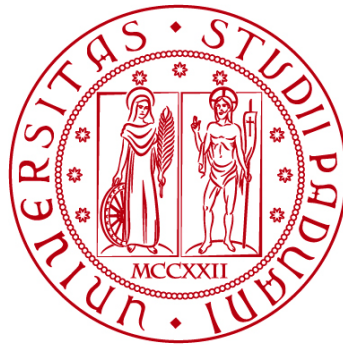


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**VALIDAZIONE DI SAGGI IN PCR QUANTITATIVA PER
L'IDENTIFICAZIONE DEI TRASCritti DI FUSIONE SYT-
SSX1 E SYT-SSX2 DEL SARCOMA SINOVIALE PEDIATRICO**

**Tutor: Prof. Cristiano De Pittà
Dipartimento di Biologia**

**Co-tutor: Dott.ssa Lucia Tombolan
Istituto di Ricerca Pediatrica - Città della Speranza**

Laureando: Simone De Marchi

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

INDICE

1. ABSTRACT	3
2. IL SARCOMA SINOVIALE	4
2.1 Il Sarcoma Sinoviale in età pediatrica.....	4
2.2 Le alterazioni genetiche	5
2.3 Il ruolo della biologia molecolare nella diagnosi.....	8
3. OBIETTIVI DELLO STUDIO	8
4. MATERIALI E METODI	9
4.1 Estrazione dell'RNA totale mediante Trizol®.....	9
4.2 Retrotrascrizione.....	9
4.3 PCR quantitativa (qPCR).....	10
4.4 Metodologia Taqman nella PCR quantitativa	12
4.5 Metodologia SYBR Green nella PCR quantitativa.....	14
4.6 Utilizzo della curva standard per il calcolo dell'efficienza.....	15
5. RISULTATI E DISCUSSIONE	16
5.1 Allestimento delle curve standard con metodica TaqMan per i trascritti SYT-SSX1 e SYT-SSX2: analisi dei risultati e discussione	16
5.1.1 Analisi della curva standard del trascritto di fusione SYT-SSX1.....	16
5.1.2 Analisi della curva standard del trascritto di fusione SYT-SSX2.....	18
5.2 Amplificazione e Curve di Melting con metodica SYBR Green per il trascritto di fusione SYT-SSX2: analisi dei risultati e discussione	19
6. CONCLUSIONI	21
7. BIBLIOGRAFIA	22

1. ABSTRACT

Il Sarcoma Sinoviale (SS) è un sarcoma dei tessuti molli (STM) ad elevata incidenza nei giovani adulti. A livello genetico è caratterizzato da una specifica traslocazione cromosomica t(X;18)(p11.2;q11.2) che dà origine ad un trascritto di fusione, *SYT-SSX*, che codifica per una proteina oncogenica che promuove la crescita e la proliferazione cellulare. Esistono tre forme di trascritti di fusione associate al SS: *SYT-SSX1*, *SYT-SSX2* o *SYT-SSX4* (rarissimo). I trascritti di fusione differiscono per il gene omologo in posizione 3' (*SSXn*). L'identificazione della presenza del trascritto di fusione *SYT-SSX1/2* in un campione biotico di un paziente con sospetta diagnosi di SS è una pratica di routine nell'iter diagnostico. In questo lavoro si è verificata la specificità e l'efficienza di due saggi per la rilevazione dei trascritti di fusione *SYT-SSX1* e *SYT-SSX2* in PCR quantitativa, sia mediante tecnica SYBR Green e sia mediante l'utilizzo di sonde TaqMan. Il saggio per la rilevazione di *SYT-SSX1* ha mostrato un'efficienza dell'89,38% - $R^2=0,98$ mentre il saggio per la rilevazione di *SYT-SSX2* un'efficienza del 104,15% - $R^2=0,98$, pertanto possono essere utilizzati in diagnostica molecolare.

2. IL SARCOMA SINOVIALE

2.1 Il Sarcoma Sinoviale in età pediatrica

Il Sarcoma Sinoviale (SS) è un sarcoma dei tessuti molli (STM), tumore maligno e raro, che nonostante il nome non ha origine dalle cellule del tessuto connettivo della normale membrana sinoviale, ma origina da cellule staminali multipotenti che si differenziano in cellule epiteliali e/o mesenchimali. È definito come tumore indifferenziato o a differenziazione incerta poiché non è possibile stabilire con certezza la linea cellulare da cui origina. La classificazione istogenetica di questo tipo di tumori risulta quindi molto complessa. Dal punto di vista istologico, il SS presenta una distinzione in due forme principali ed una terza più rara: la forma bifasica e la forma monofasica sono le principali, mentre la forma epitelioida è poco comune.

La forma bifasica è caratterizzata dalla presenza di due tipi di cellule, le cellule fusate e le cellule rotonde epitelioidi e/o ghiandolari; mentre la forma monofasica si manifesta con un solo tipo di cellule predominante, le cellule fusate lunghe e sottili, che predispongono a fibrosi molto densa nei tessuti circostanti. (Feng X et al, 2021).

Il SS rappresenta tra l'8% e il 10% dei sarcomi dei tessuti molli, non è un tumore strettamente pediatrico e può essere sviluppato ad ogni età, l'età mediana di insorgenza è di 35 anni – media di 39. Si presenta con una forte prevalenza in adolescenti e giovani adulti (15-30 anni) e non presenta differenze di incidenza legate al genere. Il paziente si definisce affetto da SS pediatrico quando alla data della diagnosi lo stesso abbia tra 0 e 18 anni, ed è ulteriormente diviso in SS del bambino (0-9 anni) e dell'adolescente (10-18 anni). L'incidenza del SS pediatrico è di 0.81 casi per ogni milione di persone in età pediatrica. Nei pazienti pediatrici spesso si presenta nelle grandi articolazioni prossime alle estremità soprattutto inferiori (86%) come l'articolazione del ginocchio, è invece meno comune in tronco (10%), testa e collo (4%). (Mocellin S, 2021).

Il SS va considerato come un tumore ad alto grado e ad alto potenziale metastatico: il 13% dei pazienti al momento della diagnosi presenta già metastasi principalmente ai polmoni. L'*outcome* del SS pediatrico è migliore a parità di manifestazione clinica se comparato al SS dell'adulto, specialmente nel gruppo SS del bambino. La sopravvivenza a 5 anni varia dal 50% al 60% nell'adulto e si attesta all'80% per i casi di SS pediatrico. Le analisi di popolazione hanno evidenziato come la variabile prognostica più favorevole sia proprio l'età ed in particolare l'ingresso/non ingresso nella fase di pubertà. Sono invece fattori prognostici sfavorevoli, la presenza di metastasi all'esordio, la dimensione >5cm della massa e la scarsa differenziazione. (Sultan I et al, 2009)

Il trattamento nei SS pediatrici è multidisciplinare e comprende trattamenti chemioterapici di radioterapia e di chirurgia.

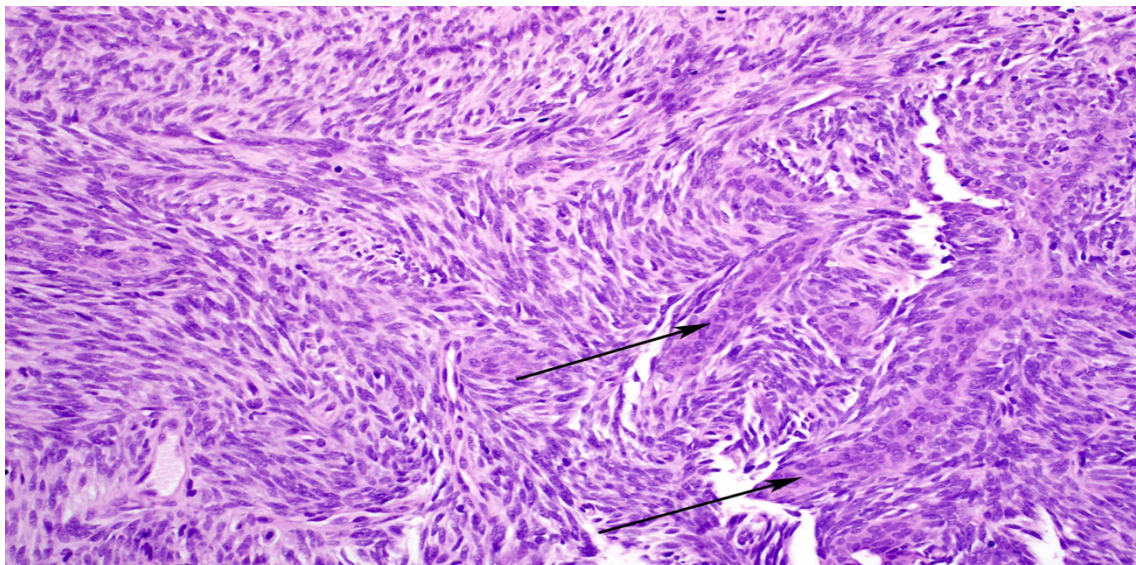


Figura 1 – Immagine istologica di un SS Bifasico - (Jennifer M. Boland, M.D.)
 Si può apprezzare la presenza sia di cellule fusate che di cellule ghiandolari/epitelioidi (indicate).

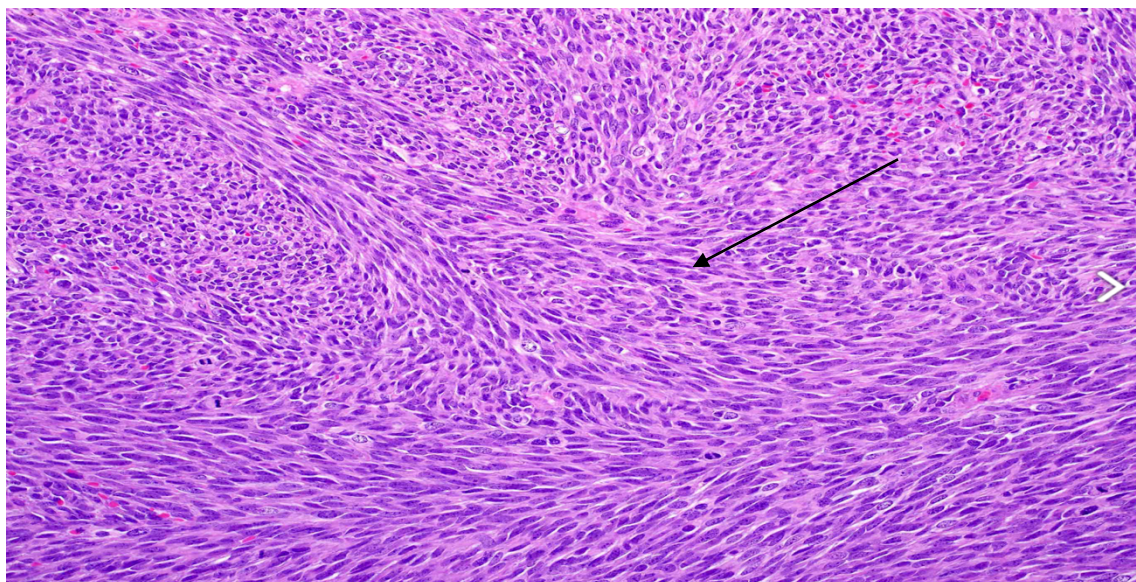


Figura 2 – Immagine istologica di un SS Monofasico - (Jennifer M. Boland, M.D.)
 Si può apprezzare la sola presenza di cellule fusate (indicate).

2.2 Le alterazioni genetiche

Il SS presenta in più del 90% dei casi una specifica traslocazione cromosomica $t(X;18) (p11.2; q11.2)$ che si associa solamente a questo tipo di tumore in cui il gene *SYT* noto anche come *SS18* (*Subunit of BAF Chromatin Remodeling Complex*) situato sul cromosoma 18 in posizione q11.2, trasloca sul cromosoma X in prossimità dell'esone 5 dei geni *SSX1* o *SSX2* (*Synovial Sarcoma Chromosome X 1 o 2*). La traslocazione è mutualmente esclusiva. Molto raramente la traslocazione può coinvolgere il gene *SSX4*, un omologo di *SSX1* e *SSX2*. La traslocazione dà origine ad un trascritto di fusione che una volta tradotto genera una proteina di fusione oncogenica. Il gene *SYT wild type* è classificato come protooncogene e dà

origine ad un trascritto di circa 3.700 bp che codifica per una proteina di 418 amminoacidi espressa in modo ubiquitario e localizzata nel nucleo.

La proteina SYT possiede due domini funzionali: il primo, SNH, si trova all'N terminale e permette di legare proteine con domini SH2-SH3. Infatti, quando SYT lega dei domini SH2-SH3 questi ultimi permettono, una volta avvicinata una proteina *target*, di mantenerla ferma e vicina a eventuali domini chinasi aggiungendo quindi un gruppo PO₄ (Stacchiotti, 2017). Il dominio al C-terminale prende il nome di QPGY e svolge un ruolo come cofattore trascrizionale a controllo positivo, QPCY è, quindi, un dominio di DNA-binding che lega regioni *enhancer* in prossimità di alcuni promotori *target* favorendone la trascrizione da parte di RNA polimerasi II. SYT è, inoltre, una subunità del complesso BAF (SWI/SNF) ATP-dipendente con funzione di rimodellamento della cromatina mediante alterazione del contatto DNA/istone, funziona da coattivatore trascrizionale (Mocellin, 2021).

I geni SSX sono una famiglia genica che comprende 9 omologhi che localizzano su p11.2 del cromosoma X, tuttavia solo i geni *SSX1-2-4* risultano implicati nella traslocazione che favorisce lo sviluppo di SS. Al contrario di *SYT*, *SSX* è un gene contenente 8 esoni che codifica per un prodotto che regola negativamente la trascrizione: nella regione N-terminale è localizzato il dominio KRAB, noto per la sua funzione di repressore trascrizionale, al C-terminale si trova un altro dominio con funzioni repressive, SSXRD. *SSX* non ha domini di DNA binding, non può quindi legare direttamente né il ssDNA né il dsDNA, si sospetta che espletati la sua attività di repressore trascrizionale formando complessi multiproteici con proteine deputate alla funzione di DNA binding.

La proteina di fusione nasce da una rottura in prossimità del C terminale di SYT e da un'altra rottura nella porzione centrale di SSX. Vengono quindi mantenuti i seguenti domini funzionali nella proteina di fusione SYT-SSX: *SNH*, *QPGY* e *SSXRD* (Stacchiotti S, 2018).

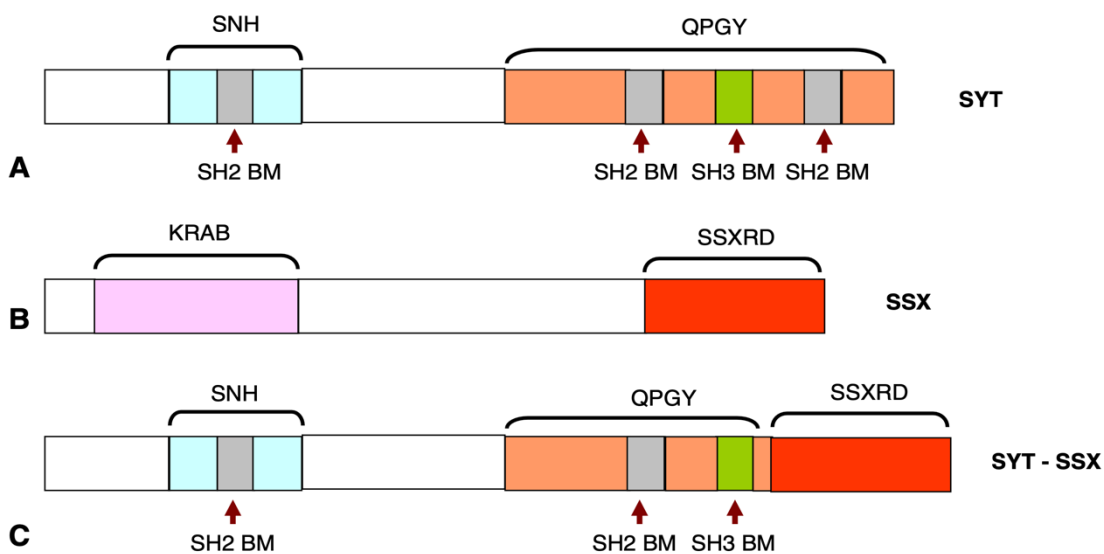


Figura 3 – SYT wt (A), SSX1/2 wt (B) e la proteina di fusione SYT-SSX1/2 (C) - (Haldar M. et al, 2018)
 La proteina di fusione conserva i domini SNH, QPGY e SSXRD mentre perde il dominio KRAB localizzato normalmente nella proteina wild type SSX1/2.

Sono stati identificati numerosi *pathway* sregolati da SYT-SSX, in particolare esso è in grado di legare proteine del PRC1-2 (*Polycomb Repressive Complex 1-2*) ed in particolare sregolare EZH2 (parte del complesso 2 con funzione catalitica), RNG1 e BMC. Il complesso PRC ha funzione metil transferasica nei confronti degli istoni, che svolgono un ruolo chiave nel limitare l'accesso alla cromatina da parte dei fattori di trascrizione legandosi ai nucleosomi, reprimendo così l'espressione genica. L'espressione alterata di EZH2 mediata da SYT-SSX porta ad una ridotta espressione genica di diversi geni oncosoppressori, favorendo l'oncogenesi (Cho YJ, 2018). Un'altra via sregolata da SYT-SSX è Wnt/ β -catenina: la via Wnt/ β -catenina è fondamentale nel processo di segnalazione cellulare paracrina e autocrina ed è documentato che sregolazioni di questa via promuovono metastasi e immunità tumorale. Alti livelli di β -catenina accumulata nel nucleo a causa delle alterazioni della via Wnt/ β -catenina, sono stati rilevati con la tecnica dei *microarray* e correlano con la progressione del tumore da sede primaria (41% dei pazienti presentano alti livelli di β -catenina) a metastatico (70% dei pazienti presentano alti livelli di β -catenina). Inoltre, l'80% dei pazienti affetti da SS sono positivi alla ciclina D1 (CCND1), che è un prodotto della via canonica Wnt/ β -catenina e che svolge un ruolo cruciale nella transizione della cellula dalla fase G1 alla fase S: l'accumulo di CCND1 rafforza l'ipotesi che sia β -catenina a promuovere la CCND1 già nelle fasi iniziali della cancerogenesi. (Feng, 2021). Sono state inoltre provate interazioni tra SYT-SSX1-2 e la proteina TCF che è uno dei *target* di Wnt, l'interazione permette l'avvio del processo di segnalazione della via canonica anche in assenza di Wnt, contribuendo all'aumento dei livelli di β -catenina nel citoplasma cellulare. Anche la via ERK, una delle principali vie di segnalazione intracellulare coinvolte nella regolazione dei processi cellulari, viene sregolata dall'interazione della proteina di fusione SYT-SSX. La via ERK fa parte di una famiglia di vie di segnalazione chiamate vie di chinasi mitogeniche (MAPK, *Mitogen-Activated Protein Kinase*). Inizialmente, un ligando esterno si lega a un recettore di membrana sulla superficie cellulare, innescando la fosforilazione di una serie di proteine coinvolte nella via di segnalazione. Queste proteine attivano una cascata di chinasi che culmina con la fosforilazione delle proteine ERK1 e ERK2. Una volta fosforilate, le proteine ERK1 e ERK2 si separano dal complesso di chinasi e migrano nel nucleo della cellula. Nel nucleo, le proteine ERK fosforilate possono attivare fattori di trascrizione e influenzare l'espressione genica. La via ERK è implicata nello sviluppo embrionale, nei segnali di crescita di FGF, nella differenziazione, nella sopravvivenza cellulare e nel controllo del ciclo cellulare. Una delle proteine *target* a cui si lega il dominio legante SH2 presente all'N terminale di SYT, SHCBP1 (*SHC Binding And Spindle Associated 1*), è direttamente implicata nella via ERK, aumentandone l'attivazione il trascritto di fusione influenza direttamente una via di segnalazione cruciale per la cancerogenesi e per la proliferazione tumorale. (Feng X et al, 2021)

Infine, SYT-SSX è coinvolto nella transizione epiteliale-mesenchimale, ovvero il processo in cui una cellula subisce un cambiamento morfologico, passando dal fenotipo epiteliale a quello mesenchimale. Le cellule mesenchimali, a differenza delle cellule epiteliali, sono dotate di elevata mobilità (Thiery e Sleeman, 2006), e ciò ne consente la migrazione nell'interstizio circostante mediante diversi meccanismi basati sull'emissione di filopodi e pseudopodi (Friedls, 2004). Il coinvolgimento di SYT-SSX nella transizione epitelio-mesenchimale spiega in parte la notevole capacità di sviluppare metastasi da parte del SS, infatti, la

proteina di fusione può alterare la funzione dell'inibitore trascrizionale di E-caderina Snail/Slug o può legarsi direttamente al promotore della stessa portando a una riduzione della produzione di E-caderina. I SS monofasici sono caratterizzati da riduzione di E-caderina più marcata se comparati ai bifasici, ed hanno generalmente prognosi peggiori e maggiore rischio di metastatizzazione (Feng X *et al.*, 2021).

2.3 Il ruolo della biologia molecolare nella diagnosi

La diagnosi di SS si basa sull'esame microscopico del campione bioptico e sull'analisi immunoistochimica. I marker come la citocheratina (positivo nel 70%-80% dei pazienti) e l'antigene di membrana epiteliale (EMA) (oltre il 90% dei pazienti) sono biomarcatori standard, CD99 è presente nel 62% dei casi e Bcl2 è sempre presente nei campioni bioptici di pazienti affetti da SS, anche il marker nucleare TLE1 è spesso impiegato poiché presente di frequente nei campioni di SS mentre al saggio di CD34 i pazienti SS sono quasi sempre negativi. I risultati immunoistochimici vanno sempre valutati in collaborazione con l'uso di metodi di indagine diagnostica molecolare poiché nessuno di essi è completamente risolutivo nell'iter diagnostico. L'analisi molecolare consente di rilevare i trascritti di fusione *SYT-SSX1* e *SYT-SSX2* ed è uno strumento fondamentale soprattutto nelle diagnosi differenziali con altre neoplasie come il fibrosarcoma, il tumore fibroso solitario e il tumore maligno della guaina dei nervi periferici (MPNST) (Mocellin S, 2021). I trascritti di fusioni vengono classicamente identificati mediante PCR convenzionale ed elettroforesi in gel di agarosio. Di recente anche la PCR quantitativa o *real-time* PCR (qPCR) con metodica Taqman viene utilizzata per identificare i geni di fusione in quanto è più veloce e più precisa grazie all'utilizzo di una sonda specifica.

Nei SS bifasici l'alterazione più comune è *SYT-SSX1* mentre nei monofasici non vi è differenza, la distribuzione del trascritto di fusione in base al subtipo istologico è la seguente:

SYT-SSX1: 60 - 70% monofasico, 30 - 40% bifasico

SYT-SSX2: 97% monofasico, 3% bifasico.

Anche se, ad oggi, non necessaria per la scelta dell'approccio terapeutico, la caratterizzazione molecolare della porzione al C-terminale della proteina di fusione (*SSX1-2*) potrebbe risultare fondamentale per lo sviluppo di terapie future che potrebbero richiedere *target* molecolari più specifici. Inoltre, l'approccio molecolare è d'obbligo per individuare SS di difficile caratterizzazione istologica.

3. OBIETTIVI DELLO STUDIO

Lo studio si pone l'obiettivo di verificare l'efficienza e la specificità di due saggi in PCR quantitativa per la rilevazione di due trascritti di fusione caratteristici del Sarcoma Sinoviale pediatrico, *SYT-SSX1* e *SYT-SSX2*.

Comprenderà il processo di estrazione dell'RNA totale a partire da campioni bioptici, la retrotrascrizione a cDNA e l'amplificazione mediante qPCR. Verrà,

inoltre, valutata l'efficienza dei saggi, mediante metodologia TaqMan, e la presenza di amplificati aspecifici mediante metodologia SYBR Green, utilizzando le curve di *melting*.

4. MATERIALI E METODI

4.1 Estrazione dell'RNA totale mediante Trizol®

- 1) Aggiungere 1 ml di Trizol (Thermo Fisher) in una *eppendorf* contenente il campione di cellule, spinnare, vortexare e aspettare 5 minuti a temperatura ambiente.
- 2) Aggiungere 200 μ l di cloroformio, agitare vigorosamente per 15 secondi e lasciare a temperatura ambiente per 2-3 minuti.
- 3) Centrifugare a 4°C per 15 minuti a 12.000 rcf.
- 4) Si saranno formate tre fasi: acquosa, interfase ed organica.
Trasferire in una *eppendorf* nuova solo la fase acquosa, aspirandola e facendo attenzione a non prelevare le fasi sottostanti che invece vanno buttate.
- 5) Aggiungere 500 μ l di isopropanolo a -20°C, agitare e lasciare a temperatura ambiente per 10 minuti.
- 6) Centrifugare per 10 minuti a 4°C a 12.000 rcf.
- 7) Rimuovere il surnatante.
- 8) Risospendere in EtOH al 75%.
- 9) Centrifugare a 12.000 rcf per 5 minuti a 4°C.
- 10) Rimuovere il surnatante e far evaporare l'etanolo residuo lasciando l'*eppendorf* aperta per 5 minuti sotto cappa.
- 11) Risospendere il pellet di RNA in 20 μ l di acqua nucleasi *free* e spinnare per un'ultima volta. (NOTA: Il volume di risospensione dipende dalle dimensioni del *pellet*)

Si può ora procedere alla quantificazione mediante Spettrofotometro Nanodrop™.

Il rapporto di assorbanza 260/280 deve essere circa 2 per i campioni di RNA, in caso di valori più bassi sospetto la contaminazione di proteine.

Il rapporto di assorbanza 260/230 generalmente è compreso tra 1,8- 2,2. In caso di valori molto più bassi devo sospettare contaminazioni da parte di EDTA, carboidrati e/o fenolo utilizzato nell'estrazione Trizol.

4.2 Retrotrascrizione

Per la reazione si utilizza LunaScript RT SuperMix (New England Biolabs), una miscela che contiene tutti i componenti necessari per la sintesi del primo filamento di cDNA. Nella supermix sono quindi contenuti: una trascrittasi

inversa termostabile Luna[®], un inibitore di RNasi, un mix di *random* esameri e poly-dT usati come *primer*, dNTPs, Mg²⁺ e un *buffer* di reazione.

Nel nostro caso vengono allestite due reazioni di retrotrascrizione, una da 1 µg e una da 2 µg per garantire l'ottenimento di una quantità sufficiente di cDNA e la necessaria robustezza dei dati sperimentali.

Tabella 1:

COMPONENTI	VOLUME	CONCENTRAZIONE FINALE
Lunascript Super Mix (5X)	4 µL	1X
Campione di RNA (C _{RNA})	Variabile	1 µg - 2 µg
H ₂ O nucleasi <i>free</i>	A volume (20 µl)	

La reazione viene incubata in un termociclatore con il seguente profilo termico:

Tabella 2:

STEP	TEMPERATURA	TEMPO	CICLI
<i>Annealing</i> Primer	25°C	2'	1
Sintesi cDNA	55°C	30'	1
Inattivazione	95°	1'	1

4.3 PCR quantitativa (qPCR)

La PCR quantitativa è utilizzata per determinare la presenza e la quantità di un particolare frammento di DNA o RNA (*target*) presente in un campione. In particolare, consente di determinare la quantità iniziale del *target* mediante la misurazione della fluorescenza generata durante la reazione. La qPCR si basa sul principio della PCR classica, ma introduce una fase di rilevamento e quantificazione in tempo reale dei prodotti amplificati. Durante la qPCR, la reazione a catena della polimerasi viene eseguita in modo ciclico, in cui il DNA bersaglio viene amplificato utilizzando una specifica coppia di *primer*, *Forward* e *Reverse*, e un enzima termoresistente, la Taq polimerasi. La reazione avviene in un termociclatore in grado di rilevare, ad ogni ciclo di reazione, la fluorescenza di fluorofori legati a sonde o intercalati al DNA.

I *reporter* più utilizzati sono:

SYBR *Green* I è un intercalante molecolare in grado di legarsi nel solco minore del DNA in doppio filamento, non può quindi legarsi al DNA in singola elica (ssDNA). Nel momento in cui si intercala con il dsDNA emette fluorescenza che verrà rilevata dal termociclatore, il picco di eccitazione di SYBR *Green* è 488nm mentre il picco di emissione varia tra 520- 530nm.

Il reporter FAM è un fluorocromo verde che emette luce nell'intervallo di lunghezza d'onda di 515-530 nm quando viene eccitato a 488 nm. È spesso utilizzato per rilevare il segnale proveniente dal DNA *target* amplificato. Durante il ciclo di amplificazione, il segnale di fluorescenza aumenta proporzionalmente all'aumento della quantità di DNA amplificato, consentendo una misurazione quantitativa dell'abbondanza del *target* nel campione.

Il reporter VIC è un fluorocromo arancione-rosso che emette luce nell'intervallo di lunghezza d'onda di 530-560 nm quando viene eccitato a 488 nm.

FAM e VIC, insieme ad altri fluorocromi, possono essere utilizzati contemporaneamente in una stessa reazione di qPCR, consentendo la rilevazione simultanea di più *target* genici all'interno dello stesso campione. Si usano combinazioni di Reporter posti su sonde diverse, solitamente ciò avviene nell'esecuzione di Multiplex-PCR.

Ogni fluorocromo è associato ad una sonda complementare al DNA *target*. Nel saggio di reazione sono presenti anche due primer, *forward* e *reverse*, non marcati. Durante la reazione di amplificazione, la quantità di fluorescenza emessa aumenta proporzionalmente alla quantità di *target* presente nel campione. La fluorescenza viene rilevata durante la fase di allungamento poiché l'intensità di emissione cresce spostandosi dalle fasi di denaturazione (nulla) -> *annealing* (bassa ma già rilevabile) -> allungamento (massima).

Oltre ai fluorocromi legati alle sonde può essere utilizzato un "fluorocromo passivo" come il ROX. Il ROX è una molecola fluorescente inerte che solitamente è già contenuta nelle Master Mix per qPCR. A differenza dei reporter come SYBR™ Green o FAM™, la fluorescenza di ROX non viene influenzata dall'amplificazione PCR, la sua fluorescenza rimane costante durante tutta la reazione. Ciò consente a ROX di fungere da segnale di riferimento consentendo di normalizzare i valori dei segnali di fluorescenza durante la PCR quantitativa.

In una reazione di qPCR si definiscono alcuni parametri:

Rn è il rapporto tra l'intensità dell'emissione di fluorescenza del *reporter* (R) e l'intensità dell'emissione di fluorescenza del *reporter* passivo (ROX). ΔRn è il valore normalizzato che si ottiene sottraendo a Rn il valore di *baseline* ($\Delta Rn = Rn - baseline$).

Il valore di *Baseline* è il livello di fluorescenza di fondo registrato prima che la reazione di amplificazione abbia inizio. Viene utilizzato come punto di riferimento per determinare i segnali di fluorescenza sopra il rumore di fondo. Il valore di Soglia (*Threshold*) è un valore arbitrario impostato durante l'analisi dati della qPCR e viene definito come il livello di fluorescenza sopra il rumore di fondo. Il Ciclo soglia (Ct) è il ciclo di amplificazione in cui la fluorescenza supera il valore di soglia. Viene utilizzato per determinare la quantità iniziale dell'amplicone presente nel campione. Valori di Ct più bassi indicano una maggiore quantità di amplicone iniziale nel campione.

Le fasi della PCR sono:

1. Fase Esponenziale:

Durante questa fase, l'amplificazione dei prodotti della PCR avviene in modo esponenziale. Ciò significa che la quantità di *target* raddoppia ad ogni ciclo di amplificazione. Se l'efficienza della reazione è del 100%, si avrà un raddoppio preciso dei prodotti ad ogni ciclo. In questa fase la rilevazione ha una specificità elevata e una buona precisione nella quantificazione dei *target*.

2. Fase Lineare:

Nella fase lineare, la reazione di PCR raggiunge una fase in cui i componenti della reazione vengono consumati e i prodotti amplificati iniziano a degradarsi. In questa fase, la quantità di prodotto amplificato non aumenta più in modo esponenziale, ma in modo lineare. Ciò può portare a una maggiore variabilità nella quantificazione dei *target* e una minore precisione rispetto alla fase esponenziale.

3. Fase di *Plateau*:

Nella fase di *plateau*, si raggiunge una condizione di saturazione, in cui la quantità di prodotto amplificato non aumenta più significativamente.

4.4 Metodologia Taqman nella PCR quantitativa

Nella qPCR con metodologia TaqMan oltre ai *primer* specifici necessari all'amplificazione del gene di interesse, si utilizza anche una sonda specifica legata a fluorocromi.

La sonda Taqman è un oligonucleotide che, come i *primer* della qPCR, viene disegnata per essere complementare ad un tratto della sequenza bersaglio da amplificare. Il suo funzionamento si basa sul principio FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*): al 5' della sonda viene inserito un *Reporter* (R) o donatore e al 3' un *Quencher* (Q) o accettatore, il donatore ha la funzione di emettere fluorescenza rilevabile mediante fluorimetro in seguito alla sua eccitazione mediante l'uso di luce ad una specifica lunghezza d'onda (λ) coincidente con il suo picco di assorbimento, mentre il *Quencher* ha la funzione di spegnere la fluorescenza del *reporter* quando colocalizzato in prossimità del *Reporter*. Nella fase di allungamento la degradazione della sonda rilascia il fluoroforo, il *Quencher*, quindi, non si troverà più in prossimità del *Reporter*, consentendo la rilevazione della fluorescenza del fluoroforo. In questo modo, la fluorescenza rilevata dal termociclato è direttamente proporzionale alla quantità di fluoroforo rilasciato e quindi alla quantità di DNA presente. Si libera 1 molecola di *reporter* per ogni copia di DNA duplicata.

TAMRA è il *Quencher* più comune nella qPCR con tecnologia TaqMan, è posto al 3', ha un'attività di fluorescenza con picco di eccitazione a 552 nm e picco di emissione a 578 nm, richiede una lunghezza della sonda di circa 30 bp, ha una specificità buona ma inferiore a *Quencher* più recenti.

Un'alternativa a TAMRA è il Quencher NFQ-MGB: l'accettore è composto da due subunità la prima NFQ è il *quencher*, che in questo caso non ha nessuna attività di emissione di fluorescenza, la seconda è MGB (*Minor Groove Binder*), il suo scopo è aumentare la $T^{\circ}_{\text{melting}}$ del *probe* agendo da *clamp* molecolare legando con maggiore forza il templatato e la sonda. L'aumento della $T^{\circ}_{\text{melting}}$ permette di disegnare sonde più corte e quindi più specifiche poiché sarà meno probabile, essendo molto brevi, che leghino porzioni di sequenze aspecifiche.

La CCD camera rileverà quindi la fluorescenza del *reporter* liberato ad ogni ciclo di amplificazione e questo permetterà di quantificare il gene *target* nel campione in esame. Le principali problematiche di questa tecnica risultano essere l'elevato costo, la necessità di progettare le sonde in maniera precisa e l'impossibilità di ottenere curve di *melting* al termine dell'amplificazione. Tuttavia, l'elevatissima specificità e scalabilità garantiscono un ottimo rendimento delle sonde TaqMan anche nelle applicazioni di multiplex-PCR, permettendo un'incredibile versatilità e precisione in ambito diagnostico.

Viene allestita la seguente reazione di qPCR:

Tabella 3:

COMPONENTI	VOLUME	CONCENTRAZIONE FINALE
H ₂ O <i>nuclease free</i>	7,6 μ L	
cDNA (50ng/ μ L)	1,0 μ L	2,5 ng/ μ L
Master MIX (2X)	10,0 μ L	1X
Primer Fwd (20 μ M)	0,3 μ L	0,3 μ M
Primer Rev (20 μ M)	0,3 μ L	0,3 μ M
Taqman Probe (5 μ M)	0,8 μ L	0,2 μ M
Volume finale	20,0 μ L	

Si predisporre la piastra andando ad aliquotare in ciascun pozzetto 19 μ L di Mix di PCR ai quali si va ad aggiungere 1 μ L di cDNA del campione in esame o di controllo positivo oppure acqua (nei pozzetti *no template control*, NTC). La piastra da 96 verrà centrifugata per 1 minuti a 1.200 rcf e poi caricata su un termociclatore per PCR quantitativa. Il ciclo di reazione sarà il seguente:

Tabella 4:

STEP	TEMPERATURA	TEMPO	CICLI
Attivazione	50°C	2'	1
Attivazione DNA pol	95°C	10'	1
Denaturazione	95°C	15''	45
Anneal/ Allungamento	60°C	1'	45

4.5 Metodologia SYBR Green nella PCR quantitativa

La metodologia SYBR Green è la più comune tecnica impiegata nella qPCR. Il vantaggio principale di questa tecnica è la possibilità di costruire delle curve di *melting* per la valutazione della presenza di dimeri di *primer* o amplificati aspecifici. La tecnica ha un'elevata sensibilità ed è *cost-effective*, non richiedendo di disegnare specifiche sonde oltre ai canonici *Primer Fwd e Rev*; tuttavia, il legame ad ampliconi aspecifici può rappresentare un problema notevole.

Viene allestita la seguente reazione di qPCR:

Tabella 5:

COMPONENTI	VOLUME	CONCENTRAZIONE FINALE
H ₂ O <i>nuclease free</i>	8,6 μ L	
cDNA (50ng/ μ L)	1,0 μ L	2,5 ng/ μ L
Master MIX (2X)	10,0 μ L	1X
Primer Fwd (20 μ M)	0,2 μ L	0,2 μ M
Primer Rev (20 μ M)	0,2 μ L	0,2 μ M
Volume finale	20,0 μ L	

Anche nel caso di SYBR Green si prepara la piastra andando ad aliquotare in ciascun pozzetto 19 μ L di Mix di PCR ai quali si va ad aggiungere 1 μ L di cDNA del campione in esame o di controllo positivo oppure acqua (nei pozzetti *no template control*, NTC).

Tabella 6:

STEP	TEMPERATURA	TEMPO	CICLI
Attivazione	50°C	2'	1
Attivazione DNA pol	95°C	10'	1
Denaturazione	95°C	15''	45
Anneal/ Allungamento	60°C	1'	45
Curva di Melting	60°C -> 95°C	1'	1

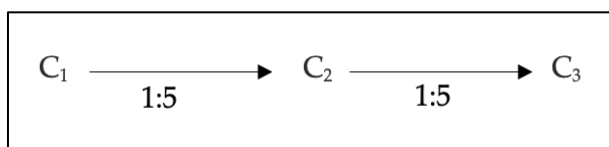
L'analisi della curva di *melting* è una valutazione delle caratteristiche di dissociazione del dsDNA e avviene mediante un processo di denaturazione degli amplificati presenti in soluzione. Man mano che la temperatura viene fatta aumentare, il doppio filamento inizia a denaturarsi, causando una forte riduzione di fluorescenza, rilevabile dal termociclatore, questa verrà registrata ed associata quindi a una T caratteristica (picco). La temperatura a cui il 50% del DNA è denaturato è nota come temperatura di *melting* (T_m). Il grafico lineare viene prodotto dal macchinario, ma è solitamente mostrato come funzione della derivata prima negativa (-dF/dT) in modo da essere interpretabile più agilmente,

in questo modo i picchi sono facilmente identificabili. È auspicabile la presenza di un solo picco, più picchi possono indicare, ad esempio, la presenza di dimeri di primer e/o prodotti aspecifici.

4.6 Utilizzo della curva standard per il calcolo dell'efficienza

La curva standard è una metodologia che può essere utilizzata per calcolare l'efficienza di amplificazione di una determinata reazione e dei suoi *primer* specifici. La concentrazione iniziale di cDNA viene dedotta dalla quantità di RNA inserito nella reazione di retrotrascrizione, questo verrà definita come C_1 . Vengono allestite delle diluizioni seriali con fattore 1/5 schematizzate nel modo seguente. Ogni diluizione verrà caricata nella piastra da qPCR in triplicato.

Le mix di reazione utilizzate sono quelle descritte nei paragrafi precedenti.



Come *output* otterrò l'equazione di una retta $y = mx + q$ in cui m (coefficiente angolare) rappresenta il rapporto incrementale tra le due variabili x e y mentre q (intercetta) rappresenta il punto dell'intersezione con l'asse y . Sull'asse x (variabile indipendente) verrà posta la quantità delle rispettive diluizioni, nell'asse y (variabile dipendente) saranno rappresentati i cicli soglia (C_t). Il coefficiente angolare viene invece usato per quantificare la pendenza della retta e calcolare quindi l'efficienza di amplificazione utilizzando la seguente formula:

$$\text{Efficienza} = (10^{(-1/\text{pendenza})}) - 1$$

L'Efficienza di amplificazione è inversamente proporzionale alla pendenza della retta di regressione. Essa viene influenzata dalla qualità e della specificità del disegno del *primer* e della sua sonda (formazione di dimeri, *hairpin*, quantità GC), dalla qualità delle diluizioni e dall'utilizzo dei corretti parametri di reazione come la $T^{\circ}_{\text{annealing}}$ e le concentrazioni del *primer* e della sonda. I valori di pendenza ideali si dovrebbero attestare tra $-3,1 > \text{pendenza} > -3,6$ poiché garantiscono un'efficienza tra il 90% e il 110%, valori sopra il 100% sono possibili a causa dell'inibizione della DNA polimerasi. Si calcola poi il coefficiente di determinazione o R^2 , indice che misura il legame tra la variabilità dei dati e la correttezza del modello statistico utilizzato.

Il valore di R^2 corr dovrà essere superiore a 0,98 per essere ritenuto sufficiente in una reazione di amplificazione.

5. RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1 Allestimento delle curve standard con metodica TaqMan per i trascritti *SYT-SSX1* e *SYT-SSX2*: analisi dei risultati e discussione

Per testare l'efficienza dei saggi di PCR per i trascritti di fusione *SYT-SSX1* e *SYT-SSX2* è stata allestita una curva standard con metodica TaqMan.

Si preparano delle diluizioni seriali con un fattore di 1:5 di cDNA positivi per le fusioni. Le diluizioni che abbiamo preparato hanno come concentrazione:

per *SYT-SSX1*, $C_1=15\text{ng}/\mu\text{L}$, $C_2=3\text{ng}/\mu\text{L}$ e $C_3=0,6\text{ng}/\mu\text{L}$

per *SYT-SSX2*, $C_1=20\text{ng}/\mu\text{L}$, $C_2=4\text{ng}/\mu\text{L}$ e $C_3=0,8\text{ng}/\mu\text{L}$.

Si prepara dunque la mix di PCR come da Tab. 3 e si aliquota nei pozzetti della piastra ai quali verrà aggiunto $1\ \mu\text{L}$ di cDNA delle diverse diluizioni. Ogni concentrazione è stata testata in triplicato in modo da ottenere dati significativi a livello statistico. Verrà caricato anche un controllo negativo incrociato (per *SYT-SSX1* sarà *SSX2* e viceversa) e un NTC. Il ciclo di reazione è lo stesso riportato in Tab 4. Al termine della reazione di PCR vengono restituite le curve di amplificazione e le curve standard. Lo strumento utilizzato è il QuantStudio 5 Dx Real-Time PCR System mentre l'elaborazione e l'analisi dei dati sono stati effettuati con il software proprietario QuantStudio 5 Dx Software v1.0.2.

5.1.1 Analisi della curva standard del trascritto di fusione *SYT-SSX1*

Nella curva di amplificazione (Fig. 4A) si nota la dipendenza tra concentrazione di partenza e ciclo soglia Ct:

$C_1=15\text{ng}/\mu\text{L} \rightarrow \text{Ct}=25$

$C_2=3\text{ng}/\mu\text{L} \rightarrow \text{Ct}=29$

$C_3=0,6\text{ng}/\mu\text{L} \rightarrow \text{Ct}=31$

Il controllo negativo (*SSX2*) e il NTC non vengono amplificati. Questa è un'indicazione positiva poiché ci permette di verificare che i *primer* e la relativa sonda non amplificano anche *SYT-SSX2* in maniera aspecifica, ma solamente i campioni di *SYT-SSX1*.

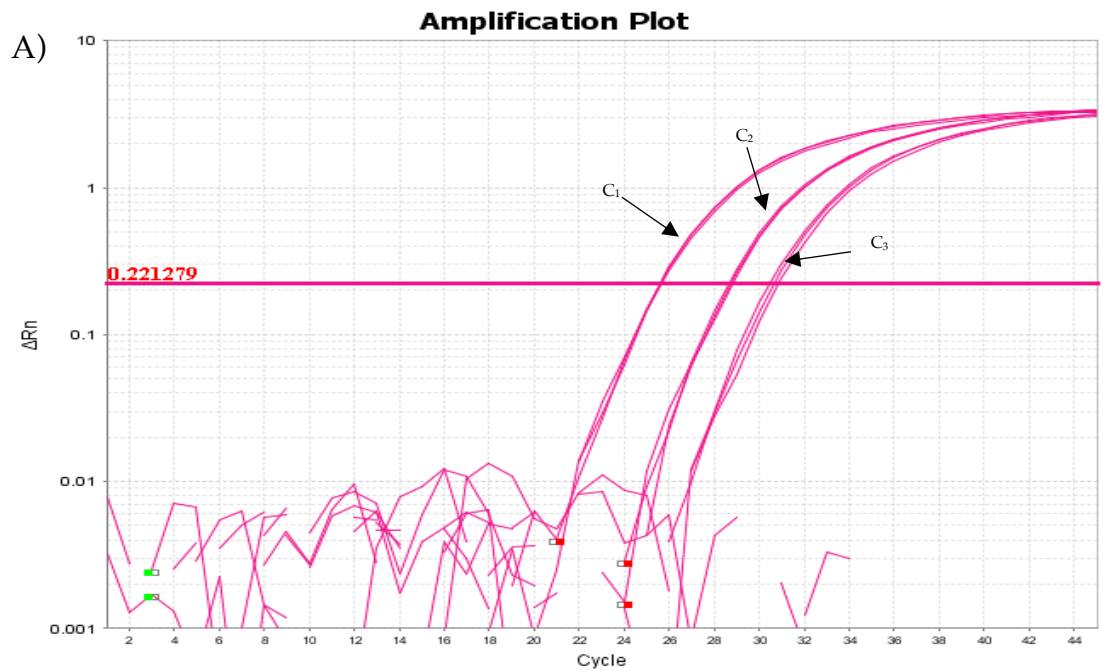
La curva standard (Fig. 4B) invece restituisce i seguenti parametri:

Slope: -3,606

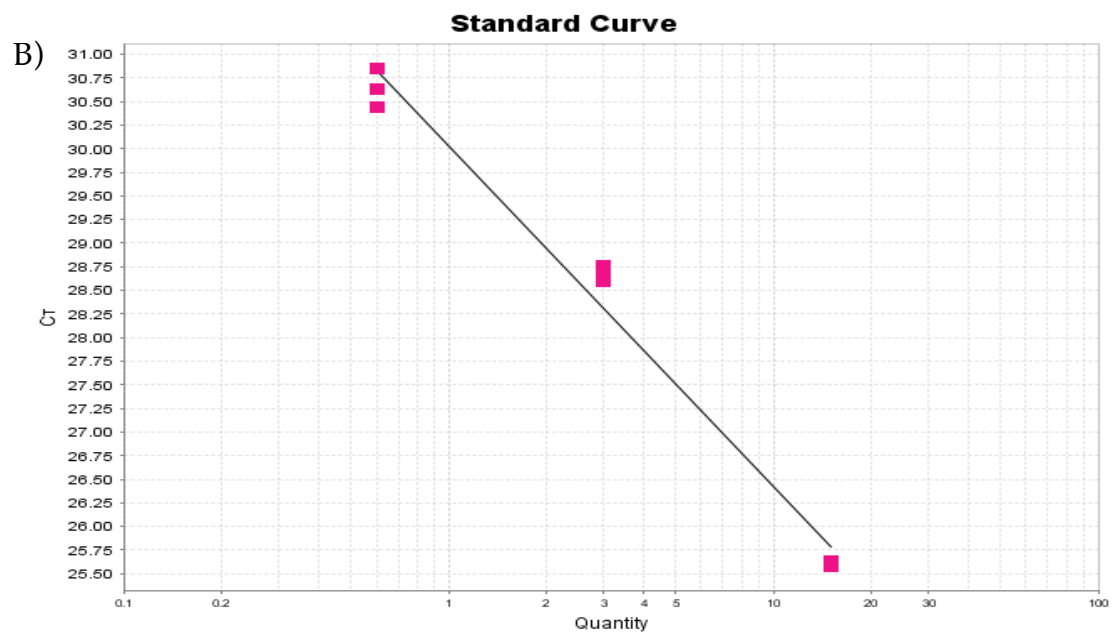
R^2 : 0,981

Efficienza: 89,385%

Questi parametri sono buoni ed indicano che il saggio funziona correttamente, in quanto R^2 è superiore a 0,98 (0,981) e l'efficienza è prossima al 90% (89,385%) senza che vi siano amplificazioni aspecifiche di *SYT-SSX2*.



■ SYT/SSX1



Target: SYT/SSX1 Slope: -3.606 Y-Inter: 30.026 R^2 : 0.981 Eff%: 89.385 Error: 0.188

■ SYT/SSX1 ■ SYT/SSX2

Figura 4 - Amplification Plot di SYT-SSX1 (A) e Curva Standard di SYT-SSX1 (B).

Nel grafico A sono state inserite le concentrazioni di campione relative alle specifiche curve di amplificazione (C_1 - C_2 - C_3), si può quindi apprezzare la relazione tra concentrazione di SYT-SSX1 e C_t . Nel grafico B è rappresentata la curva standard ottenuta con le diluizioni scalari dalla quale pendenza si ricava l'efficienza di reazione.

5.1.2 Analisi della curva standard del trascritto di fusione SYT-SSX2

Anche nella curva di amplificazione di SYT-SSX2 (Fig. 6A) si nota la dipendenza tra concentrazione di partenza e ciclo soglia Ct:

$C_1=20\text{ng}/\mu\text{L} \rightarrow \text{Ct}=31$

$C_2=4\text{ng}/\mu\text{L} \rightarrow \text{Ct}=33$

$C_3=0,8\text{ng}/\mu\text{L} \rightarrow \text{Ct}=35$.

In questo caso il controllo negativo (SSX1) viene amplificato, ma ad un ciclo soglia superiore a 40, mentre il NTC non viene amplificato. Per verificare se il segnale di amplificazione superiore ai 40 cicli è specifico o meno abbiamo allestito una corsa con metodica SYBR Green in quanto ci permette di analizzare anche la curva di *melting* (vedi paragrafo 5.2).

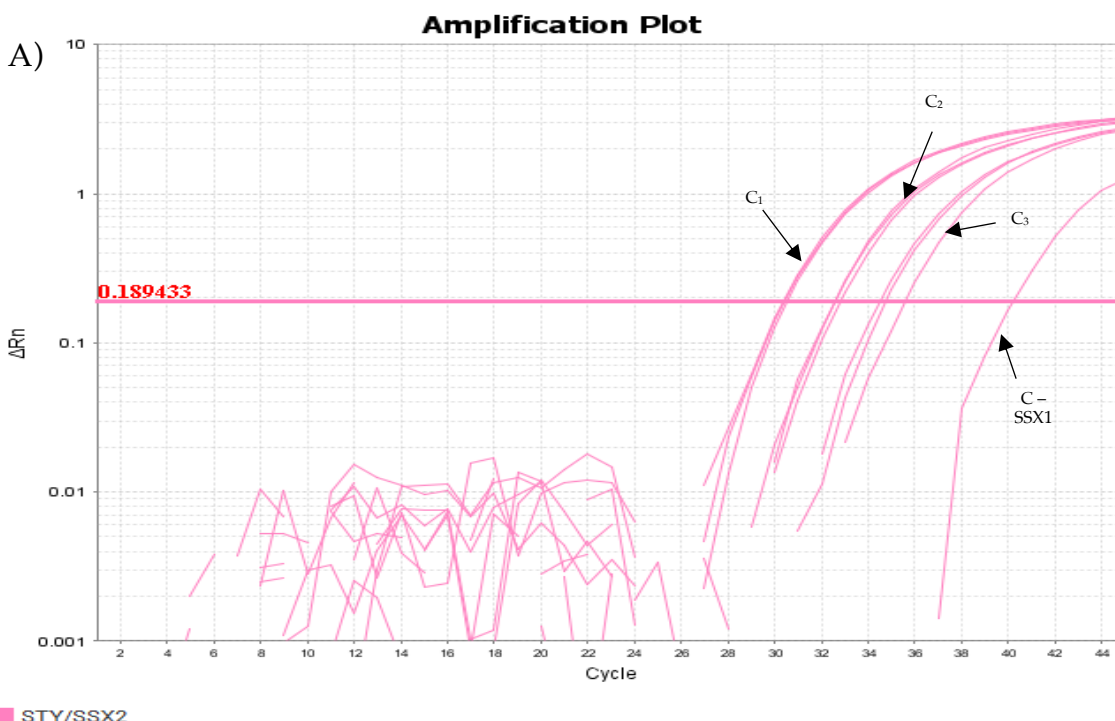
La curva standard (Fig. 6B) invece restituisce i seguenti parametri:

Slope: -3,226

R^2 : 0,978

Efficienza: 104,147%

Questi parametri sono buoni ed indicano che il saggio funziona correttamente, in quanto R^2 è prossimo a 0,98 (0,978) e l'efficienza è superiore al 90% (104,147%) e inferiore a 110%.



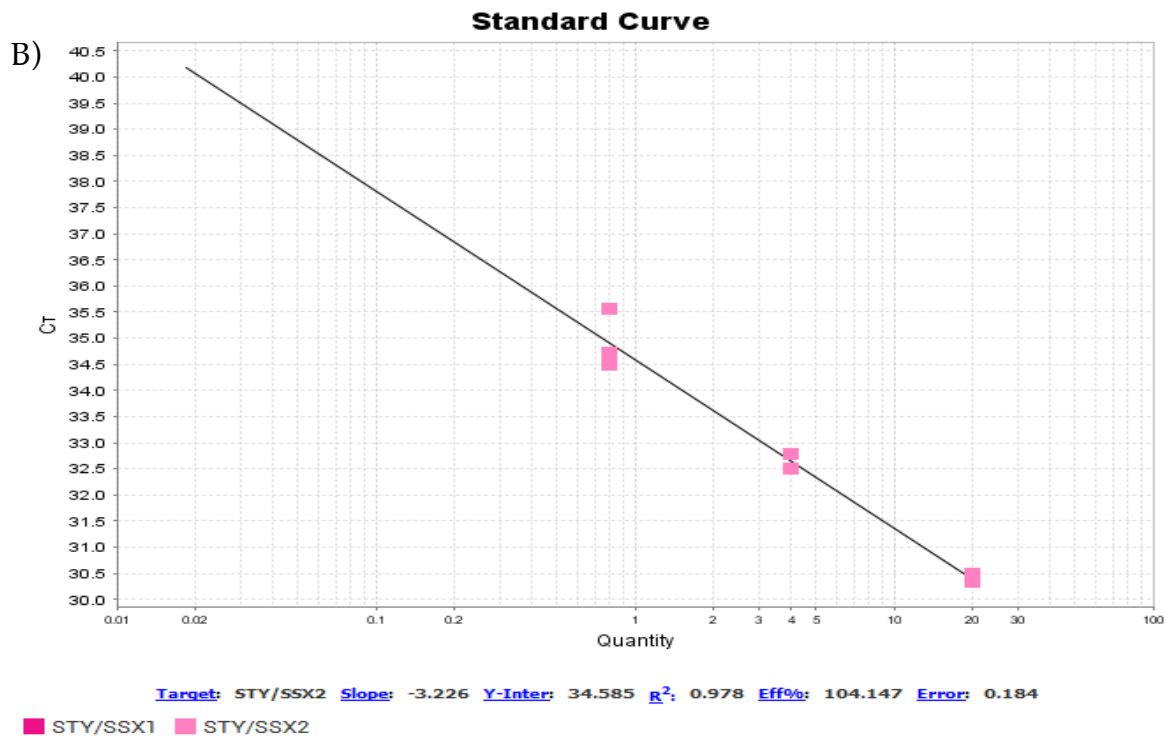


Figura 6 - Amplification plot di SYT-SSX2 (A) e curva standard di SYT-SSX2 (B).

Nel grafico (A) sono state inserite le concentrazioni di campione relative alle specifiche curve di amplificazione (C₁-C₂-C₃ e C-), si può notare la relazione tra concentrazione di SYT-SSX2 e Ct, a valori di Ct > 40 avviene l'amplificazione del controllo negativo SSX1 che supera il valore di *Baseline*. Nel grafico (B) è rappresentata la curva standard ottenuta con le diluizioni scalari dalla quale si ricava l'efficienza di reazione.

5.2 Amplificazione e Curve di *Melting* con metodica SYBR Green per il trascritto di fusione SYT-SSX2: analisi dei risultati e discussione

Viene allestita una qPCR con metodica SYBR Green per valutare la specificità del saggio SYT-SSX2 mediante l'analisi della curva di *melting*. La qPCR viene allestita come descritto nel paragrafo 4.5.

Dai risultati riportati in Fig. 8A si nota la corretta amplificazione di SYT-SSX2 ad un valore Ct di 31, tuttavia anche il controllo negativo SYT-SSX1 viene amplificato ad un Ct di 37, mentre il NTC non viene invece amplificato. Questo suggerisce che ad alti valori di Ct i *primer* potrebbero amplificare in modo aspecifico anche il trascritto di fusione SYT-SSX1.

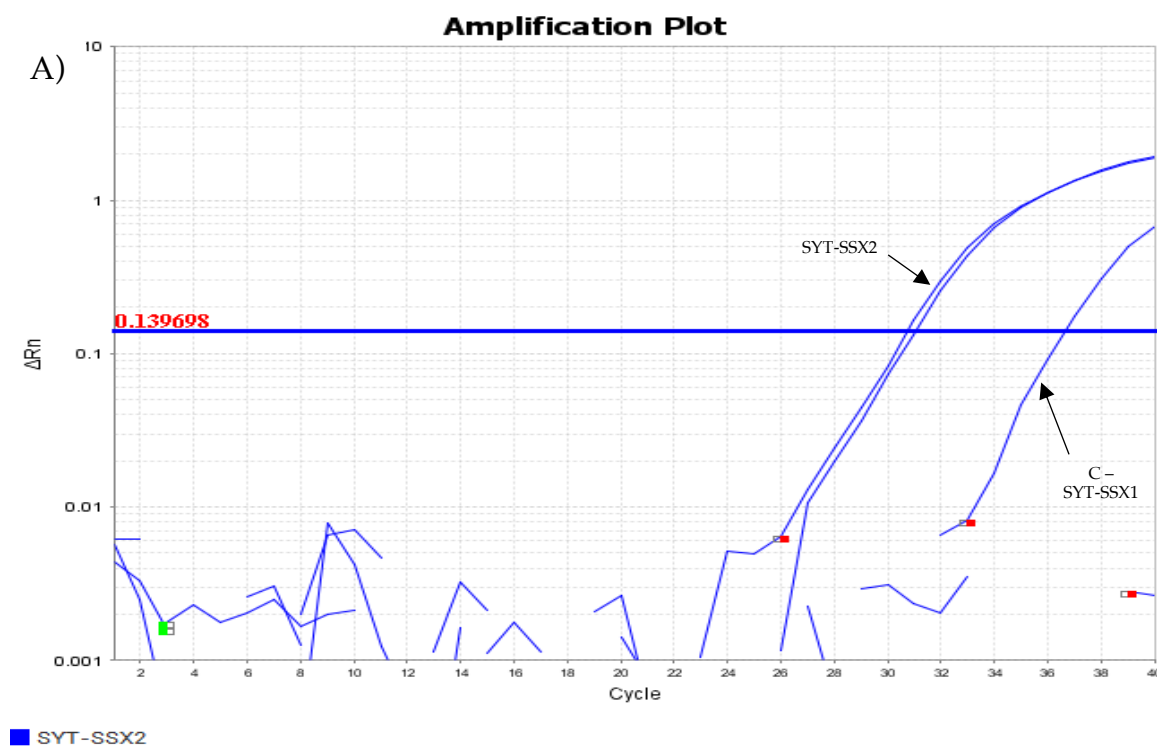
Data la similarità di sequenza dei primer SYT-SSX1 e SYT-SSX2 questa è una concreta possibilità che va esaminata analizzando le curve di *melting*.

L'analisi delle curve di *melting* (Fig. 8B) suggerisce che SYT-SSX2 viene amplificato in modo corretto (un unico amplicone con T_m= 81,5°C). La curva di *melting* relativa all'amplificazione del controllo negativo (dove come template si utilizza un cDNA di un paziente positivo per SYT-SSX1), presenta invece un picco con T_m di 6°C inferiore a quello di SYT-SSX2 e a bassi livelli di fluorescenza, suggerendo che i *primer*, solo in assenza del cDNA stampo target SYT-SSX2, possono legarsi in modo aspecifico ad un cDNA omologo come quello

portante la fusione complementare SYT-SSX1. In conclusione, la co-presenza in un campione del trascritto di fusione SYT-SSX1 e SYT-SSX2 non è possibile in quanto la traslocazione cromosomica t(X;18)(p11.2;q11.2) è mutualmente esclusiva. Tuttavia, nel caso di un campione contenente il trascritto di fusione SYT-SSX1 potrebbe verificarsi una modesta amplificazione da parte dei primer specifici per SYT-SSX2. L'ipotesi è che i primer specifici per SYT-SSX2 abbiano una modesta affinità anche per il trascritto di fusione SYT-SSX1, suggerendo la possibilità di ulteriori modifiche alle loro sequenze per migliorarne ulteriormente la specificità.

Grazie ai dati ottenuti dall'analisi dei risultati mediante metodica SYBR Green possiamo concludere che anche il saggio per SYT-SSX2 funziona correttamente, in quanto ha dimostrato buona specificità. Infatti, un basso segnale aspecifico si evidenzia solo in assenza del DNA *target* SYT-SSX2 e ciò non inficia i risultati che si ottengono.

I saggi sono stati testati utilizzando campioni bioptici di tessuto giunti al laboratorio di Oncoematologia Pediatrica dell'Istituto di Ricerca Pediatrica di Padova (Città della Speranza) per lo svolgimento delle indagini molecolari e successivamente conservati per scopi di ricerca, sono stati impiegati inoltre campioni di cDNA conservati e provenienti sempre da campioni di pazienti affetti da SS dai quali campioni bioptici era già stato estratto in precedenza l'RNA totale, retrotrascritto a cDNA e conservato come tale. Data la rarità del SS pediatrico non è stato possibile svolgere una validazione con un numero di campioni maggiore.



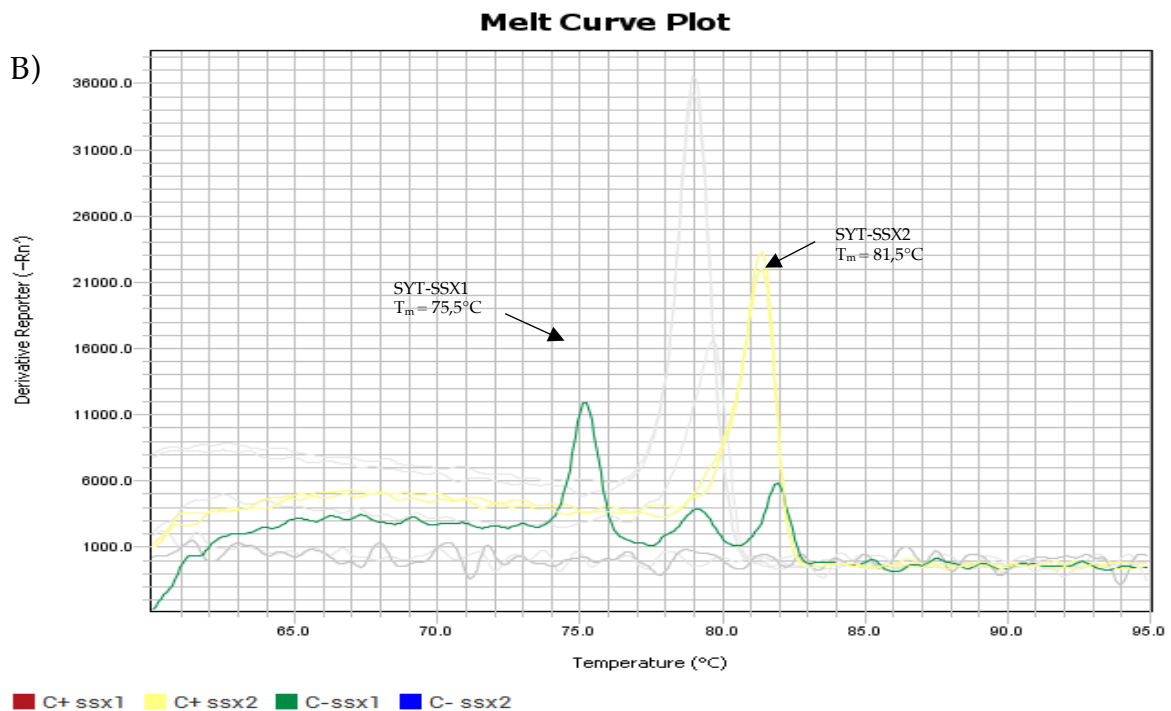


Figura 8 - Amplification Plot SYBR Green di SYT-SSX2 (A) Curva di Melting (-dF/dT) SYBR Green di SYT-SSX2 (B).

Nel grafico (A) si noti il controllo positivo SYT-SSX2 viene amplificato con un Ct di 31, tuttavia anche il controllo negativo SYT-SSX1 viene amplificato a Ct di 37. Nel grafico (B) la curva di melting evidenzia come nei pozzetti in cui è presente SYT-SSX2 vi è un solo picco netto; il controllo negativo ha un picco a 75,5°C a bassa fluorescenza.

6. CONCLUSIONI

Premessa la mutuale esclusività della presenza, in un campione, dei trascritti di fusione SYT-SSX1 e SYT-SSX2 e posti i valori soglia $R^2 > 0,98$ ed $90\% < \text{Efficienza} < 110\%$, i saggi presentano le seguenti caratteristiche:

SYT-SSX1: $R^2: 0,98$ Efficienza: 89,38%
 SYT-SSX2: $R^2: 0,98$ Efficienza: 104,15%

L'efficienza del saggio per SYT-SSX1 risulta prossima all'intervallo inferiore di efficienza accettabile e con una buona specificità di amplificazione, ulteriori indagini su più campioni contenenti i trascritti di fusione SYT-SSX1/2 garantiranno una maggiore robustezza dei dati ottenuti. Possiamo comunque concludere che i saggi siano da considerarsi validati ed utilizzabili nelle applicazioni di diagnostica molecolare nell'iter diagnostico di un paziente sospetto di essere affetto da SS pediatrico.

7. BIBLIOGRAFIA

Alaggio R, Coffin CM, Vargas SO. *Soft Tissue Tumors of Uncertain Origin. Pediatric and Developmental Pathology*. 2012;15(1_suppl):267-305. doi:10.2350/11-08-1079-PB.1

Sultan I, Rodriguez-Galindo C, Saab R, Yasir S, Casanova M, Ferrari A. *Comparing children and adults with synovial sarcoma in the Surveillance, Epidemiology, and End Results program, 1983 to 2005: an analysis of 1268 patients*. *Cancer*. 2009 Aug 1;115(15):3537-47. doi: 10.1002/cncr.24424. PMID: 19514087.

Brodin B, Haslam K, Yang K, Bartolazzi A, Xie Y, Starborg M, Lundeberg J, Larsson O. *Cloning and characterization of spliced fusion transcript variants of synovial sarcoma: SYT/SSX4, SYT/SSX4v, and SYT/SSX2v. Possible regulatory role of the fusion gene product in wild type SYT expression*. *Gene*. 2001 May 2;268(1-2):173-82. doi: 10.1016/s0378-1119(01)00412-7. PMID: 11368913.

Stacchiotti S, Van Tine BA. *Synovial Sarcoma: Current Concepts and Future Perspectives*. *J Clin Oncol*. 2018 Jan 10;36(2):180-187. doi: 10.1200/JCO.2017.75.1941. Epub 2017 Dec 8. PMID: 29220290.

Gazendam AM, Popovic S, Munir S, Parasu N, Wilson D, Ghert M. *Synovial Sarcoma: A Clinical Review*. *Curr Oncol*. 2021 May 19;28(3):1909-1920. doi: 10.3390/curroncol28030177. PMID: 34069748; PMCID: PMC8161765.

Feng X, Huang YL, Zhang Z, Wang N, Yao Q, Pang LJ, Li F, Qi Y. *The role of SYT-SSX fusion gene in tumorigenesis of synovial sarcoma*. *Pathol Res Pract*. 2021 Jun;222:153416. doi: 10.1016/j.prp.2021.153416. Epub 2021 Mar 24. PMID: 33848939.

Pretto D, Barco R, Rivera J, Neel N, Gustavson MD, Eid JE. *The synovial sarcoma translocation protein SYT-SSX2 recruits beta-catenin to the nucleus and associates with it in an active complex*. *Oncogene*. 2006 Jun 22;25(26):3661-9. doi: 10.1038/sj.onc.1209413. Epub 2006 Feb 6. PMID: 16462762.

Mocellin S. *Soft Tissue Tumors, A Practical and Comprehensive Guide to Sarcomas and Benign Neoplasms*. Springer. 2021 Dec.

Xiong L, Chen Z, Zhou Y, Li H, Xiao T. *The survival and prognosis analysis of synovial sarcoma subtypes: a Surveillance, Epidemiology, and End Results population-based analysis*. *Int Orthop*. 2020 Dec;44(12):2779-2786. doi: 10.1007/s00264-020-04708-5. Epub 2020 Sep 3. PMID: 32880003.

Cho YJ, Kim SH, Kim EK, Han JW, Shin KH, Hu H, Kim KS, Choi YD, Kim S, Lee YH, Suh JS, Ahn JB, Chung HC, Noh SH, Rha SY, Jung ST, Kim HS. *Prognostic implications of polycomb proteins ezh2, suz12, and eed1 and histone modification by H3K27me3 in sarcoma*. *BMC Cancer*. 2018 Feb 7;18(1):158. doi: 10.1186/s12885-018-4066-6. PMID: 29415665; PMCID: PMC5804074.