mercury Drop Electrode, è un elettrodo di lavoro, cioè l'elettrodo in cui avviene la reazione di interesse, viene usata una goccia di mercurio e durante la misura l'area superficiale di lavoro rimane costante.

¹² La condizione di banda piatta si verifica quando il potenziale superficiale si annulla (carica nulla e quindi differenza di potenziale nulla nella struttura).

Un esempio può essere la tecnica ideata da Patolsky [25]: l'accumulo di un prodotto insolubile su elettrodi d'oro o cristalli d'oro o di quarzo cambiano la resistenza di trasferimento di elettroni alla superficie dell'elettrodo o alla massa associata al cristallo piezoelettrico¹³, permettendo così la trasduzione dell'ibridazione del DNA con la spettroscopia d'impedenza o con le misure di una microbilancia microgravimetrica ai quarzi di cristallo, rispettivamente.

L'uso della spettroscopia d'impedenza elettrochimica e di un polimero conduttivo, il polipirrolo¹⁴, come sistema integrato di ricognizione e trasduzione per biosensori privi di reagenti, è stato sfruttato per realizzare un dispositivo in grado di rivelare l'ibridazione del DNA e di distinguere l'ssDNA dal dsDNA per merito dell'interazione del DNA con il polipirrolo [41].

¹³ La piezoelettricità è la proprietà di alcuni cristalli di generare una differenza di potenziale in seguito ad una deformazione meccanica ed è un effetto reversibile.

¹⁴ Il polipirrolo è una lunga catena di anelli di pirrolo, composto aromatico eterociclico con formula C₄H₅N.

4 Diagnosi prenatale della Fibrosi Cistica

4.1 Indagini prenatali

Dal momento che la Fibrosi Cistica è una malattia genetica per la quale le cure terapeutiche sono tuttora inefficaci, la prevenzione è solitamente la sola strada percorribile [26].

Il gene responsabile della FC è stato localizzato e collegato ad un polimorfismo del DNA nel 1985 [27], precisamente grazie alla *linkage analysis*, con un probe di un gene clonato, si è individuata la mutazione a metà del braccio lungo del cromosoma 7 [28].

La *linkage analysis* è un potente strumento per rilevare la posizione di un gene responsabile di qualche malattia in un cromosoma. Esso si basa sull'osservazione che i geni che risiedono fisicamente vicino al cromosoma rimangono collegati durante la meiosi. Con l'avvento di nuovi marcatori genetici e altri miglioramenti tecnologici, la mappatura genetica può essere realizzata molto velocemente. Non appena viene stabilita la posizione per un fenotipo della malattia, la *linkage analysis* determina se quel fenotipo sia causato solo dalla mutazione in un singolo gene o se le mutazioni in altri geni possono contribuire. Oltre all'identificazione dei geni questa tecnica aiuta anche la diagnosi prenatale. Tuttavia la diagnosi con i marcatori richiede l'analisi di campioni di diversi membri della famiglia [29].

La *misurazione degli enzimi dei microvilli*¹⁵, la gamma glutamiltranspeptidasi (GGTP), l'aminopeptidasi M (APM) e la fosfatasi alcalina (ALP), che stanno sulla superficie del fluido amniotico è stata proposta come ulteriore metodo per una precoce diagnosi prenatale di Fibrosi Cistica [30]. L'attività di questi enzimi viene solitamente analizzata tra la 15^a e la 20^a settimana di gestazione e una significativa diminuzione della loro attività è indice della presenza della malattia [31]. Tuttavia, si verificano dei casi di falsi positivi (1.4%) e falsi negativi (2.2%) per ogni enzima. Per ottenere un'ottima discriminazione diagnostica, i valori dei tre enzimi vengono combinati per ottenere un

¹⁵ I microvilli sono delle estroflessioni della membrana plasmatica con la funzione di aumentare la superficie di scambio.

risponso più accurato. Dai casi studiati si deduce che questo metodo possa garantire una corretta previsione circa nel 96.5% del 25% delle gravidanze a rischio [32].

Una tecnica di diagnosi applicabile nel primo trimestre di gravidanza invece è la *villocentesi*, in cui il DNA del feto viene ibridizzato con due probe di DNA clonato strettamente collegato con la Fibrosi Cistica. Nonostante la grande accuratezza garantita, gli svantaggi sono diversi, per esempio la necessità di un campione di sangue da un figlio affetto di riferimento o le probabilità non nulle di casi falsi positivi (6%) e falsi negativi (2%) in famiglie aventi già un figlio malato [28].

Il *linkage disequilibrium* (LD) è un importante strumento che permette di individuare regioni di limitata ampiezza in cui risiedono i geni responsabili delle malattie; fa uso dell'analisi molecolare delle variazioni alleliche (come gli SNP) che compongono gli aplotipi¹⁶. Il primo gene mappato con questa metodologia è proprio quello della Fibrosi Cistica [33].

La disponibilità di un rilevazione diretta delle mutazioni che causano la malattia segna una nuova era per la prevenzione e la consultazione riguardo la FC [34]. *L'analisi delle mutazioni* ha un effetto immediato nei programmi che offrono consulenza genetica, rilevazione di eterozigoti e diagnosi prenatale per famiglie con una storia di FC ed è molto utile nel caso di circostanze cliniche difficili. Inoltre, contrariamente ai metodi prima descritti, questo test può essere applicato anche ai coniugi per una diagnosi più precisa. In questo modo sembra fattibile anche considerare la possibilità di uno screening per tutta la popolazione eterozigote.

L'amplificazione del gene tramite la reazione a catena della polimerasi (polymerase chain reaction o PCR) è stata applicata alla diagnosi prenatale di diverse malattie genetiche, come la FC. I campioni ottenuti con la villocentesi alla 10^a settimana di gravidanza vengono analizzati in parallelo alla convenzionale mappatura genica. La diretta diagnosi della mutazione $\Delta F508$ è realizzata con l'ibridazione del materiale amplificato con coppie di probe di oligonucleotidi allele-specifici (ASO). La PCR riduce il tempo richiesto per la diagnosi ma la contaminazione del DNA può essere una potenziale fonte di errori [35].

¹⁶ Gli aplotipi sono particolari combinazioni di varianti alleliche in una regione del gene che vengono ereditati insieme.

La PCR è stata utilizzata anche per lo sviluppo di una tecnica innovativa e non invasiva per la determinazione di certe caratteristiche mediche del feto o malattie genetiche, tra cui la Fibrosi Cistica. La scoperta della presenza del DNA del feto all'interno del siero e del plasma materno [36] ha aperto la strada alla rilevazione del DNA attraverso la PCR senza alcun rischio per il feto. Il DNA ricavato dal plasma usato per la PCR è un fattore limitante a causa della scarsità di DNA fetale nella totale quantità di DNA presente nel plasma materno. A causa della presenza del DNA della madre, è possibile solo rilevare se il feto sia o meno portatore della mutazione paterna. I vantaggi di questo metodo sono la fattibilità, la rapidità dell'esecuzione e i bassi costi. Nuove tecnologie, come la PCR fluorescente e la PCR in tempo reale, stanno aumentando la sensibilità della rivelazione del DNA fetale e ulteriori studi sono essenziali per eliminare l'interferenza del DNA materno [37].

4.2 Biosensori elettrochimici per la diagnosi

Si vedranno ora degli esempi concreti di biosensori utilizzati per diagnosticare la presenza della mutazione genetica che contraddistingue la Fibrosi Cistica.

4.2.1 Biosensore voltammetrico per il DNA

Uno dei primi biosensori per la diagnosi della Fibrosi Cistica fu realizzato nei primi anni Novanta e prevede delle misure di tipo voltammetrico¹⁷ [21].

Le prime ricerche per un biosensore selettivo nei confronti di una precisa sequenza comprendevano un probe immobilizzato con legami covalenti sulla superficie di un sensore amperometrico [22]. L'ibridazione del probe immobilizzato con il suo complementare produce una doppia elica immobilizzata e facilmente rilevabile con molecole redox. Il risultato osservabile è un picco di corrente molto più elevato rispetto al caso del singolo filamento.

Questo sensore fa uso di un elettrodo in cui una miscela di grafite o oli minerali di pasta di carbonio è modificato con degli additivi, come l'ottadecilammina o l'acido stearico, per offrire i gruppi funzionali necessari per formare legami covalenti con il DNA.

¹⁷ La voltammetria è una categoria di metodi elettroanalitici che permettono di ricavare diverse informazioni sul substrato misurando la corrente al variare del potenziale.

In presenza di uno specifico reagente, il gruppo amminico primario dell'ottadecilammina forma un legame con il gruppo fosfato del terminale 5' del DNA, mentre grazie ad ulteriori reagenti il DNA riesce ad agganciarsi all'elettrodo contenente l'acido stearico. Affinché avvenga l'ibridazione il sensore viene immerso in una soluzione contenente diverse sostanze chimiche e successivamente viene aggiunta un'altra soluzione contenente la sequenza complementare al DNA immobilizzato. Infine viene applicata la voltammetria ciclica¹⁸ in una cella standard di tre elettrodi ad una temperatura di circa 25 °C.

L'elettrodo contenente l'ottadecilammina venne presto scartato per la sua scarsa efficienza; d'altra parte si arrivò alla concentrazione ottima di 4.5% di acido stearico nel materiale dell'elettrodo, arrivando ad un picco di corrente di 60 µA a 50 mV/s¹⁹. La concentrazione ottimale di DNA in una soluzione di deossiguanosina (dG)²⁰ e deossicitidina (dC) è di 10 µg/mL.

Il sensore per la mutazione ΔF508 e per la corrispondente sequenza normale sono stati costruiti usando dei probe di 18 basi ciascuno immobilizzati attraverso la deossiguanosina che era stata aggiunta enzimaticamente al terminale 3' del probe. I quattro oligonucleotidi usati come probe sono i seguenti: 5'-GAA-ACA-CCA-ATG-ATA-TTT-3' (ΔF508 probe), 5'-GAA-ACA-CCA-AAG-ATG-ATA-3' (probe normale), 5'-AAA-TAT-CAT-TGG-TGT-TTC-3' (complementare al probe ΔF508), 5'-TAT-CAT-CTT-TGG-TGT-TTC-3' (complementare al probe normale).

4.2.2 Biosensori con limiti di rilevazione molto bassi

Una delle principali caratteristiche che si richiede ad un biosensore per il riconoscimento del DNA è quella di avere un limite di rilevazione il più piccolo possibile, in modo da poter utilizzare esigue quantità di target, garantendo allo stesso tempo una

¹⁸ La voltammetria ciclica o ciclovoltammetria è una tecnica che si basa sull'applicazione di un potenziale a forma di onda triangolare ad un elettrodo; il potenziale applicato all'elettrodo viene variato linearmente nel tempo e, una volta raggiunto un dato valore, l'andamento viene invertito.

¹⁹ Velocità di scansione durante la misura elettrochimica.

²⁰ La deossiguanosina è un composto simile alla guanosina, il nucleoside corrispondente alla guanina, in cui è stato eliminato un gruppo -OH in posizione 2' della molecola di zucchero.

rivelazione corretta e attendibile. Ecco tre esempi di biosensori elettrochimici che richiedono quantità di DNA dell'ordine delle attomoli (10^{-18} moli).

4.2.2.1 Trasduzione basata sulla chemiluminescenza

Questo dispositivo [45] permette una reazione di ibridazione selettiva in una soluzione omogenea, dove può avvenire in modo più veloce rispetto ai sistemi in cui un probe è immobilizzato. Vengono utilizzati due probe di DNA ed entrambi sono etichettati al terminale 5', uno con la biotina, il reagente di cattura per la successiva immobilizzazione, e l'altro con un chelato del rutenio (molecole fluorescenti che si legano alle proteine). Dopo l'amplificazione con la PCR, i filamenti vengono catturati dalle microsfere magnetiche coperte di streptavidina. Il cuore del biosensore è una cella amperometrica, dove un braccio magnetico si muove in una posizione direttamente dietro l'elettrodo di lavoro²¹ per catturare e trattenere le microsfere magnetiche sulla superficie dell'elettrodo. Le microsfere vengono esaminate in presenza del chelato di rutenio, il quale emette luce quando viene ossidato. In base all'intensità della luce si può dedurre la quantità di prodotto della PCR che si è rivelato necessario. Un miglioramento nel limite di rilevazione (10 amol) dei probe più corti (110 basi) è dovuto alla grande efficienza di legame delle microsfere con i frammenti corti [40].

4.2.2.2 Trasduzione con sensore potenziometrico

Vengono riportati due biosensori: uno in grado di determinare la quantità totale di DNA [46], mentre il secondo rivela una precisa sequenza di nucleotidi del prodotto della PCR [47]. Entrambi si basano sulla cattura di specie biotinilate su membrane coperte di streptavidina e sulla rivelazione di un locale cambiamento del pH²² prodotto da un enzima-label.

Il primo sensore potenziometrico ad attivazione luminosa (light-addressable potentiometric sensor, o LAPS) è composto da un piatto di silicio drogato, coperto con uno strato isolante di nitrato di silicio, opportunamente illuminato da un LED (light-

²¹ L'elettrodo di lavoro è il sistema elettrochimico sul quale avviene la reazione considerata, è quindi il dispositivo direttamente interessato alla misura.

²² Il pH è una scala di misura dell'acidità o basicità di una soluzione.

emitting diode), con un duty cycle del 50%. Quando la superficie è illuminata, il semiconduttore (silicio drogato) assorbe l'energia e genera delle coppie elettrone-lacune e, così, una fotocorrente alternata. L'intensità della corrente è in relazione con il potenziale della superficie dell'elettrodo, che è controllato dal pH della soluzione. Poiché l'idrolisi dell'urea produce un continuo cambiamento di pH, i risultati sono espressi come variazione del potenziale nel tempo.

Nel secondo dispositivo vengono usate due proteine altamente affini al DNA per costruire il saggio sandwich. Un singolo filamento di DNA che lega una proteina (SSB) è accoppiato con una molecola di collegamento, la biotina. Un anticorpo monoclonale²³ anti-DNA accoppiato ad un enzima, l'ureasi, per la generazione del segnale. Per la rilevazione, il campione di DNA viene denaturato e poi incubato con un reagente contenente il DNA legato alla proteina e la streptavidina, proteina avente grande affinità con la biotina. Una volta formatosi il complesso di streptavidina—biotina—SSB—DNA—anti-DNA—ureasi, questo viene rivelato dal sensore potenziometrico che misura le variazioni di pH catalizzate dall'ureasi. In questo modo si possono rilevare 2 pg di DNA [42].

4.2.2.3 Trasduzione voltammetrica

I primi metodi elettrochimici si basano sul principio di funzionamento descritto precedentemente nel paragrafo 4.2.1; nel corso degli anni però sono state apportate diverse migliorie per ottimizzarne il limite di rilevazione.

Hashimoto et al. [42], per esempio, hanno etichettato un filamento probe sintetico di DNA con un gruppo terminale di tiolo, permettendo così l'adsorbimento chimico su una superficie d'oro. La rilevazione del DNA immobilizzato avviene grazie alla voltammetria a scansione lineare, in seguito all'esposizione ad una soluzione contenente una molecola redox attiva colorante e in grado di intercalarsi nel DNA. Il colorante interagisce in modo abbastanza forte con il DNA immobilizzato, tanto che i segnali sono molto più piccoli prima dell'ibridazione. Così è stato riportato un limite di rilevazione di 10^{-13} g/mL per una sequenza di target lunga 4200 basi.

²³ Gli anticorpi monoclonali sono derivanti da cloni di una stessa cellula; sono estremamente specifici nel legare una determinata sequenza.

4.2.3 Sensore basato su nanoparticelle d'oro

Un nuovo approccio basato sulle nanoparticelle d'oro e sul "saggio sandwich" è stato presentato nel 2006 da Castaneda e i suoi collaboratori [38].

Il sistema di elettrodi consiste di un elettrodo di platino come elettrodo ausiliario²⁴, uno di argento/cloruro d'argento come elettrodo di riferimento²⁵ e infine come elettrodo di lavoro uno di grafite magnetica. Le sequenze che sono coinvolte nell'ibridazione sono le seguenti

- DNA probe di cattura modificato con la biotina (CF-A): 5'TGC-TGC-TAT-ATA-TAT-biotin-3'
- DNA probe di segnalazione modificato con la biotina (CF-B): Biotin-5'GAG-AGT-CGT-CGT-CGT3'
- DNA target (CF-T): 5'ATA-TAT-ATA-GCA-GCA-GCA-GCA-GCA-GCA-GAC-GAC-GAC-GAC-TCT-C3'.

I passi del procedimento consistono nel preparare delle microsfere magnetiche (magnetic beads o MB) coperte di streptavidina, (Fig. 4.1A); immobilizzare il DNA probe di cattura (CF-A) nelle microsfere magnetiche (Fig. 4.1B); aggiungere la quantità desiderata di CF-T nella soluzione affinché possa avvenire la prima ibridazione (Fig. 4.1C); unire poi la quantità desiderata di CF-B per la seconda ibridazione (Fig. 4.1D); aggiungere infine al sistema contenente il complesso MB/CF-A/CF-B/CF-T la dose desiderata di particelle d'oro-streptavidina (Fig. 4.1E). A tal punto la soluzione viene messa a contatto con la superficie dell'elettrodo per poi ottenere una rivelazione elettrochimica con la voltammetria ad impulsi differenziali (DPV) (Fig. 4.1F). Questa tecnica di voltammetria induce l'applicazione di impulsi di potenziale fissi e costanti, di piccola ampiezza (tra 10 e 100 mV), che però sono sovrapposti ad un lento cambiamento della tensione di base.

²⁴ Nei sistemi a tre elettrodi, che comprendono anche un elettrodo di lavoro e uno di riferimento all'interno di una cella elettrochimica, l'elettrodo ausiliario ha il compito di far scorrere la corrente nella cella e non nell'elettrodo di riferimento.

²⁵ È l'elettrodo che stabilisce un determinato e stabile potenziale di elettrodo indipendente dalla corrente che scorre nella cella elettrochimica.

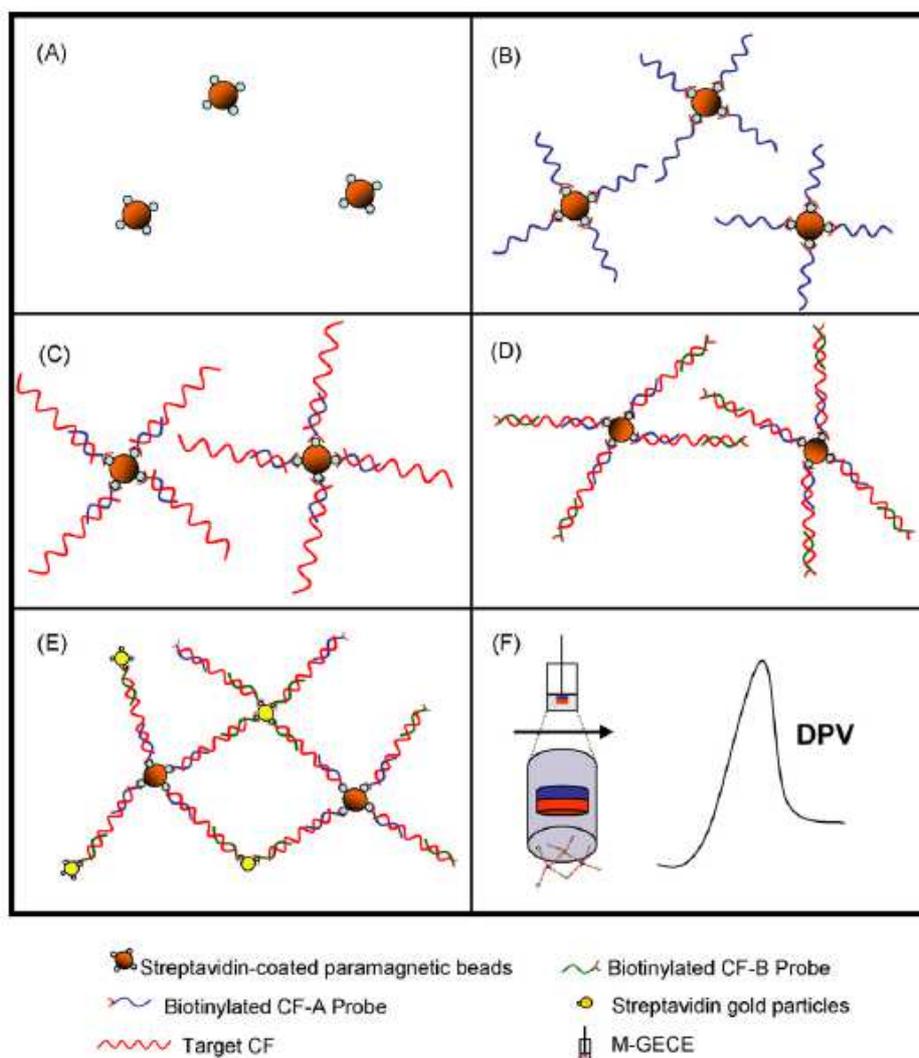


Figura 4.1 – Schematica rappresentazione del saggio sandwich

In questo studio è stata analizzata l'influenza della temperatura di ibridazione nell'intervallo da 25 a 42 °C. Il massimo segnale è stato osservato a 25 °C e questa è diventata la temperatura ottimale per le operazioni finora descritte. La migliore quantità per tale esperimento è di 100 µg di MB; una dose molto importante per la sua influenza nell'immobilizzazione del CF-A che determinerà la sensibilità e la riproducibilità del sensore.

In definitiva questo biosensore è semplice, sensibile quanto basta, ha un costo basso, un tempo di risposta veloce ed è potenzialmente utilizzabile per veloci screening medici.

4.2.4 Dispositivo label-free basato sulla spettroscopia d'impedenza

Uno dei più recenti sviluppi (2009) nel campo dei biosensori per la Fibrosi Cistica sfrutta la tecnica della spettroscopia d'impedenza elettrochimica (EIS) termicamente modulata senza l'utilizzo di etichette [39].

La spettroscopia d'impedenza è uno strumento potente per l'analisi dei fenomeni di superficie e i cambiamenti delle proprietà di bulk²⁶. I biosensori così costruiti sono dispositivi bioelettronici che fanno uso delle interazioni delle biomolecole con la superficie del trasduttore per poter trasformare in un segnale quantificabile la variazione delle proprietà elettriche. Anche la temperatura di fusione del doppio filamento è un parametro utilizzabile per modulare e controllare l'evento di ibridazione. La combinazione di queste metodologie permette la discriminazione del gene $\Delta F508$ della Fibrosi Cistica.

L'elettrodo di lavoro utilizzato è un disco d'oro, quello di riferimento è di argento o cloruro di argento e infine quello ausiliario un filo di platino. Dopo aver risciacquato gli elettrodi avviene l'immobilizzazione: come prima cosa viene adsorbito chimicamente un filamento di DNA probe contenente una molecola di tiolo, in seguito viene adsorbita una corta catena di alcantioli (costituiti da una catena alchilica, un gruppo di coda e uno di testa -SH), formando così un monostrato auto-assemblato (SAM)²⁷; segue infine l'introduzione di MCH (mercaptohexanol). L'MCH è uno *spacer*, sostanza in grado di legarsi al metallo dell'elettrodo nei siti in cui non c'è il tiolo in modo da rimuovere le sequenze di DNA non-correttamente adsorbite e conferire stabilità alla superficie. L'ibridazione avviene in seguito all'introduzione del target senza alcuna label e all'incubazione in una camera umida per un'ora. Le misurazioni EIS avvengono scorrendo le frequenze tra 0.1 e 10000 Hz con un'ampiezza di pulsazione di 5 mV e utilizzando lo ione ferrocianuro con marcatore redox. La voltammetria ad impulsi differenziali invece è realizzata immergendo il sistema in una soluzione contenente il blu dimetilene e altre sostanze chimiche adeguate per 5 minuti e analizzando poi la DPV.

²⁶ Le proprietà di bulk sono quelle della massa interna del materiale e differiscono da quelle di superficie.

²⁷ Un SAM, self-assembled monolayer, è uno strato organizzato di molecole in cui il gruppo di testa presenta un'elevata affinità con il substrato.

L'auto-assemblamento del probe di DNA modificato con il tiolo è associato ad un grande aumento del componente di trasferimento di carica (R_{ct}) (Fig. 4.2, curva "probe immobilisation"). La resistenza R_{ct} misura la capacità dell'elettrodo di lavoro di scambiare elettroni con l'ambiente circostante; è quindi utilizzata per descrivere i cambiamenti fisico-chimici all'interfaccia elettrodo/materiale biologico. Questo si riflette nella voltammetria ciclica con un decremento del picco di ossidazione/riduzione e con un incremento nella separazione picco-picco (Fig. 4.2, inserto, curve a e b). La successiva riorganizzazione della superficie è evidente in una diminuzione della R_{ct} nello spettro d'impedenza (Fig. 4.2, curva "after backfilling") e in un guadagno nella definizione di picco nel voltammogramma ciclico (Fig. 4.2, inserto, curva c).

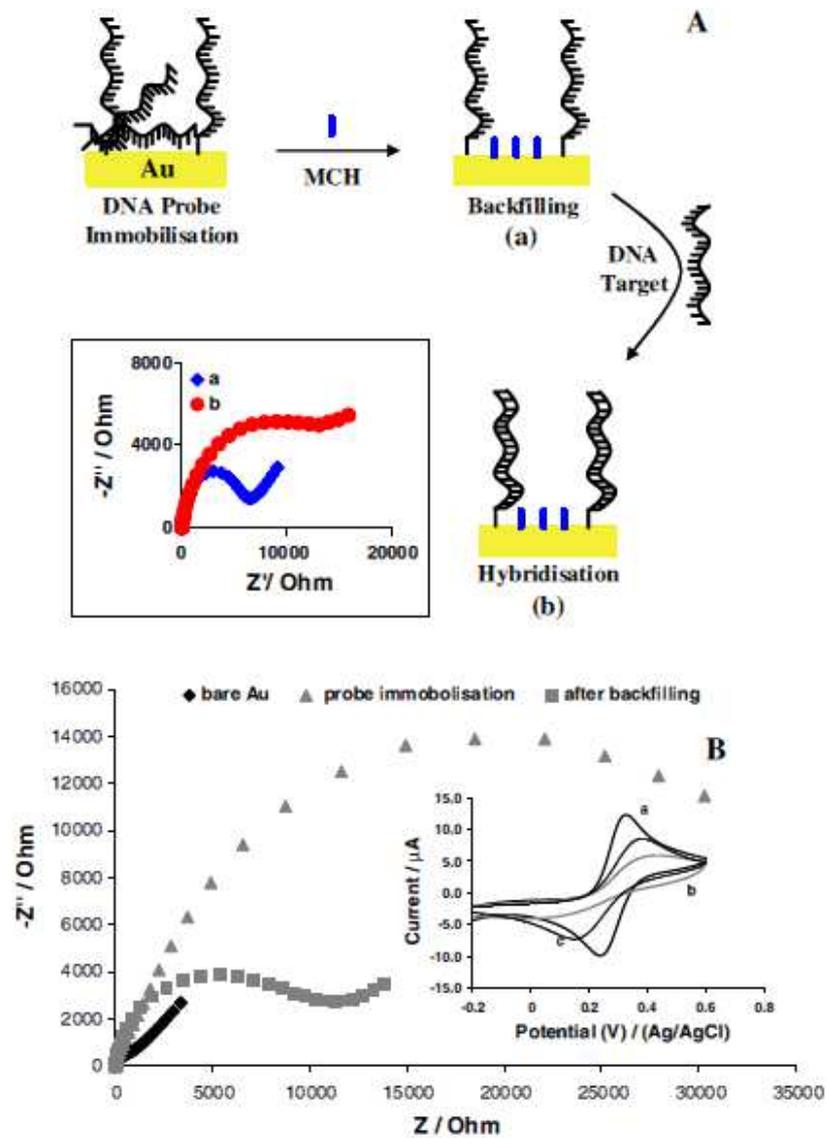


Figura 4.2 – A. Preparazione del sensore. Inserto: spettro di impedenza. B. Risultati della spettroscopia d'impedenza elettrochimica e della voltammetria ciclica [39]

Nella fig. 4.3a viene mostrata la risposta ottenuta quando l'elettrodo, modificato con un probe mutato lungo 15 basi, è esposto a due diversi target della stessa lunghezza del probe: quello mutante e quello normale. Dopo l'ibridazione con il target perfettamente complementare, un chiaro incremento nella componente R_{ct} viene registrato. Questo incremento può essere associato al fatto che la carica elettrica della doppia elica accoppiata esattamente contrasta il flusso degli elettroni dall'elettrodo di lavoro, aumentando la carica negativa dell'elettrodo e la resistenza di trasferimento di carica. L'aumento di carica della superficie ha l'effetto di crescere la repulsione elettrostatica verso l'anione ferrocianuro. Come vediamo dalla figura, dopo la rigenerazione, la risposta dell'impedenza ritorna al suo valore originale, indicando che è avvenuta la completa denaturazione della doppia elica, lasciando così il singolo filamento disponibile per una nuova ibridazione.

Nella figura 4.3b è mostrata una sintesi dei risultati ottenuti dagli esperimenti espressi rispetto alla variazione di R_{ct} ($\Delta R_{ct}\%$). Questo valore è calcolato come segue: $\Delta R_{ct}\% = 100 \times [(R_{ct\text{after}} - R_{ct\text{in}}) / R_{ct\text{in}}]$, dove $R_{ct\text{ after}}$ è il valore di R_{ct} dopo l'ibridazione o la rigenerazione e $R_{ct\text{ in}}$ il valore di R_{ct} prima dell'ibridazione o dopo la preparazione dell'elettrodo in caso di rigenerazione. Dalla figura si vede chiaramente che, quando l'ibridazione avviene in modo perfettamente complementare, si registra una variazione consistente del valore di R_{ct} . Al contrario, quando l'ibridazione avviene con 3 basi disaccoppiate, la variazione è decisamente minore.

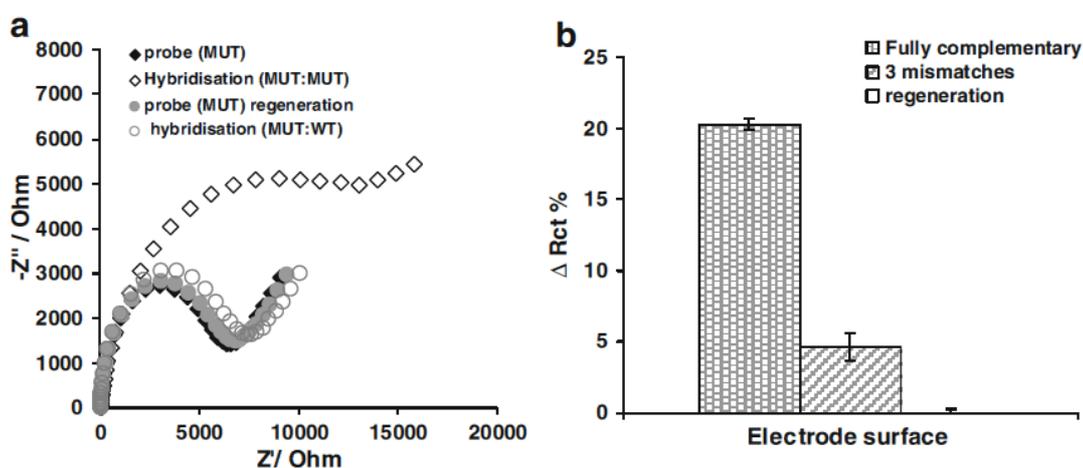


Figura 4.3 – a. Spettro di impedenza. b. Riepilogo degli esperimenti riportati come $\Delta R_{ct}\%$ [39]

Un secondo gruppo di esperimenti è stato fatto su filamenti più lunghi (82 basi il mutante e 85 quello normale), ottenuti come prodotti della PCR, per poter migliorare la selettività, senza però ottenere fattori di discriminazione migliori.

La temperatura di fusione è una caratteristica della doppia elica di DNA e funzione della sua lunghezza e composizione, essendo strettamente influenzata dalla presenza di eventuali disaccoppiamenti. Questa proprietà è stata quindi investigata per migliorare l'efficienza del sensore monitorando i valori ottenuti con una temperatura variabile da 25 a 40 °C. Confrontando questi risultati con quelli suggeriti da esperimenti paralleli con la tecnica dell'SPR a 40 °C sono stati valutati come temperatura ottima.

Un ultimo miglioramento per questo biosensore è stato raggiunto con l'uso di una piattaforma multipla in cui immobilizzare i due diversi probe e riuscire così a discriminare in modo più semplice e definitivo la presenza o meno delle mutazioni geniche causanti la Fibrosi Cistica [39].

5 Conclusioni

Questo lavoro di Tesi ha permesso di descrivere degli esempi concreti di biosensori elettrochimici, e di analizzarne il funzionamento sulla base delle tecniche utilizzate, in particolare in base alle etichette utilizzate o alla loro assenza. Nel Capitolo 1, introducendo la Fibrosi Cistica, si è descritto come la causa della malattia risieda in una mutazione genica individuabile nel corredo degli individui (o addirittura dei feti) classificati come portatori sani o malati. Il gold standard nelle pratiche diagnostiche di FC è il test del sudore che, però, non permette la diagnosi prenatale; per questo motivo vengono usate le analisi di I livello su campioni di DNA prelevati dai villi coriali o dal liquido amniotico. Tuttavia il tasso di individuazione delle mutazioni rivelabili è ancora basso.

Sono stati presentati specifici biosensori utilizzati per la diagnosi della FC nella letteratura scientifica, descrivendone le caratteristiche fondamentali, come la selettività o i limiti di rilevazione, in modo da poter affiancare questi dispositivi nella diagnosi genetica, anche prenatale. Attualmente il limite dei biosensori in commercio sta nella scarsa stabilità delle biomolecole (bassa temperatura di conservazione e complesse operazioni preliminari).

Gli ultimi studi sono comunque indirizzati verso lo sviluppo di biosensori che non facciano uso di label e in grado di sfruttare principalmente le misurazioni di tipo voltammetrico o di impedenza, in modo da ottenere dispositivi che possano essere utilizzati su larga scala, limitandone i costi ma garantendone la precisione e l'efficienza.

Bibliografia

- [1] P. Sudbery, *Genetica molecolare umana*, Ed. Zanichelli, 2000.
- [2] J. C. Davies, E. W. F. W. Alton, A. Bush, *Cystic fibrosis*, 2007
- [3] R. C. Stern, *The diagnosis of Cystic Fibrosis*, New England Journal of Medicine, 1997 – Mass Medical Soc.
- [4] <http://www.associazionetrentinafibrosicistica.it>
- [5] P. M. Farrel et al, *Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report*, The Journal of Pediatrics, August 2008.
- [6] www.fibrosicisticaricerca.it
- [7] J. Gonzalo-Ruiz et al., *Early determination of cystic fibrosis by electrochemical chloride quantification in sweat*, Biosensors and Bioelectronics, 2009.
- [8] K. De Boeck et al., *New clinical diagnostic procedures for cystic fibrosis in Europe*, Journal of Cystic Fibrosis, 2011.
- [9] V. Procopio et al., *Diagnostica molecolare della fibrosi cistica*, Rivista Italiana di Genetica e Immunologia Pediatrica, luglio 2009.
- [10] C. Castellani, F. Lallata, D. Neri, G. Novelli, A. Piccinini, M. Seia, F. Torricelli, *Modelli di analisi genetica per la fibrosi cistica*. 2005.
- [11] J. D. Watson, T. A. Baker, S. P. Bell, A. Gann, M. Levine, R. Losick, *Biologia molecolare del gene*, quinta edizione, Zanichelli, 2005.
- [12] B. Eggins, *Biosensors: an introduction*, Wiley, Chichester, 1997.
- [13] A. Sassolas, B. D. Leca-Bouvier, L. J. Blum, *DNA Biosensors and Microarrays*, Chemical reviews, 2008 - ACS Publications.
- [14] J. Homola, S. S. Yee, G. Gauglitz, *Surface Plasmon resonance sensors: review*, Sensors and Actuators B, Elsevier, 1999
- [15] K. Kerman, M. Kobayashi, E. Tamiya, *Recent trends in electrochemical DNA biosensor technology*. Measurement Science and Technology, 2004.
- [16] J. J. Goodling, *Electrochemical DNA Hybridization Biosensors*. Electroanalysis, 2002
- [17] J. Fritz, E. B. Cooper, S. Gaudet, P. K. Sorger, S. R. Manalis, *Electronic detection of DNA by its intrinsic molecular charge*. PNAS, 2002.

- [18] T.G. Drummond, M.G. Hill, J.K. Barton, *Electrochemical DNA sensors*. Nature biotechnology, 2003.
- [19] J Wang, *Survey and summary From DNA biosensors to gene chips*. Nucleic Acids Research, 2000 - Oxford Univ Press.
- [20] K.M. Millan, S.R. Mikkelsen, *Sequence-selective biosensor for DNA based on electroactive hybridization indicators*, Analytical chemistry, 1993 - ACS Publications
- [21] K. M. Millan, A. Sarullo, S. R. Mikkelsen, *Voltammetric DNA Biosensor for Cystic Fibrosis Based on a Modified Carbon Paste Electrode*, Analytical Chemistry, 1994 - ACS Publications.
- [22] S.R. Mikkelsen, K.M. Millan, A.J. Spurmanis, *Voltammetric sequence-selective sensor for target polynucleotide sequences*, US Patent 5,312,527, 1994 - Google Patents
- [23] T. deLumleyWoodyear, C. N. Campbell, A. Heller, *Direct Enzyme-Amplified Electrical Recognition of a 30-Base Model Oligonucleotide*, Journal of the American Chemical Society, 1996 - ACS Publications.
- [24] D.J. Caruana, A. Heller, *Enzyme-amplified amperometric detection of hybridization and of a single base pair mutation in an 18-base oligonucleotide on a 7- μ m-diameter microelectrode*, Journal of the American Chemical Society, 1999 - ACS Publications.
- [25] F. Patolsky, A. Lichtenstein, I. Willner, *Highly Sensitive Amplified Electronic Detection of DNA By Biocatalyzed Precipitation of an Insoluble Product onto Electrodes*, Chemistry-a European Journal, 2003 - Wiley Online Library.
- [26] D. J. H. Brock, *Prenatal screening for cystic fibrosis: 5 years' experience reviewed*, The Lancet, 1996.
- [27] L.-C. Tsui, M. Buchwald, , D. Barker, et al., *Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker*, Science, 1985.
- [28] M. Farrall, C. H. Rodeck, P. Stainer et al., *First-trimester prenatal diagnosis of cystic fibrosis with linked DNA probes*, The lancet, 1986.
- [29] S. M. Pulst, MD, *Genetic Linkage Analysis*, Basic Science Seminars in Neurology, 1999.
- [30] D. J. H. Brock, D. Bedgood, C. Hayward, N. J. Carbarns, C. Gosden, *Amniotic fluid microvillar enzyme activities in the early detection of fetal abnormalities*, Prenatal diagnosis, 1984.

- [31] F. Muller, J. F. Oury, Y. Dumez, J. Boué, A. Boué, *Microvillar enzyme assays in amniotic fluid and fetal tissues at different stages of development*, Prenatal diagnosis, 1988.
- [32] R. A. Multivor, D. Cook, et al., *Analysis of fetal intestinal enzymes in amniotic fluid for the prenatal diagnosis of cystic fibrosis*, The American Journal of Human Genetics, 1987.
- [33] D. E. Reich, M. Cargill, S. Bolk, et al., *Linkage disequilibrium in the human genome*, Nature, 2001.
- [34] W. K. Lemna, G. L. Feldman, et al., *Mutation analysis for heterozygote detection and the prenatal diagnosis of cystic fibrosis*, The new England Journal of Medicine, 1990.
- [35] R. Linderman, R. Wallace, F. Volpato, S. P. Hu, R. J. Trent, *Utility of the polymerase chain reaction (PCR) for prenatal diagnosis of genetic disease*, Pathology, 1991.
- [36] Y. M. Lo, N. Corbetta, P. F. Chamberlain, et al., *Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum*, The Lancet, 1997 – Elsevier.
- [37] M. C. Gonzales-Gonzalez, M. Garcia-Hoyos, M. J. Trujillo, et al., *Prenatal detection of a cystic fibrosis mutation in fetal DNA from maternal plasma*, Prenatal diagnosis, 2002.
- [38] M.T. Castaneda, A. Merkoci, M. Pumera, S. Alegret, *Electrochemical genosensors for biomedical applicatios based on gold nanoparticles*, Biosensors and Bioelectronics 2007, Elsevier.
- [39] H. Nasef, V. Beni, V. C. Ozalp, C. K. O’Sullivan, *Cystic fibrosis: a label-free detection approach based on thermally modulated electrochemical impedance spectroscopy*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010.
- [40] S. R. Mikkelsen, *Electrochemical Biosensors for DNA Sequence Detection*, Electroanalysis, 1996.
- [41] G. Farace, G. Lillie, T. Hianik, P. Payne, P. Vadgama, *Reagentless biosensing using electrochemical impedance spectroscopy*, Bioelectrochemistry, 2002 – Elsevier.
- [42] K. Hashimoto, K. Ito, Y. Ishimori, *Sequence-Specific Gene Detection with a Gold Electrode Modified with DNA Probes and an Electrochemically Active Dye*, Analytical Biochemistry, 1994.

- [43] J. J. Gooding, A. Chou, F. J. Mearns, E. Wong, K. L. Jericho, *The ion-gating effect: using a change in flexibility to allow label free electrochemical detection of DNA hybridization*, Chemical communication, 1938-9.
- [45] F. Lucarelli, A. Kicela, I. Palchetti, G. Marrazza, M. Mascini, *Electrochemical DNA biosensor for analysis of wastewater samples*, Bioelectrochemistry, 2002.
- [45] J. DiCesare, B. Grossman, E. Katz, E. Picozza, R. Ragusa, T. Woudenberg, *A high-sensitivity electrochemiluminescence-based detection system for automated PCR product quantitation*, Biotechniques, 1993.
- [46] J. D. Olson, P. R. Panfili, R. F. Zuk, E. L. Sheldon, *Quantitation of DNA hybridization in a silicon sensor-based system: application to PCR*, Molecular and cellular probes, 1991.
- [47] V. T. Kung, P. R. Panfili, E. L. Sheldon, R. S. King, P. A. Nagainis, B. Gomez Jr., D.A. Ross, J. Briggs, R. F. Zuk, *Picogram quantitation of total DNA using DNA-binding proteins in a silicon sensor-based system*, Analytical biochemistry, 1990.
- [48] M. Ozsoz, A. Erdem, K. Kerman, D. Ozkan, B. Tugrul, N. Topcuoglu, H. Ekren, M. Taylan, *Electrochemical genosensor based on colloidal Au nanoparticles for the detection of factor V Leiden mutation using disposable pencil graphite electrodes*, Analytical Chemistry, 2003.
- [49] J. Wang, D. Xu, A.-N. Kawde, R. Polsky, *Metal nanoparticle-based electrochemical stripping potentiometric detection of DNA hybridization*, Analytical Chemistry, 2001.
- [50] J. Wang, R. Polsky, *Silver-enhanced colloidal Au electrochemical stripping detection of DNA hybridization*, Langmir, 2001.
- [51] www.enea.it