



Numero a cura di:
Carola Cavallo

Laboratorio RAMSES, IRCCS Istituto
Ortopedico Rizzoli, 40136 Bologna



Il ruolo della PCR e delle analisi molecolari nella scienza di base in Ortopedia

La Polymerase Chain Reaction (PCR), o reazione a catena della polimerasi, è una tecnica di biologia molecolare che permette di amplificare porzioni specifiche di DNA in vitro grazie all'azione della DNA polimerasi, un enzima in grado di sintetizzare un filamento di DNA utilizzando il filamento complementare come stampo. Grazie alla sua semplicità e versatilità la PCR ha trovato largo impiego in diversi ambiti quali laboratori di genetica, biochimica, microbiologia, oncologia, ma anche in medicina forense, in botanica ed in zoologia e, non ultimo, in campo ortopedico. In quest'ultimo la PCR è utilizzata per valutare l'espressione genica di fattori coinvolti nei processi patologici e riparativi del sistema muscolo-scheletrico, al fine di identificare target biologici, valutare strategie terapeutiche e studiare i meccanismi di rigenerazione tissutale. Questa tecnologia supporta anche la ricerca traslazionale, combinando l'analisi molecolare con altre analisi cellulari per sviluppare materiali e trattamenti clinici efficaci.

1. Introduzione

La **"Polymerase Chain Reaction" (reazione a catena della polimerasi) o "PCR"**, è una tecnica di biologia molecolare "inventata" negli anni Ottanta da Kary B. Mullis, un biochimico statunitense insignito del premio Nobel per la chimica nel 1993 proprio per questa scoperta. Nonostante questa tecnologia abbia cambiato completamente il campo della ricerca scientifica, trovando largo impiego in diversi ambiti della medicina e della biologia, la sua invenzione si caratterizza per la straordinaria semplicità concettuale. Lo stesso Kary B. Mullis, durante il suo discorso per il

conseguimento del premio Nobel, ha dichiarato che una sera durante un viaggio in auto tra le colline della California ebbe, quasi per caso, l'idea geniale: utilizzare delle sonde oligonucleotidiche (primer) per amplificare uno specifico tratto di DNA migliaia di volte grazie all'utilizzo della DNA polimerasi (un enzima in grado di sintetizzare un filamento di DNA utilizzando come "stampo" il filamento complementare).

Questa tecnica ha completamente rivoluzionato il modo di analizzare l'RNA e il DNA. A differenza del metodo classico, che prevedeva il clonaggio di sequenze di DNA tramite vettori inseriti in batteri per ottenere copie delle sequenze desiderate, la PCR è una reazione che può essere effettuata in provetta, risultando molto più veloce, economica e sensibile. Oggi la PCR è considerata una tecnica di routine utilizzata nei laboratori di diagnostica molecolare, di genetica, microbiologia/virologia, ma anche in medicina forense, in oncologia, in botanica ed in zoologia, coprendo praticamente tutti i campi che riguardano le scienze della vita.

2. Principi generali della PCR

La PCR è una reazione di amplificazione in vitro di una specifica porzione di DNA o cDNA (di cui si conoscono le sequenze alle estremità), che avviene grazie all'azione di una DNA polimerasi. La conoscenza delle sequenze contigue al frammento bersaglio permette di "disegnare" i primer, due oligonucleotidi a singolo filamento complementari uno all'estremità 3' e l'altro all'estremità 5' del segmento di DNA da amplificare, che serviranno da innesco per l'azione della DNA polimerasi. Altri elementi coinvolti nella reazione sono i quattro desossiribonucleotidi (adenina, timina, citosina, guanina, necessari per la sintesi dei nuovi filamenti di DNA), il cloruro di magnesio ($MgCl_2$), un cofattore essenziale per l'attività della DNA polimerasi, acqua ed una opportuna soluzione tamponante (buffer) in grado di controllare e tenere stabile il pH della miscela in cui avviene l'amplificazione. La reazione avviene tramite il succedersi di cicli termici, ognuno dei quali è costituito dall'alternanza di tre fasi caratterizzate da specifiche temperature:

1. **Fase di denaturazione (denaturation):** richiede di portare la miscela di reazione ad una temperatura compresa tra i 92 e i 98° °C. Tale riscaldamento permette la separazione (denaturazione) dei due filamenti di DNA per rottura dei ponti idrogeno che permettono di mantenere unite le basi complementari;

2. **Fase di appaiamento (annealing):** la temperatura si abbassa intorno ai 50-65°C permettendo così ai primer di appaiarsi alle sequenze complementari dei filamenti di DNA a singola elica localizzate alle estremità del frammento bersaglio;

3. **Fase di estensione (elongation):** la temperatura viene portata a 72°C, a questa temperatura la DNA polimerasi si lega ai primer ed inizia ad aggiungere i nucleotidi liberi presenti in soluzione e a sintetizzare un nuovo filamento in direzione 5'-3' complementare al DNA stampo.

In questo modo alla fine di ogni ciclo di sintesi della DNA polimerasi si raddoppia il numero di copie di DNA disponibili: dopo il primo ciclo da un singola molecola di DNA si ottengono due molecole, ciascuna costituita da un filamento "originale" che ha fatto da stampo alla sintesi del filamento "copia"; al secondo ciclo ciascuna delle due molecole si denatura, i quattro filamenti di DNA che si ottengono fanno da stampo per l'attività della DNA polimerasi ed alla fine le molecole di DNA diventano quattro e così via fino al raggiungimento di un plateau (per esaurimento di uno qualunque dei componenti della miscela di reazione). In condizioni ottimali, la quantità di DNA prodotto da una reazione di PCR è **2ⁿ volte** la quantità iniziale dove **n** è dato dal numero di cicli (da 8 a 15 cicli per PCR di pre-amplificazione, in genere 30-35 nelle situazioni più comuni, fino ad un massimo di 45-50 per alcune particolari applicazioni) (Figura 1).

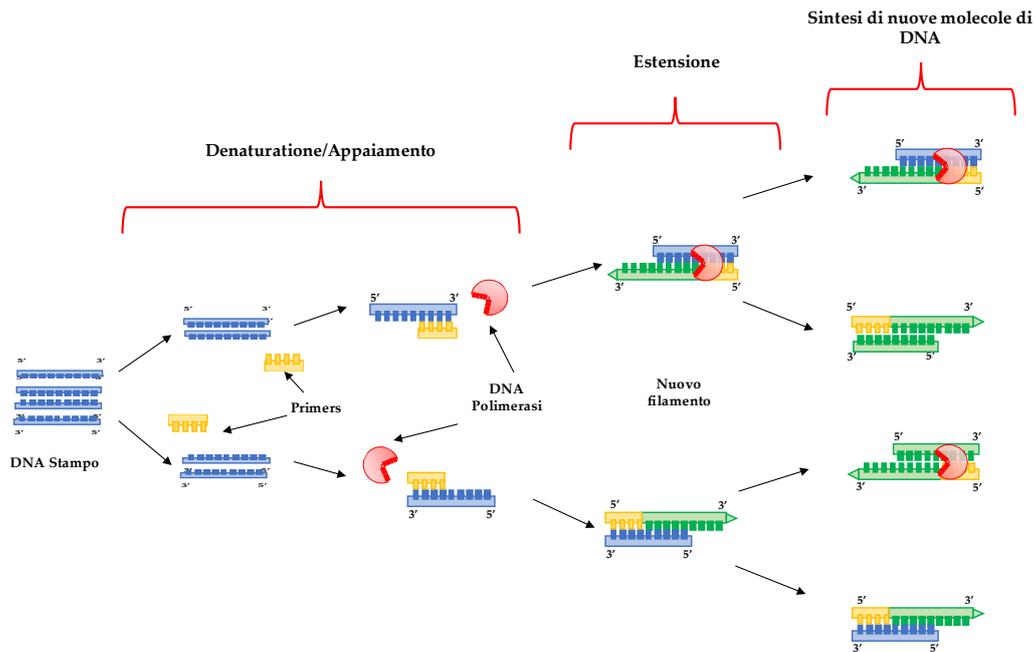


Figura 1. Schema delle fasi della reazione e a catena della polimerasi (PCR)

3. Varianti della PCR

Da quando fu messa a punto la PCR, numerose modifiche sono state apportate al protocollo base, generando varianti che ne hanno ampliato lo spettro di applicazione e allo stesso tempo permesso di superarne alcune limitazioni. Uno dei problemi più comuni infatti si riscontra quando la temperatura di annealing non è molto alta e questo può portare ad un appaiamento non specifico dei primer con conseguente amplificazione di un frammento che non è quello desiderato. In questi casi si può sopperire al problema variando la temperatura di appaiamento oppure utilizzando più coppie di primer.

La **touchdown PCR** permette di aumentare la specificità di una reazione di PCR, effettuando i primi cicli ad una temperatura più elevata rispetto a quelli successivi. Mantenendo inizialmente molto alta la stringenza dell'appaiamento dei primer, si limita fortemente la formazione di aspecifici, consentendo alla sequenza desiderata di predominare.

La **Nested PCR** permette di aumentare la specificità della reazione di PCR utilizzando due diverse coppie di primer, entrambe le coppie si trovano all'estremità del

frammento di DNA da amplificare, ma la seconda è posizionata più all'interno rispetto alla prima. A questo punto si effettuano due reazioni consecutive di PCR, nella prima reazione viene utilizzata la prima coppia di primer mentre nella seconda, su un'aliquota della prima reazione, viene effettuata una nuova PCR utilizzando la seconda coppia di primer. In questo modo, è possibile aumentare la specificità della reazione in quanto sarebbe altamente improbabile che entrambe le sequenze primer amplifichino dei frammenti non desiderati.

La **Real-time PCR (q-PCR)** permette di quantificare il DNA grazie all'impiego di specifici coloranti fluorescenti che si intercalano al DNA a doppio filamento oppure grazie a sonde fluorescenti. Ad ogni ciclo di amplificazione viene misurata la fluorescenza che è direttamente proporzionale alla quantità di DNA neo-sintetizzato. La q-PCR è diventata la metodologia d'elezione per l'analisi quantitativa del DNA e, per estensione, anche dell'RNA dopo retrotrascrizione (RT-qPCR), in particolare per gli studi in cui si voglia valutare la variazione nell'espressione di un gene di interesse.

Droplet digital PCR (ddPCR): si basa sugli stessi principi della PCR convenzionale ma nella ddPCR il campione di DNA viene suddiviso in migliaia di camere di reazione separate, precisamente in migliaia di goccioline, ognuna delle quali contiene una molecola di DNA. L'amplificazione avviene in ogni gocciolina, se una gocciolina contiene almeno una copia del target di interesse questo viene amplificato producendo un segnale fluorescente. Questo processo di digitalizzazione consente di quantificare il numero di goccioline positive (contenenti il target) e negative (non contenenti il target). La ddPCR consente quindi di contare il numero assoluto di molecole di DNA o RNA in ciascun campione offrendo vantaggi in termini di precisione, sensibilità e robustezza. Le sue applicazioni sia nel campo della ricerca biomedica sia nella diagnostica clinica la rendono uno strumento prezioso per l'analisi di espressione genica ma anche per la valutazione di varianti/mutazioni genetiche rare.

4. Ruolo della PCR nella ricerca ortopedica

La PCR, grazie alla sua versatilità e semplicità, ha trovato applicazione in vari settori della medicina, come ad esempio quello ortopedico dove è diventata uno degli strumenti di elezione per l'identificazione di potenziali target di interesse biologico su cui intervenire e per la valutazione di nuove strategie terapeutiche.

In ambito preclinico questa tecnologia può essere utilizzata per comprendere sia l'efficacia di nuovi trattamenti, sia i meccanismi biologici sottesi alla rigenerazione dei tessuti e all'insorgenza di patologie grazie alla valutazione dell'espressione dei geni implicati in tali contesti. Negli studi atti a valutare l'efficacia di trattamenti per le patologie osteo-cartilaginee, gli approcci metodologici impiegati in laboratorio richiedono l'utilizzo di cellule primarie (condrociti, sinoviociti e osteoblasti) derivanti dai tessuti presenti nell'articolazione. Queste cellule possono essere utilizzate per allestire modelli sperimentali in grado di riprodurre, in vitro, quelle che sono le condizioni che si intendono studiare quali infiammazione, fibrosi, squilibrio anabolico-catabolico e formazione di calcificazioni. In questi casi, la RT-qPCR permette di valutare nel tempo l'espressione genica di fattori implicati nell'esordio o nella progressione della patologia. In particolare, nelle patologie muscolo-scheletriche a carattere infiammatorio-degenerativo, come l'osteoartrite, le valutazioni con RT-qPCR hanno contribuito a identificare la via di segnalazione di NF- κ B, come uno dei fattori principalmente responsabili dei processi infiammatori. È stato infatti dimostrato come l'attivazione di questa via di segnalazione determini un innalzamento della concentrazione di molecole infiammatorie nell'articolazione, che a sua volta induce un incremento dell'attività di enzimi proteolitici e altre molecole implicate nella degenerazione dei tessuti.

Altrettanto importante è il contributo di questa tecnologia nel campo della ricerca traslazionale, finalizzata alla valutazione molecolare delle risposte biologiche indotte in seguito all'utilizzo di orto-biologici e all'analisi di costrutti ingegnerizzati, al fine di identificare i fattori e i trattamenti più adatti per l'applicazione in campo clinico. In studi preclinici effettuati su condrociti e sinoviociti la RT-qPCR ha permesso di

confrontare diverse formulazioni di plasma arricchito di piastrine (PRP), un ortobiologico ampiamente utilizzato per il trattamento di lesioni cartilaginee, fornendo indicazioni utili sulla loro capacità di promuovere la produzione di proteine della matrice extracellulare.

Tuttavia, al fine di essere più completi e fornire più informazioni possibili, questi studi richiedono che le analisi con la RT-qPCR siano supportate e combinate con valutazioni cellulari come ad esempio test per valutare la proliferazione, saggi metabolici e di citotossicità, dosaggi immunoenzimatici e analisi immunohistochimiche.

Relativamente alla rigenerazione dei tessuti, la valutazione di costrutti ingegnerizzati (scaffold + cellule) è cruciale per lo sviluppo e la messa a punto di materiali che possano supportare la rigenerazione dei tessuti, quali osso e cartilagine. A tal riguardo, è estremamente importante la scelta sia dei biomateriali che delle cellule da utilizzare. I biomateriali devono possedere infatti idonee caratteristiche biofisiche e strutturali che possano supportare la crescita cellulare, la formazione di matrice ossea e/o cartilaginea e l'integrazione con il tessuto circostante, mentre la selezione del tipo cellulare più adatto (cellule mesenchimali stromali (MSC) derivate dal midollo osseo, MSC da tessuto adiposo, concentrato midollare, microfratturato adiposo, ecc..) deve garantire un'ottimale rigenerazione del tessuto di interesse. L'utilizzo della RT-qPCR, in questo ambito, permette di osservare la modulazione di geni che vengono espressi dalle cellule nel corso della sperimentazione con indicazioni sul loro potenziale differenziativo, rigenerativo (inteso come capacità di produrre matrice extracellulare) ed anti-infiammatorio. Anche in questo tipo di studi, la RT-qPCR deve essere associata con analisi cellulari quali test di adesione e di proliferazione cellulare, test di citotossicità per assicurare che lo scaffold non sia nocivo per le cellule ed analisi istologiche/immunohistochimiche per valutare non solo la formazione di matrice extracellulare ma anche il tipo di proteine prodotte. Lo studio degli scaffold utilizzabili nell'ambito della medicina rigenerativa non deve essere quindi limitato alla sola caratterizzazione chimico-fisica e meccanica ma esteso ad altrettante analisi biofunzionali derivanti dall'interazione con le cellule di interesse. In sintesi, un rigoroso

approccio metodologico che contempli un'accurata valutazione dello scaffold e delle cellule con un approccio multidisciplinare mediante l'uso di tecnologie avanzate di analisi molecolare, test biochimici e imaging, è altamente auspicabile per garantire dati robusti per una potenziale traslazione in ambito clinico.

Bibliografia

1. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985 Dec 20;230(4732):1350-4. doi: 10.1126/science.2999980. PMID: 2999980
2. Analytical Methods Committee Amctb No. PCR - the polymerase chain reaction. *Anal Methods*. 2013 Dec 19;6(2):333-336. doi: 10.1039/c3ay90101g. PMID: **33985286**
3. Khehra N, Padda IS, Swift CJ. 2023 Mar 6. Polymerase Chain Reaction (PCR). In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. PMID: 36943981
4. Lorenz TC. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *J Vis Exp*. 2012 May 22;(63):e3998. doi: 10.3791/3998. PMID: 22664923
5. Korbie DJ, Mattick JS. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat Protoc*. 2008;3(9):1452-6. doi: 10.1038/nprot.2008.133. PMID: 18772872
6. Green MR, Sambrook J. Nested Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harb Protoc*. 2019 Feb 1;2019(2). doi: 10.1101/pdb.prot095182. PMID: 30710024
7. Hawkins SFC, Guest PC. Multiplex Analyses Using Real-Time Quantitative PCR. *Methods Mol Biol*. 2017;1546:125-133. doi: 10.1007/978-1-4939-6730-8_8. PMID: 27896761
8. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Ståhlberg A, Zoric N. The real-time polymerase

chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006 Apr-Jun;27(2-3):95-125. doi: 10.1016/j.mam.2005.12.007. PMID: 16460794

9. Galimberti S, Balducci S, Guerrini F, Del Re M, Cacciola R. Digital Droplet PCR in Hematologic Malignancies: A New Useful Molecular Tool. *Diagnostics (Basel)*. 2022 May 24;12(6):1305. doi: 10.3390/diagnostics12061305. PMID: 35741115

10. Yao Q, Wu X, Tao C, Gong W, Chen M, Qu M, Zhong Y, He T, Chen S, Xiao G. Osteoarthritis: pathogenic signaling pathways and therapeutic targets. *Signal Transduct Target Ther.* 2023 Feb 3;8(1):56. doi: 10.1038/s41392-023-01330-w. PMID: 36737426

11. Lesage R, Ferrao Blanco MN, Narcisi R, Welting T, van Osch GJVM, Geris L. An integrated in silico-in vitro approach for identifying therapeutic targets against osteoarthritis. *BMC Biol.* 2022 Nov 9;20(1):253. doi: 10.1186/s12915-022-01451-8. PMID: 36352408

12. Marcu KB, Otero M, Olivotto E, Borzi RM, Goldring MB. NF-kappaB signaling: multiple angles to target OA. *Curr Drug Targets.* 2010 May;11(5):599-613. doi: 10.2174/138945010791011938. PMID: 20199390

13. Olivotto E, Minguzzi M, D'Adamo S, Astolfi A, Santi S, Ugucioni M, Marcu KB, Borzì RM. Basal and IL-1 β enhanced chondrocyte chemotactic activity on monocytes are co-dependent on both IKK α and IKK β NF- κ B activating kinases. *Sci Rep.* 2021 Nov 4;11(1):21697. doi: 10.1038/s41598-021-01063-2. PMID: 34737366

14. Cavallo C, Merli G, Borzì RM, Zini N, D'Adamo S, Guescini M, Grigolo B, Di Martino A, Santi S, Filardo G. Small Extracellular Vesicles from adipose derived stromal cells significantly attenuate in vitro the NF- κ B dependent inflammatory/catabolic environment of osteoarthritis. *Sci Rep.* 2021 Jan 13;11(1):1053. doi: 10.1038/s41598-020-80032-7. PMID: 33441764

15. Flannery CR, Buddin KE, Begum L, Nasert MA, Catalfamo B, Semler EJ, Fortier LA. Composition and Bioactivity of a Placental Tissue Particulate (PTP-001) Indicate Greater Potential than Platelet-Rich Plasma for the Treatment of Osteoarthritis.

Cartilage. 2023 Dec;14(4):467-472. doi: 10.1177/19476035231159748. Epub 2023 Mar

13. PMID: 36912174

16. Gilbertie JM, Long JM, Schubert AG, Berglund AK, Schaer TP, Schnabel LV. Pooled Platelet-Rich Plasma Lysate Therapy Increases Synoviocyte Proliferation and Hyaluronic Acid Production While Protecting Chondrocytes From Synoviocyte-Derived Inflammatory Mediators. *Front Vet Sci.* 2018 Jul 4;5:150. doi: 10.3389/fvets.2018.00150. eCollection 2018. PMID: 30023361

17. Cavallo C, Filardo G, Mariani E, Kon E, Marcacci M, Pereira Ruiz MT, Facchini A, Grigolo B. Comparison of platelet-rich plasma formulations for cartilage healing: an in vitro study. *J Bone Joint Surg Am.* 2014 Mar 5;96(5):423-9. doi: 10.2106/JBJS.M.00726. PMID: 24599205

18. Assirelli E, Filardo G, Mariani E, Kon E, Roffi A, Vaccaro F, Marcacci M, Facchini A, Pulsatelli L. Effect of two different preparations of platelet-rich plasma on synoviocytes. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2015 Sep;23(9):2690-703. doi: 10.1007/s00167-014-3113-3. PMID: 24942296

19. Erisken C, Kalyon DM, Wang H, Ornek-Ballanco C, Xu J. Osteochondral tissue formation through adipose-derived stromal cell differentiation on biomimetic polycaprolactone nanofibrous scaffolds with graded insulin and Beta-glycerophosphate concentrations. *Tissue Eng Part A.* 2011 May;17(9-10):1239-52. doi: 10.1089/ten.TEA.2009.0693. PMID: 21189068

20. Manferdini C, Cavallo C, Grigolo B, Fiorini M, Nicoletti A, Gabusi E, Zini N, Pressato D, Facchini A, Lisignoli G. Specific inductive potential of a novel nanocomposite biomimetic biomaterial for osteochondral tissue regeneration. *J Tissue Eng Regen Med.* 2016 May;10(5):374-91. doi: 10.1002/term.1723. PMID: 23495253

21. Baptista LS. Adipose stromal/stem cells in regenerative medicine: Potentials and limitations. *World J Stem Cells.* 2020 Jan 26;12(1):1-7. doi: 10.4252/wjsc.v12.i1.1. PMID: 32110271