

Ogni Corso di Area Pediatrica, staccato e raccolto, formerà nel tempo un volumetto.

**Attenzione:** nel prossimo numero due nuovi corsi: *Epidemiologia e Antibioticoterapia*



# BIOLOGIA MOLECOLARE

I corsi di

ACHILLE IOLASCON<sup>o\*</sup>, ANDREA RINALDI\*, MARIA FELICIA FAIENZA\*

*\*Dipartimento di Biomedicina dell'età evolutiva e Centro interuniversitario per lo studio delle malattie ereditarie (CISME), Università di Bari*

*<sup>o</sup>Istituto di Clinica Pediatrica, Università di Foggia*

Nell'ultimo ventennio lo sviluppo delle tecniche di biologia molecolare applicate alla ricerca e alla diagnostica ha permesso vaste applicazioni in campo medico (malattie geneticamente trasmesse, infettivologia, medicina legale ecc.). Fino a oggi sono stati riconosciuti (clonati) più di 10.000 geni/malattia a trasmissione mendeliana. Le informazioni relative a questi geni e alla loro sequenza sono disponibili in internet su un catalogo on line, nel sito <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (cliccare "Search: OMIM). Attualmente c'è una lista crescente di indagini molecolari per la diagnosi pre- e post-natale delle malattie ereditarie, e si stima che ogni anno vengano resi disponibili circa 10-12 nuovi tipi di test.

Ma quali informazioni fornisce un test di analisi molecolare al medico che lo richiede e al paziente che lo esegue? Le principali indicazioni all'esecuzione di indagini molecolari sono:

- ❖ conferma della diagnosi in un paziente sintomatico e, per alcune malattie, correlazione genotipo-fenotipo;
- ❖ screening dei portatori;

TAB. I Alcuni siti internet di consultazione genetica

- ❖ <http://pediatrics.medscape.com>
- ❖ <http://www.nlm.nih.gov/hinfo.html>
- ❖ <http://www.hgmp.mrc.ac.uk>
- ❖ <http://www.eddnal.com>
- ❖ <http://www.sigu.net/>
- ❖ <http://www.genetests.org>

## Struttura del corso

### Basi teoriche

**1-** Pediatria e genetica. L'importanza del linguaggio. Glossario. (Pubblicato su AP n. 2/2000)

**2-** Organizzazione del genoma umano: struttura e funzione di DNA e RNA. Funzione e struttura dei geni (Pubblicato su AP n. 5/2000)

**3-** Le basi cromosomiche dell'ereditarietà: dominanza, recessività, X-linked (Pubblicato su AP n. 7/2000)

**4-** L'ereditarietà non mendeliana: isodisomia, imprinting, malattia delle triplette (Pubblicato su AP n. 2/2001)

**5-** L'ereditarietà mitocondriale (Pubblicato su AP n. 2/2001)

**6- Le biotecnologie: che cosa offrono al pediatra. Un volo sulle tecniche e sulla loro applicazione nella pratica pediatrica**

❖ test pre-sintomatici per le malattie a esordio tardivo;

❖ diagnosi prenatale.

Inoltre, le indagini molecolari possono essere utili per gli screening di popolazione, allo scopo di conoscere la storia naturale di una malattia genetica o per valutare il rischio di sviluppo di condizioni morbose, come il cancro, le patologie cardiovascolari, le malattie neurodegenerative nella popolazione sana.

Questo articolo ha lo scopo di familiarizzare il pediatra di base con le principali tecniche di diagnostica molecolare e con le possibilità che queste indagini offrono dal punto di vista clinico (in termini di costo/beneficio) se applicate ai bambini e agli adolescenti.

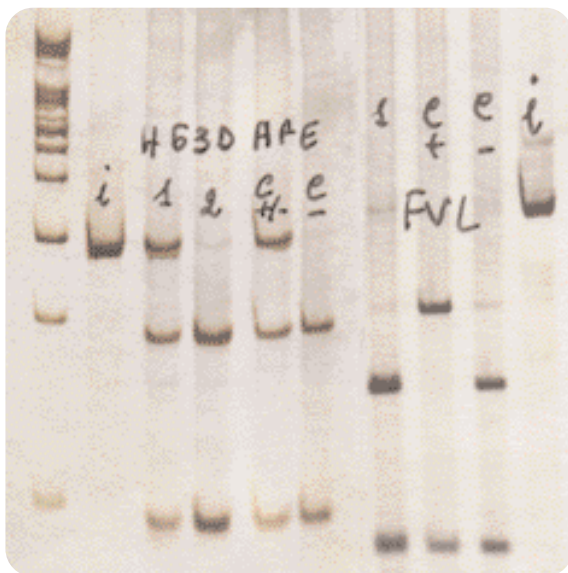
Nella **tabella I** sono riportati alcuni siti internet



utili per la consultazione da parte del medico pediatra.

## LE INFORMAZIONI OTTENIBILI DALLE TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE

È stato calcolato che circa 30.000 geni sono contenuti nei 46 cromosomi presenti in ciascuna cellula dell'uomo. Ciascun gene è presente nel genoma in 2 copie alternative, chiamate alleli, uno di derivazione materna e uno paterno. Sebbene la maggior parte dei cambiamenti nella composizione in basi del DNA non produca malattie (polimorfismi), tuttavia è possibile che modificazioni nella struttura di un gene (mutazioni) ne alterino la funzione, causando vari gradi di malattia. La maggior parte delle malattie genetiche è causata da inserzioni, delezioni o sostituzioni di una singola base nella sequenza del DNA. Altre alterazioni tipo traslocazioni, amplificazioni o delezioni dell'intero gene possono essere diagnosticate con le indagini molecolari o citogenetiche attualmente in uso.



**Figura 1** Analisi dei polimorfismi di restrizione (RFLP). Si tratta di una ricerca diretta di mutazioni che alterino siti di restrizione. La prima linea corrisponde al marker di peso molecolare che ci serve per poter misurare le dimensioni dei vari frammenti; nelle 5 linee successive ci sono campioni indigeriti e digeriti per il riconoscimento di un polimorfismo del gene della emocromatosi familiare (HFE) mutazione H63D. Le ultime 4 linee sono relative a una ricerca di mutazioni per il fattore V (FV-Leiden), che conferisce la resistenza alla proteina C attivata (causa di trombosi familiare).

## Analisi indirette

Le analisi indirette, indicate come analisi di linkage, sono utilizzate quando:

- ❖ il gene responsabile non è noto ma se ne conosce la localizzazione cromosomica;
- ❖ il gene è noto ma le mutazioni sono troppo eterogenee per poter fare un'analisi diretta.

L'analisi di linkage può essere usata per identificare gli eterozigoti (carriers) e per la diagnosi prenatale.

Per eseguire un'analisi di linkage è necessario utilizzare marcatori genetici in linkage con il gene malattia, cioè localizzati sullo stesso cromosoma e pertanto coereditati con il gene malattia. Lo studio deve essere condotto su un intero nucleo familiare e il tipo di marcatore utilizzato deve avere un'alta percentuale di eterozigosità (ad esempio i polimorfismi di lunghezza dei frammenti di restrizione: RFLP; regioni ipervariabili del DNA: VNTR, microsatelliti) (**figura 1**). Tutti i geni/malattia di cui sia nota la posizione sui cromosomi (mappatura) sono suscettibili a questo tipo di approccio diagnostico.

Un esempio di malattia diagnosticabile con un'indagine di linkage è dato dalla fenilchetonuria, che è una patologia autosomica recessiva con una frequenza di 1:10.000, e con un'alta frequenza di eterozigoti (1:50). Altri esempi possono essere la sindrome di Marfan e la neurofibromatosi.

## Analisi dirette

Sono utilizzate quando il gene/malattia è stato identificato e sono note le mutazioni a suo carico. Le tecniche usate sono diverse e comprendono l'analisi con oligonucleotidi allele-specifici (ASO), l'analisi degli eteroduplex, il Southern blotting, la PCR e la sequenza.

Alcune malattie, tuttavia, possono essere causate da diverse mutazioni e ciò costituisce un limite di tali analisi. Un esempio è dato dalla fibrosi cistica: nella popolazione del Nord Europa il 70% delle mutazioni è dovuto a delezione di 3 paia di basi, che risulta in una perdita della fenilalanina in posizione 508 della proteina. L'altro 30% può essere dovuto ad altre centinaia di possibili mutazioni. Questa elevata percentuale di mutazioni a livello di un singolo locus genico è definita eterogeneità allelica.

Un altro limite dell'analisi diretta è l'eterogeneità

TAB. II **Malattie diagnosticabili con analisi molecolari di tipo diretto**

<b>Patologia</b>	<b>Locus genico</b>
❖ Acondroplasia	FGFR3 (4p16)
❖ Malattia di Apert	FGFR2 (10q26)
❖ Malattia di Charcot-Marie-Tooth	PMP22 (17p11)
❖ Malattia di Crouzon	FGFR2 (810q26)
❖ Fibrosi cistica	CFTR (7q31)
❖ Poliposi familiare del colon	APC (5q21)
❖ Sindrome dell'X fragile	FMR1 (Xq27)
❖ Atassia di Friedreich	FRA1 (9q13)
❖ Emofilia A	F8C (Xq28)
❖ Malattia di Huntington	HD (4p16)
❖ Distrofia muscolare (Duchenne e Becker)	DMD (Xp21)
❖ Distrofia miotonica	DMPK (19q13)
❖ Neurofibromatosi tipo 1	NF1 (17q11)
❖ Neurofibromatosi tipo 2	NF2 (22q12)
❖ Sindrome di Saethre-Chotzen	TWIST (7p22)

gare i vantaggi e gli svantaggi della loro applicazione alla diagnostica delle malattie ereditarie umane.

### Southern blotting

Con la tecnica del Southern blotting il DNA isolato viene tagliato in frammenti mediante enzimi detti nucleasi di restrizione. I frammenti vengono successivamente separati, in base al loro peso molecolare, mediante elettroforesi su gel di agarosio. I segmenti di DNA così ottenuti vengono trasferiti per assorbimento (blotting) dal gel a una membrana di nitrocellulosa o di nylon. Il filtro viene messo a contatto con una soluzione contenente la sonda specifica per il gene che si vuole studiare, marcata con fosforo

dei loci: mutazioni a carico di 2 o più loci genici possono produrre lo stesso fenotipo, come è stato dimostrato per la sordità congenita neurosensoriale, per la quale sono stati identificati più di una dozzina di loci coinvolti. Infine è importante ricordare che un'analisi diretta, se è positiva, conferma la diagnosi, ma se è negativa non esclude la malattia. Nella **tabella II** sono riportati alcuni esempi di malattie diagnosticabili con analisi molecolari di tipo diretto.

radioattivo o con marcatori non radioattivi. Il filtro viene posto su una lastra autoradiografica e dopo un tempo di esposizione variabile, il segnale che si osserva rivela il legame di ibridazione tra la sonda e il frammento di DNA complementare (**figura 2**).

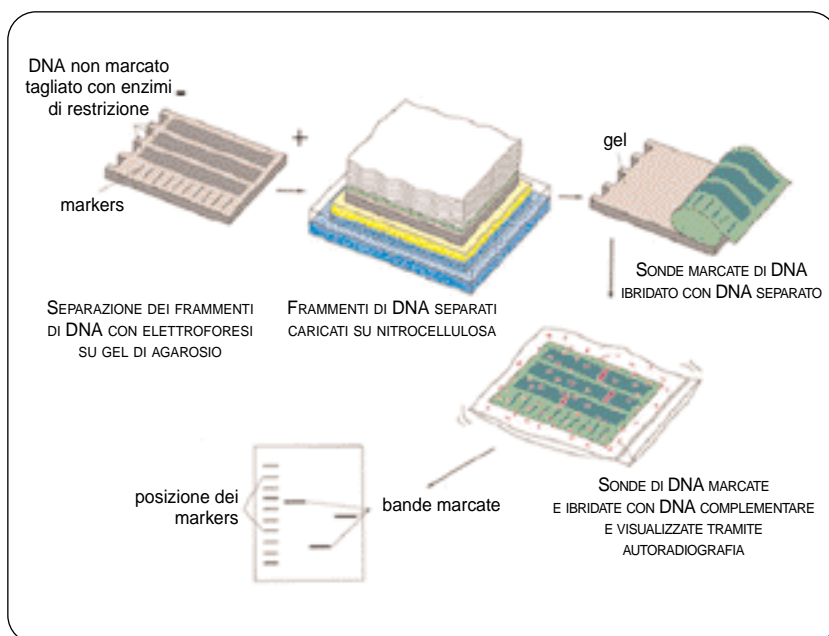
### Vantaggi

❖ questa tecnica consente il riconoscimento diretto di un gene a sequenza nota e permette di identificare le sostituzioni di singoli nucleotidi

## EVOLUZIONE DELLE TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE

Nella storia della tecnologia del DNA ricombinante si possono distinguere due ere: una che inizia con la descrizione della tecnica del Southern e una più recente che coincide con l'avvento della reazione polimerasica a catena o PCR descritta dal gruppo di Saiki. A queste si è aggiunta negli ultimi due anni la tecnologia dei microchip che ha dato inizio a una terza era delle biotecnologie.

Prenderemo in rassegna queste diverse metodiche cercando di spie-



**Figura 2** Rappresentazione schematica delle diverse fasi di allestimento di un esperimento di Southern blotting.

(mutazioni puntiformi) che aboliscono o creano un sito di restrizione;

- ❖ la delezione o l'inserzione di pochi nucleotidi possono essere diagnosticate utilizzando come sonde molecolari piccoli filamenti di DNA lunghi 20-25 basi (oligomeri), complementari al gene normale o mutato.

#### *Svantaggi*

- ❖ necessità di utilizzare grandi quantità di materiale genomico di partenza (circa 1 gamma), non sempre disponibile;

- ❖ tempi lunghi di esecuzione.

Un esempio di malattia per la cui diagnosi è ancora utile eseguire la tecnica del Southern blotting è dato dall'iperplasia surrenalica congenita da deficit di 21-OH.

### **PCR**

I metodi di analisi del DNA sono stati rivoluzionati dalla tecnica dell'amplificazione genica o PCR (Saiki 1985). Si tratta di una reazione polimerasica a catena in cui il segmento di DNA da amplificare viene denaturato e ibridato con due oligomeri fiancheggianti il tratto di DNA bersaglio. In presenza dell'enzima DNA polimerasi, i 2 oligonucleotidi fungono da primers per la sintesi di 2 filamenti complementari al segmento target. Attraverso successivi cicli di denaturazione, ibridazione e sintesi, la sequenza bersaglio viene amplificata in maniera esponenziale.

#### *Vantaggi*

- ❖ la reazione può essere condotta su esigue quantità di stampo, anche parzialmente degradato, come quello estratto da tessuto fissato su vetrino, incluso in paraffina, o direttamente effettuata in situ su tessuto o singola cellula senza estrazione del DNA;

- ❖ si tratta di una tecnica rapida, specifica e molto sensibile.

#### *Svantaggi*

- ❖ falsi negativi dovuti alla presenza di sostanze inibitrici nel campione; pertanto è sempre opportuno utilizzare una sequenza bersaglio di controllo;

- ❖ falsi positivi derivanti da contaminazione dei campioni; occorre condurre sempre degli esperimenti di "bianco" per controllo.

Con la PCR è possibile amplificare sia DNA che RNA (RT-PCR). Se si utilizza RNA, oc-

corre fare prima una retrotrascrizione, in modo da ottenere il cDNA da sottoporre a normale amplificazione. Il vantaggio sostanziale dell'RT-PCR è che consente di studiare tutta la sequenza esonica del gene e di fare anche una valutazione quantitativa del prodotto di amplificazione che, dopo 15-20 cicli, è proporzionale all'mRNA di partenza. Questo è particolarmente importante nella diagnosi delle malattie infettive a bassa carica virale o batterica e nello studio della malattia residua minima in campo oncoematologico.

La tecnica della PCR viene applicata sia allo studio di geni a sequenza nota e di cui siano state descritte possibili mutazioni (es. beta-talassemia) sia per l'individuazione di alterazioni geniche sconosciute.

Se il gene responsabile di una malattia è stato clonato e ne è stata definita la sequenza, è possibile il riconoscimento diretto delle mutazioni. Dopo aver amplificato con primers specifici la regione oggetto di studio, è possibile utilizzare tre tecniche:

1. la digestione con nucleasi di restrizione, qualora venga alterato un sito di riconoscimento di tali enzimi;

2. la tecnica del dot-blot con sonde marcate, specifiche per determinate mutazioni (ASO);

3. l'ARMS, che è una tecnica alternativa in cui l'oligomero viene costruito in modo da avere in posizione 3' la complementarietà con la base mutata tipica del difetto genico ricercato.

Se invece la mutazione non è nota, è possibile utilizzare altre tecniche, tra cui l'SSCP (studio del polimorfismo di conformazione del DNA a singola catena). L'analisi con SSCP consente di verificare la presenza di una mutazione in un amplificato in base alla differente conformazione tridimensionale e quindi corsa elettroforetica del frammento del DNA a singola catena. Una volta definita la presenza di una mutazione in un amplificato, è necessario caratterizzare il tipo di alterazione per cui occorre fare un'analisi di sequenza.

### **Sequenziamento**

Per conoscere molte delle informazioni che il DNA contiene, bisogna sapere la sua esatta sequenza nucleotidica. Attualmente sono in uso due diversi metodi di sequenziamento del



DNA, uno chimico e uno enzimatico, entrambi rapidi e affidabili.

Il metodo enzimatico di Sanger è quello più utilizzato; necessita di una molecola di DNA che fa da stampo, di un oligonucleotide antisense che riconosce una delle due eliche di DNA, di una DNA polimerasi, di 4 deossinucleotidi trifosfati e di ciascun dideossinucleotide fosfato. Le molecole di DNA sintetizzate a singola elica vengono poi caricate su gel di acrilamide e separate elettroforeticamente. Alla fine degli anni Ottanta è stato introdotto sul mercato il primo sequenziatore laser capace di sequenziare e analizzare il DNA utilizzando il metodo della sequenza ciclica a terminazione con fluorescenza. Con questo sistema è possibile leggere fino a 600 basi al minuto.

### Microarray

Tutte le metodiche finora descritte consentono di definire dal punto di vista molecolare una malattia ereditaria: identificare il gene responsabile della malattia, le mutazioni più frequenti a suo carico, la sua sequenza nucleotidica. Le tappe di questo processo sono diverse e numerose: è necessario innanzitutto ottenere il materiale di partenza (DNA o RNA), amplificarlo, eventualmente sottoporlo a digestione con enzimi di restrizione, separarne i frammen-

ti in base al peso molecolare o alla differente conformazione tridimensionale, facendo corse elettroforetiche in condizioni particolari, e infine sequenziarlo. Se compattiamo tutto questo processo in una piccola piastra di silicio, otteniamo il microchip (**figura 3**). I microchip consentono di ottenere informazioni su funzioni o eventuali alterazioni di più geni contemporaneamente.

#### Vantaggi

- ❖ meno apparecchiature per analisi e diagnosi;
- ❖ meno materiale di partenza;
- ❖ tempi di analisi più rapidi (la corsa dura pochi secondi);
- ❖ automatizzazione del processo (minore contaminazione dei campioni).

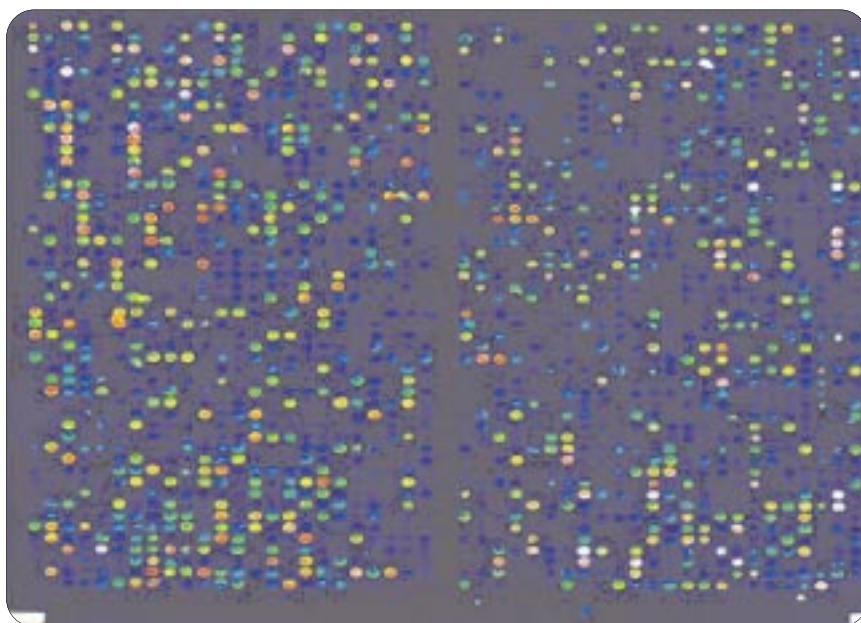
Come si costruisce un microchip?

Si usa in genere una piastra di silicio su cui vengono depositi dei materiali o sulla quale si opera con microincisione laser stereochimica (attacchi chimici per scolpire camere di filtrazione o amplificazione, canali nei quali far scorrere la soluzione biologica da manipolare e analizzare). Esistono molti tipi di biochip, tutti basati sulla miniaturizzazione di tecniche già conosciute. Ad esempio la PCR viene effettuata con volumi di reazione molto bassi (5  $\mu$ L nel rispetto ai 25-50 delle reazioni tradizionali), per cui minore volume vuol dire maggiore efficienza di reazione e riduzione del tempo necessario.

Siuramente il biochip che ha portato i maggiori progressi nella ricerca è stato il microarray DNA o cDNA, che consiste in un chip di silicio o plastica polimerica con acidi nucleici immobilizzati.

La deposizione può essere manuale, automatizzata o mediante fotolitografia (cioè si fissano molecole linker terminanti con gruppi di protezione fotosensibili che vengono ri-

La deposizione può essere manuale, automatizzata o mediante fotolitografia (cioè si fissano molecole linker terminanti con gruppi di protezione fotosensibili che vengono ri-



**Figura 3** Esempio di microarray. I puntini colorati corrispondono ai diversi segnali di ibridazione con i cDNA utilizzati.





mossi dalle zone illuminate nel primo passaggio fotolitografico).

Tutti gli acidi nucleici sono disposti secondo un ordine prestabilito e hanno una lunghezza da 10-20 basi (oligonucleotidi) ad alcune migliaia (prodotti di PCR o cDNA). Questo viene fatto per sfruttare la capacità delle molecole di appaiarsi o ibridare con una catena a singola elica a esse complementare. Gli acidi nucleici provenienti dal campione in esame, marcati con molecola fluorescente, vengono fatti reagire con la catena omologa adesa al chip. Per rilevare l'avvenuto appaiamento si usa la chemiluminescenza: si marca l'acido nucleico bersaglio o una terza molecola che riconosce il bersaglio o la formazione della doppia elica.

Dal punto di vista pratico, le possibilità offerte da questi nuovi metodi diagnostici al pediatra di base sono date dalla messa a punto di microarray che consentano di individuare più mutazioni contemporaneamente (es. talassemie, fibrosi cistica ecc.)

Per realizzare e analizzare microarray si usano apparecchiature sofisticate: il microarrayer serve per la creazione di matrici di molecole organiche sulla superficie di vetrini. Successivamente servirà una macchina per fare avvenire l'ibridazione e in seguito un rilevatore di fluorescenza. Infine l'elaborazione del segnale fluorescente sarà affidata a un computer con un programma opportuno.

Ci sono vari "gradi" di utilizzo di questa nuova tecnica:

1. inviare il campione a una multinazionale che lo processerà e indicherà i risultati ottenuti;
2. utilizzare un microarray già pronto (ne esistono in commercio diversi tipi, dedicati a oncogeni, fattori di trascrizione, a geni che regolano l'apoptosi ecc.) e ibridare il campione, quindi spedire il microarray a multinazionali che successivamente forniranno i risultati ottenuti;
3. avendo la possibilità di utilizzare un microarrayer e uno scanner al laser, creare il microarray utilizzando oligonucleotidi a nostro pagamento e analizzare da soli i risultati.

Come ogni tecnica, anche i microarray hanno dei limiti, primo tra tutti il costo: per effettuare questo tipo di analisi, anche partendo dal "primo grado", occorre una disponibilità economi-

ca piuttosto elevata, dato che l'acquisto dei macchinari per costruire e analizzare in proprio i microarray prevede un finanziamento di qualche centinaio di milioni.

## CONSIDERAZIONI CONCLUSIVE

Questa carrellata sull'evoluzione delle tecniche di biologia molecolare ci fa comprendere come sia possibile assistere nel giro di pochi anni a un sempre maggiore sviluppo di queste metodologie e a una più rapida comprensione dei meccanismi molecolari alla base delle malattie umane. Da ciò si evince anche il notevole impatto che tutto questo ha sulla diagnosi prenatale delle malattie ereditarie e sulla possibilità di cura, mediante terapia genica, dei difetti geneticamente trasmessi.

Che cosa, però, è veramente utile dal punto di vista pratico al medico che svolge la sua attività di pediatra di base presso il suo ambulatorio?

Esistono indicazioni all'esecuzione di un prelievo di sangue (pochi cc in EDTA) per l'estrazione del DNA, in un piccolo paziente?

Abbiamo visto come sia possibile diagnosticare con tecniche di biologia molecolare una malattia ereditaria qualora ci siano segni clinici che facciano sorgere il sospetto di una determinata patologia.

Ma anche di fronte a un bambino con una semplice iperbilirubinemia a causa sconosciuta, il pediatra di base può avvalersi delle tecniche di biologia molecolare per diagnosticare o escludere una sindrome di Gilbert. In caso di anemia emolitica, è possibile effettuare lo studio molecolare dei difetti delle proteine di membrana (sferocitosi, ellissocitosi, anemia diseritropoietica congenita) o di enzimi quali la G6PDH per la diagnosi di conferma in caso di femmine eterozigoti. Se in famiglia vi è una diatesi trombofilica, è possibile ricercare nel bambino i polimorfismi di alcuni geni responsabili della predisposizione genetica a problemi trombotici. Queste sono solo alcune delle possibilità offerte dalla diagnostica molecolare alla pediatria clinica. Sicuramente nel tempo sarà sempre più semplice entrare "in confidenza" con queste tecniche e, accanto alla prescrizione di analisi di routine, verrà facile prescrivere un'analisi sul DNA.