

Ibridazione *in situ*

Come detto in precedenza, è possibile evidenziare la presenza e la localizzazione di specifiche sequenze di DNA o RNA in una cellula o un tessuto utilizzando sequenze complementari di nucleotidi, opportunamente marcate.

Mentre la presenza di una certa sequenza di DNA indica **la presenza del gene**, la presenza della corrispondente sequenza di mRNA indica **l'espressione** del gene.

Poiché l'appaiamento di sequenze complementari di nucleotidi è detta ibridazione, quando l'ibridazione viene effettuata su cellule o tessuti si parla di **ibridazione *in situ* (ISH)**.

L'ibridazione può essere effettuata tra due filamenti di DNA, tra due filamenti di RNA o tra un filamento di RNA e uno di DNA. L'ibrido DNA-RNA però è meno stabile. Le sequenze nucleotidiche utilizzate per cercare l'acido nucleico presente nel campione vengono dette genericamente "sonde".

I problemi sono molto diversi se si vuole verificare la presenza o localizzazione di un gene o la sua espressione.

Ibridazione *in situ* per il DNA (cercare la presenza di un gene)

Mentre le proteine e gli mRNA sono singole molecole, i geni sono segmenti di DNA inseriti nei cromosomi. Nei cromosomi il DNA è compattato sotto forma di cromatina più o meno condensata. Nell'interfase (la fase che precede o segue la mitosi), i cromosomi sono dispersi nel nucleo e non sono distinguibili al microscopio ottico; durante la mitosi i cromosomi si condensano e diventano visibili.

Il cromosoma metafaseico è la forma più compattata della cromatina; è costituito da due CROMATIDI FRATELLI, che sono identici, perchè sono il frutto della replicazione del DNA, che avviene durante l'interfase. Ogni specie ha un suo numero caratteristico di cromosomi diversi, che è indicato con n , che è il numero di cromosomi del genoma APLOIDE, nell'uomo è pari a 23, in Drosophila 4, nella patata 24 ecc. Nelle cellule somatiche della maggior parte degli organismi c'è una coppia di cromosomi per ogni tipo: il genoma di queste cellule è quindi DIPLOIDE ($2n$); i due cromosomi di ogni coppia sono detti cromosomi OMOLOGHI, e sono ereditati alla fecondazione uno dal padre e uno dalla madre; i due cromosomi omologhi, che derivano da individui diversi, non sono identici, perchè ogni gene può presentare diverse forme (ALLELI) che differiscono nella sequenza nucleotidica. Se un individuo porta due alleli identici per lo stesso gene è detto OMOZIGOTE per quel carattere, se gli alleli sono diversi, è detto ETEROZIGOTE. L'immagine del corredo completo di cromosomi di una specie o di un individuo, che si può ottenere estraendo i cromosomi integri da cellule in metafase, costituisce il CARIOTIPO.

Per evidenziare l'eventuale presenza di un certo gene si può fare l'ibridazione *in situ* su nuclei interfaseici o su cromosomi metafaseici; in quest'ultimo caso si potrà anche identificare su quale/i cromosomi il gene si trova, e la sua posizione nel cromosoma stesso. Sarà però necessario disporre di un sufficiente numero di cellule in divisione.

Preparazione della sonda

La sonda consiste in una sequenza di DNA corrispondente al gene da cercare. Bisogna quindi isolare il frammento di DNA corrispondente al gene in questione. Questo è possibile mediante gli ENZIMI DI RESTRIZIONE, enzimi di origine batterica, che tagliano il DNA a livello di specifiche sequenze. Poiché esistono moltissime classi di enzimi di restrizione che tagliano sequenze diverse, è possibile tagliare il DNA in frammenti che contengono uno specifico gene e separarli su gel. Alcuni enzimi di restrizione tagliano in punti diversi i due filamenti, lasciando un'estremità a filamento singolo. Questo consente non solo di tagliare il DNA, ma anche di legare frammenti fra loro, grazie alla complementarietà delle estremità. Il frammento di DNA di interesse può quindi essere inserito nel DNA di un "vettore" come un virus o un plasmide. I plasmidi sono molecole circolari di DNA che si replicano indipendentemente dal genoma. Cellule batteriche vengono quindi **transfettate** con i plasmidi contenenti il frammento di interesse e coltivate; la moltiplicazione delle cellule batteriche comporta anche la rapida replicazione dei plasmidi, che possono poi essere estratti rompendo le cellule. I frammenti di interesse possono quindi essere recuperati nuovamente, tagliando i plasmidi con gli opportuni enzimi di restrizione.

Un altro modo di amplificare sequenze di DNA è la PCR (reazione a catena della polimerasi): il frammento di DNA da amplificare viene riscaldato per separare i due filamenti, raffreddato in presenza di due iniziatori (primer: brevi sequenze di nucleotidi ciascuna complementare a una delle estremità del frammento da clonare), incubato in presenza di DNA polimerasi e nucleotidi trifosfati, in modo che ciascuno dei due filamenti si replica; il ciclo viene ripetuto più volte ed ogni volta il numero di copie raddoppia.

La sonda deve essere sufficientemente lunga per ridurre la probabilità di ibridare con tratti di DNA non corrispondenti al gene che si cerca, ma non talmente lunga da impedire la penetrazione.

Marcatura della sonda

La sonda può venire marcata somministrando nucleotidi marcati durante la replicazione o legando direttamente il marcatore alla sonda. Come nel caso dell'immunocitochimica, i marcatori possono essere di diverso tipo (vedi sotto) e il metodo di marcatura può essere diretto o indiretto.

Preparazione del materiale

Se si intende fare un'ibridazione in situ su nuclei interfascici, il materiale biologico di partenza può essere costituito da cellule o pezzetti di tessuto. I nuclei possono essere estratti dalle cellule con opportune tecniche (ad esempio trattamento con soluzioni ipotoniche, che provocano lo scoppio della cellula, nel caso di cellule animali) e dispersi su un vetrino. Nel caso di ibridazione su cromosomi, bisognerà utilizzare cellule in metafase. Si può cercare di aumentare la percentuale di cellule in metafase sincronizzando la divisione cellulare nel tessuto, e/o bloccando le cellule in metafase trattando per un certo tempo con inibitori del fuso mitotico (ad es. colchicina), che impediscono la separazione dei cromatidi. I cromosomi estratti dalle cellule in metafase dovranno poi essere ben separati e distribuiti sul vetrino.

Ibridazione

I vetrini con i nuclei o i cromosomi vengono innanzi tutto trattati con RNasi per evitare l'ibridazione della sonda con l'RNA, e con proteinasi per favorire la penetrazione della sonda.

Poiché il DNA del tessuto e della sonda è a doppio filamento, perché l'ibridazione possa avvenire è necessario "aprire" il doppio filamento (denaturare il DNA), ad alta temperatura o ad alto pH: in queste condizioni i legami che tengono insieme i due filamenti sono meno stabili e la doppia elica si apre; se si riabbassa la temperatura i due filamenti complementari tendono a riappaiarsi. La denaturazione è influenzata dalla composizione del DNA, in quanto i legami GC sono più stabili (3 ponti idrogeno) dei legami AT (2 ponti idrogeno). Perciò la temperatura di fusione (melting point: la temperatura alla quale il 50% del DNA è denaturato) dipende dalla percentuale di coppie GC. Le condizioni di ibridazione e i successivi lavaggi sono importanti per evitare attacchi aspecifici della sonda: l'appaiamento perfetto della sonda con il DNA del campione è stabile a una temperatura più alta rispetto ad eventuali appaiamenti imperfetti; condizioni di "alta stringenza", cioè alta temperatura e basso sale prevengono attacchi aspecifici.

Rilevamento del segnale

Anche in questo caso, come per l'immunocitochimica, si possono usare metodi diretti (sonda direttamente marcata con fluorocromo) o indiretti con diversi sistemi di amplificazione del segnale (ad esempio: DNA marcato con sostanza riconoscibile da anticorpi; DNA marcato con biotina + streptavidina legata a fluorocromo; DNA marcato con biotina + streptavidina coniugata con fosfatasi alcalina + somministrazione del substrato e formazione del precipitato fluorescente). In ogni caso bisognerà controcolorare nuclei o cromosomi con un colorante per il DNA per vedere la localizzazione del segnale.

Applicazioni della FISH (fluorescence in situ hybridization) per il DNA

- verificare la presenza di un gene o un cromosoma e il numero di copie in cui è presente
- verificare su quale/i cromosoma il gene si trovi
- verificare la reciproca disposizione di più geni su un cromosoma
- verificare la presenza di possibili mutazioni
- confrontare genomi di organismi diversi
- verificare la presenza nel tessuto di virus o microrganismi (ad esempio: virus del papilloma)

Ibridazione in situ (ISH) per l'mRNA

Mentre l'ibridazione in situ per il DNA mette in evidenza la presenza di un certo gene, l'ibridazione in situ per l'mRNA ne mette in evidenza l'eventuale espressione. Mentre un gene è generalmente presente in tutte le cellule di un organismo, non necessariamente è espresso in tutti i tessuti.

“Vedere” l'espressione di un certo gene comporta cercare in un campione l'mRNA corrispondente al gene di interesse, mediante ibridazione con una sonda complementare, direttamente o indirettamente marcata.

L'ISH per l'mRNA presenta alcuni problemi specifici rispetto all'ISH per il DNA. Mentre il DNA è costituito da due filamenti complementari, l'mRNA è costituito da un singolo filamento e quindi la sequenza di mRNA dipende da quale filamento del DNA è trascritto. Inoltre nella sequenza del gene sono presenti tratti di DNA non codificante (INTRONI), che vengono inizialmente trascritti, ma vengono recisi durante la maturazione dell'mRNA; perciò la sequenza dell'mRNA non corrisponde alla sequenza del gene. Per preparare le sonde per l'mRNA, quindi, si parte dalla sequenza dell'mRNA e non dal gene. Un'altra possibilità è quella di risalire alla sequenza di nucleotidi sulla base della sequenza proteica, tenendo conto della corrispondenza fra amminoacidi e triplette di nucleotidi.

Per preparare le sonde dall'mRNA, si sfrutta un enzima virale, la trascrittasi inversa, cioè una DNA polimerasi che usa RNA come stampo, prodotta da un gruppo di virus a RNA.

I virus sono elementi genetici (RNA o DNA) mobili, racchiusi da un rivestimento proteico (capside). L'acido nucleico codifica per le proteine del capsido e per enzimi coinvolti nella propria replicazione. Il virus si serve del macchinario di una cellula ospite per replicarsi.

Un gruppo di virus a RNA, detti **Retrovirus**, contiene una trascrittasi inversa che, sullo stampo dell'RNA, produce un filamento complementare di DNA, dal quale si forma poi la doppia elica di DNA. Questa si integra nel genoma della cellula ospite, trasformandola. Il DNA integrato nel genoma può restare inattivo per lungo tempo, ma può invece venire trascritto, producendo molte molecole di RNA virale, che vengono tradotte per produrre le proteine virali; RNA e proteine virali vengono quindi assemblati in nuove particelle virali.

La trascrittasi inversa permette di sintetizzare in vitro DNA complementare all' mRNA, che viene detto cDNA. Il cDNA ha la sequenza priva degli introni e può essere usato per la preparazione della sonda.

Preparazione della sonda

Si estrae l'RNA da un tessuto in cui il gene è sicuramente espresso e si retrotrascrive il cDNA dall'mRNA di interesse. Si ottiene una copia di cDNA a doppio filamento, che viene inserita in un opportuno plasmide. I tratti di cDNA vengono recisi dal plasmide con opportuni enzimi di restrizione, e trascritti singolarmente in vitro, in modo da produrre due tipi di RNA, ciascuno complementare a uno dei due filamenti di cDNA. Un filamento di RNA sarà complementare all'mRNA (RNA “antisenso”), e quindi sarà in grado di legarsi al mRNA presente nel campione, e costituirà la sonda; l'altro filamento sarà uguale all'mRNA (RNA “senso”), e quindi non in grado di legarsi, e potrà essere usato come controllo negativo.

Marcatura della sonda

Analogamente a quanto detto per le sonde per il DNA, la sonda può venire marcata somministrando nucleotidi marcati durante la trascrizione in vitro o legando direttamente il marcatore alla sonda. Mentre nell'ISH per il DNA in genere si usano marcatori fluorescenti, nel caso dell'ISH per verificare l'espressione dei geni si preferisce la marcatura con enzimi che danno precipitato colorato, perché questo permette di vedere contemporaneamente la marcatura e la struttura del tessuto.

Preparazione del materiale

L'RNA è poco stabile ed è facilmente degradato da RNAsi che sono presenti anche sulla pelle. Bisogna perciò proteggere l'RNA dalla degradazione in tutti i passaggi. Se il materiale è costituito da sezioni in paraffina, bisognerà sparaffinare i vetrini per consentire la penetrazione della sonda. Se il materiale è di piccole dimensioni, con opportune permeabilizzazioni l'ibridazione si potrà fare sul materiale intatto. Questa tecnica è molto usata per studiare la localizzazione dell'espressione dei geni durante lo sviluppo embrionale.

Ibridazione

I vetrini con il campione vengono incubati con la sonda in opportune condizioni. Se l'mRNA complementare alla sonda è presente, si forma un ibrido RNA-RNA sul preparato e il legame tra i due filamenti resiste agli opportuni lavaggi. Si potrà quindi vedere la marcatura e la sua distribuzione sul tessuto.

Come nel caso dell'immunocitochimica, anche qui è possibile avere "falsi negativi" e "falsi positivi". Falsi negativi si hanno quando non si vede segnale, anche se in realtà il gene in quel campione è espresso. Questo può essere dovuto alla degradazione dell'mRNA o della sonda, alla mancata penetrazione della sonda o a una sua eccessiva diluizione, o ad una scarsa amplificazione del segnale. Per risolvere questi problemi conviene verificare l'efficacia di tutto il protocollo su un campione nel quale il gene sia sicuramente espresso (controllo positivo).

Per verificare invece che un risultato positivo non sia dovuto ad attacchi aspecifici, è necessario allestire una serie di controlli negativi, nei quali non ci deve essere segnale: per esempio compiendo le stesse operazioni

- in un materiale analogo, in cui il gene certamente non è espresso e quindi l'mRNA non è presente
- nello stesso materiale, pretrattato con RNAsi, in cui quindi l'mRNA complementare alla sonda eventualmente presente nel campione originario è stato degradato
- nello stesso materiale, utilizzando una sonda senso, cioè la sonda che ha la stessa sequenza del mRNA e quindi non può ibridare