



I corsi di

BIOLOGIA MOLECOLARE

ACHILLE IOLASCON

Dipartimento di Biomedicina dell'Età Evolutiva

e Centro interuniversitario per lo studio delle malattie ereditarie (CISME), Università di Bari

PEDIATRIA E GENETICA

Il secolo appena trascorso ha visto una profonda modificazione dell'incidenza delle varie patologie pediatriche. Basti pensare al fatto che molte e invalidanti patologie infettive sono state quasi definitivamente debellate. Questi progressi nella diagnostica e nella terapia hanno comportato una netta riduzione dei ricoveri per malattie infettive e un netto incremento di ricoveri per le patologie croniche che hanno una componente ereditaria più o meno spiccata. Si è cominciato a parlare della predisposizione alla malattia e si è aperto il campo alle malattie multifattoriali (di cui si parlerà più avanti).

Struttura del corso

Basi teoriche

1- Pediatria e genetica.

L'importanza del linguaggio.

Glossario

2- Organizzazione del genoma umano: struttura e funzione di DNA e RNA. Funzione e struttura dei geni

3- Le basi cromosomiche dell'ereditarietà: dominanza, recessività, X-linked

4- L'ereditarietà non mendeliana: isodisomia, imprinting, malattia delle triplette

5- L'ereditarietà mitocondriale

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

Un minicorso di biologia molecolare per il pediatra *deve essere pratico e possibilmente con molte ed esplicative illustrazioni: a questo scopo ho realizzato all'interno della mia Clinica un minicorso chiedendo ai colleghi che cosa si aspettassero dalla biologia molecolare. Dal risultato è evidente che la maggior parte delle persone si aspetta: un implemento delle proprie potenzialità diagnostiche; la possibilità di confermare in maniera molecolare dei sospetti fenotipici; la possibilità di ri-classificare in maniera nosografica moderna (molecolare) delle malattie note da tempo.*

Credo quindi che ognuno dei minicapitoli di questo corso debba rispondere a precise domande e quelle di questa breve introduzione sono le seguenti:

❖ *Qual è l'impatto della biologia molecolare nella pratica pediatrica e, più in generale, qual è l'impatto delle nuove tecnologie (DNA ricombinante) nella vita di tutti i giorni delle mamme, del bambino e del loro pediatra.*

❖ *Quali sono le informazioni essenziali che il pediatra deve conoscere per far fronte all'avanzare delle conoscenze.*





La genetica e la biologia molecolare, lungi però dall'essere delle nozioni che fanno parte del solo bagaglio del medico, hanno trovato posto nella vita quotidiana e oggi si parla di esse in molte riviste divulgative.

La conseguenza dell'invasione delle "cose genetiche" è che il pediatra non deve solo saper rispondere in maniera appropriata alle domande sul rischio di ricorrenza di malattie mendeliane classiche (monogeniche), ma deve far fronte alle malattie multifattoriali e alla loro prevenzione in età pediatrica. Deve avere un'opinione riguardo ai cibi che vengono globalmente detti "transgenici" e con cui, più o meno coscientemente, veniamo a contatto ogni giorno.

Volendo classificare i campi di interesse delle biotecnologie, potremmo dividerle in quelle che interessano piante e animali diversi dall'uomo (e che ricadono sull'uomo in quanto fonte di alimentazione umana) e quelle che interessano direttamente l'uomo. L'impatto diretto sull'uomo comprende sia le questioni diagnostiche (diagnosi pre- e post-natale; pre- e post-sintomatica) sia le questioni terapeutiche (terapia genica somatica o germinale).

È evidente da quanto detto che le nuove biotecnologiche hanno un impatto bioetico molto forte, che è ancora maggiore se applicati all'età pediatrica. Esempi sono le tecniche di fecondazione artificiale gli screening neonatali e la diagnosi post-natale (ma pre-sintomatica) di malattie per cui non è possibile un approccio terapeutico.

Se si è fatta attenzione a quanto è stato detto sinora appare evidente quanto segue:

- ❖ il problema c'è e interessa i pediatri nell'attività di ogni giorno;
- ❖ il bagaglio culturale acquisito durante gli studi compiuti nelle aule universitarie è francamente inadeguato a poter rispondere a queste nuove esigenze.

L'IMPORTANZA DEL LINGUAGGIO

Un altro problema è costituito dal fatto che non si è ancora in grado di parlare in maniera

appropriata e che, pur avendo in mente il problema e la sua soluzione, non si hanno i mezzi per esprimerli. Spesso si utilizzano alcuni termini in maniera equivalente: **genetica, ingegneria genetica, genetica molecolare, biotecnologie**.

La **genetica molecolare** studia la struttura e il funzionamento del genoma umano.

L'**ingegneria genetica** è, invece, l'insieme delle tecniche atte alla manipolazione del patrimonio genetico di un organismo e che sono in grado di alterarne il suo fenotipo. Questa definizione, che è quella comunemente accettata e che potreste trovare in qualsiasi testo o dizionario aggiornato, non è priva di implicazioni collaterali. Nell'immaginario collettivo la manipolazione del patrimonio genetico fa pensare non tanto a un pomodoro che duri nei frigoriferi più a lungo, ma a una specie di animale mitologico nato dall'incrocio di più specie di cui una potrebbe essere quella umana.

Il primo problema da affrontare è certamente quello legato alla semantica: la biologia molecolare adopera, infatti, un linguaggio che potremmo definire "gergale", che è comunque essenziale conoscere perché è il primo mezzo con cui poter affrontare questa vasta materia

Nella maggior parte dei manuali il glossario viene posto alla fine. È mia opinione che se questa conoscenza è essenziale per la comunicazione, il glossario va posto all'inizio e debba essere appreso prima di affrontare la lettura degli altri capitoli.

Il glossario contiene solo quei termini di uso generale che ricorrono molto spesso nei vari capitoli, mentre le parole che sono di uso meno comune verranno spiegate contestualmente al loro uso.

Ringraziamenti

Vorrei ringraziare i miei collaboratori, B. Coppola, M.F. Faienza, L. Giordani, A. Izzo, S. Lobasso, F. Monno, A. Moretti, A. Rinaldi, R. Roberto e V. Tursi, che quotidianamente mi forniscono un inestimabile aiuto sia in laboratorio che nella stesura dei lavori e che collaboreranno anche a questo sforzo editoriale.

Glossario

Acido ribonucleico (RNA) molecola presente nel nucleo e nel citoplasma delle cellule che gioca un ruolo importante nella sintesi proteica e in altre attività biochimiche della cellula. La struttura dell'RNA è simile a quella del DNA. Esistono diversi tipi di molecole di RNA: RNA messaggero, RNA ribosomale, RNA transfer e altri piccoli RNA, ciascuno con un ruolo specifico.

Alleli forme alternative di un locus genico; ciascun allele è ereditato separatamente da uno dei due genitori.

Amplificazione aumento esponenziale del numero delle copie di uno specifico frammento di DNA, in vivo o in vitro.

Analisi di sequenza metodo per determinare la sequenza di basi in una molecola di DNA.

Aploidia corredo cromosomico costituito da un singolo set di cromosomi (la metà dell'intero materiale genetico), presente nella cellula uovo e nelle cellule spermatiche degli animali e nell'uovo e nel polline delle piante. L'uomo ha 23 cromosomi nelle cellule germinali. Vedere diploidia.

Autosoma cromosoma non coinvolto nella determinazione del sesso. Il genoma umano consiste di 46 cromosomi di cui 22 coppie di autosomi e 1 coppia di cromosomi sessuali (X e Y).

Batteriofago virus il cui ospite naturale è la cellula batterica.

Biotechnologia tecniche biomolecolari basate su DNA ricombinante.

bp vedi paia di basi.

Cariotipo fotografia del pattern di cromosomi che permette di valutare eventuali anomalie di numero e di struttura di ogni cromosoma.

cDNA DNA complementare a un filamento di RNA.

Cellule somatiche qualsiasi cellula del corpo, esclusi i gameti e i loro precursori.

Centimorgan (cM) unità di misura della frequenza di ricombinazione. 1 cM è uguale all'1% di ricombinazione tra marcatori genetici di un locus. 1 cM equivale a circa 1 milione di paia di basi.

Clonaggio processo di riproduzione asessuale di un gruppo di cellule (cloni) geneticamente uguali, a partire da un singolo progenitore. In riferimento alla tecnologia del DNA ricombinante, il clonaggio consiste nella produzione di copie multiple di un singolo gene o di un frammento di DNA.

Cloni un gruppo di cellule derivate da un singolo progenitore cellulare.

cM vedi centimorgan.

Codice genetico la sequenza di nucleotidi, organizzata in triplette (codoni) lungo l'RNA messaggero, che determina la sequenza degli aminoacidi nella sintesi proteica. La sequenza di DNA di un gene può essere usata per predire la sequenza dell'mRNA e il codice genetico può essere usato a sua volta per predire la sequenza proteica.

Codone vedi codice genetico.

Cosmide permette il clonaggio di un DNA estraneo lungo da 30 a 40 kb; ed è costruito inserendo in un plasmide le sequenze cos del batteriofago.

Cromosomi omologhi una coppia di cromosomi contenenti gli stessi geni, ognuno dei quali deriva da un genitore.

Crossing over punto di ricombinazione tra cromosomi parentali che si realizza durante la meiosi. Questo processo risulta in uno scambio di alleli cromosomici.

Diploidia set completo di materiale genetico, composto da coppie di cromosomi omologhi di cui uno di origine materna e l'altro di origine paterna. Il genoma umano è diploide (2n), cioè formato da 23 coppie di cromosomi.

DNA complementare (cDNA) molecola di DNA sintetizzata da uno stampo di RNA messaggero; la forma a singolo filamento viene usata come sonda nella mappatura fisica.

Dominio regione proteica con una specifica funzione. La combinazione di più domini di una proteina ne determinano la funzione complessiva.

Doppia elica struttura derivante dall'avvolgimento dei due filamenti di DNA.

Endonucleasi enzima che riconosce una specifica sequenza nucleotidica ed effettua tagli a livello di siti interni alla stessa.

Enzimi di restrizione, endonucleasi una proteina che riconosce e taglia in maniera specifica una corta sequenza di DNA. I batteri contengono più di 400 di tali enzimi che riconoscono e tagliano più di 100 diverse sequenze di DNA. Vedere sito di taglio degli enzimi di restrizione.

Esoni sequenze di un gene che codificano per una proteina. Vedere introni.

Esonucleasi enzima che taglia sequenzialmente i nucleotidi a partire da estremità libere di una molecola lineare di acido nucleico.

Espressione genica il processo mediante il quale un'informazione codificata da geni viene convertita in strutture presenti e operanti nella cellula. I geni espressi comprendono quelli trascritti in mRNA e quindi tradotti in proteine e quelli trascritti in RNA e non tradotti (es., RNA transfer e ribosomiali).

Eterogeneità allelica fenomeno per cui mutazioni diverse dello stesso gene portano a diversi fenotipi.

Eterogeneità genetica fenomeno per cui diverse mutazioni in geni differenti possono portare allo stesso fenotipo.

Eterozigosi la presenza di alleli diversi di uno o più loci sugli stessi cromosomi.

Famiglia genica insieme di geni strettamente correlati che codificano prodotti analoghi.

FISH (ibridazione in situ fluorescente) una metodica di mappatura fisica che fa uso di sonde fluoresceinate per l'ibridazione su cromosomi metafasici o su cromatina interfasica.

Gamete cellula riproduttiva matura maschile o femminile (spermatozoo o ovulo) con un corredo cromosomico aploide (23 nella specie umana).

Gene unità fisica e funzionale fondamentale dell'eredità. Un gene è una specifica sequenza nucleotidica con una precisa collocazione cromosomica che codifica per un prodotto funzionale (proteina o molecola di RNA). Vedere espressione genica.

Genetica lo studio dei pattern di ereditarietà.

Genoma la totalità del materiale genetico contenuto nei cromosomi di un particolare organismo; la sua dimensione è data dal numero di paia di basi.

Ibridazione il processo di appaiamento dei due filamenti complementari di DNA o di uno solo di DNA e uno di RNA.

Ibridazione in situ l'uso di una sonda di DNA o RNA per rilevare la presenza di sequenze di DNA complementari in cloni batterici o in culture di cellule eucariotiche.

Informatica lo studio delle applicazioni del computer e della statistica. Nel progetto genoma, l'informatica comprende metodi rapidi di ricerca nei database per analizzare informazioni relative alla sequenza di DNA e per predire dalla sequenza genomica la struttura proteica.

Interfase la fase del ciclo cellulare che comprende la replicazione del DNA nel nucleo seguita dalla mitosi.

Introni sequenze di DNA che interrompono la sequenza codificante di un gene; queste sequenze sono trascritte in RNA ma sono tagliate ed eliminate prima che il messaggio sia tradotto in proteina. Vedere esoni.

In vitro esterno a un organismo vivente.

kb vedi kilobase.

Kilobase (kb) unità di misura del DNA corrispondente a 1000 nucleotidi.

Libreria genomica una collezione di cloni ottenuti da una serie di frammenti di DNA sovrapposti dell'intero genoma di un organismo.

Linkage la tendenza di uno o più geni o di altre sequenze di DNA in specifici loci ad essere ereditati assieme in conseguenza della loro vicinanza fisica su un singolo cromosoma; più vicini sono i marker, più bassa è la probabilità che essi siano separati durante la replicazione del DNA (fissione binaria nei procarioti, mitosi o meiosi negli eucarioti) e maggiore è quella che essi siano ereditati insieme.





Linkage map mappa delle posizioni relative dei loci genici su un cromosoma; le distanze sono misurate in centimorgan (cM).

Localizzare determinare la posizione originale (locus) di un gene o di altri marker su un cromosoma.

Locus (pl. loci) la posizione di un gene su un cromosoma.

Mappaggio genico determinazione delle posizioni relative dei geni su una molecola di DNA (cromosoma o plasmide) e della distanza tra gli stessi espressa in unità di linkage o unità fisica.

Marker posizione fisica identificabile (siti di taglio con enzimi di restrizione, geni) la cui via di trasmissione può essere seguita. I marker possono essere regioni espresse di DNA o segmenti di DNA non codificanti. Vedere RFLP (polimorfismi di lunghezza dei frammenti di restrizione).

Megabase (Mb) unità di lunghezza del DNA corrispondente a un milione di nucleotidi e uguale a 1 cM.

Molecole di DNA ricombinante una combinazione di molecole di DNA di diversa origine che sono unite utilizzando tecniche di DNA ricombinante.

Mutazione alcuni cambiamenti ereditabili nella sequenza del DNA. Vedere polimorfismo.

Omologie similitudini nelle sequenze di DNA e aminoacidiche tra individui della stessa specie o di differenti specie.

Oncogene un gene coinvolto nel controllo della proliferazione cellulare che può contribuire a trasformare una cellula normale in una cellula tumorale.

Paia di basi (bp) due basi azotate (adenina e timina o guanina e citosina) tenute insieme da deboli legami idrogeno a formare una doppia elica con i due filamenti avvolti in senso antiparallelo.

Patologie monogeniche patologie ereditarie causate da un allele mutato di un singolo gene (es. distrofia muscolare di Duchenne, retinoblastoma, anemia di cellule falciformi). Vedere anche patologie poligeniche.

Patologie poligeniche disordini genetici dovuti alla combinazione di alleli di più di un gene (diabete e alcune forme di cancro). Questi disordini dipendono dalla simultanea presenza di diversi alleli, quindi i pattern di trasmissione sono più complessi di quelli dei disordini da singolo gene. Vedere patologie monogeniche.

PCR (reazione a catena della polimerasi) metodo per amplificare una sequenza di DNA utilizzando una polimerasi termostabile e due primer di circa 20 nucleotidi, uno complementare a una estremità del filamento (+) della sequenza che si vuole amplificare, e l'altro complementare all'estremità opposta del filamento (-). Poiché i filamenti di DNA di nuova sintesi possono a loro volta fungere da stampo per gli stessi primer, cicli successivi di appaiamento dei primer, estensione e denaturazione garantiscono un'amplificazione della sequenza desiderata rapida e altamente specifica. La PCR può essere anche utilizzata per verificare l'esistenza di una specifica sequenza in un campione di DNA.

Plasmide molecola circolare di DNA extracromosomica, replicante autonomamente, distinto dal normale genoma batterico e non essenziale per la sopravvivenza della cellula. Alcuni plasmidi sono in grado di integrarsi nel genoma dell'ospite, altri, costruiti artificialmente, sono usati come vettori di clonaggio.

Polimerasi, DNA o RNA enzimi che catalizzano la sintesi di acidi nucleici a partire da molecole di DNA stampo, sintetizzando RNA a partire da ribonucleotidi e DNA a partire da deossiribonucleotidi.

Polimorfismo differenza nella sequenza di DNA tra individui di una stessa popolazione. Le variazioni genetiche che si verificano in più dell'1% della popolazione possono essere utilizzate come polimorfismi per l'analisi di linkage. Vedere mutazione.

Polimorfismo di lunghezza dei frammenti di restrizione (RFLP) differenze di dimensione dei frammenti di restrizione allelici, causate dal polimorfismo di un sito di restrizione; sequenze che risultano polimorfiche in un'analisi di RFLP sono utilizzate come markers sia nella mappatura fisica che genetica. Gli RFLP sono generalmente determinati da mutazioni in un sito di restrizione. Vedere marker.

Primer breve sequenza polinucleotidica, anche sintetica, alla quale una opportuna DNA polimerasi può aggiungere nuovi deossiribonucleotidi.

Prodotto genico il materiale biologico, RNA o proteina, derivante dall'espressione di un gene. La quantità del prodotto genico è utilizzata per valutare l'attività del gene; quantità anormali possono essere correlate alla presenza di alleli patologici.

Progetto genoma il sequenziamento completo del genoma umano e di altri organismi.

Promotore regione sul DNA a cui l'RNA polimerasi si lega per iniziare la trascrizione.

Regioni o sequenze regolatorie una sequenza di DNA che controlla l'espressione genica.

RFLP vedi polimorfismo di lunghezza dei frammenti di restrizione

Ricombinazione processo mediante il quale la progenie eredita una combinazione di geni differente da quella dei propri genitori. Negli organismi superiori, la ricombinazione avviene mediante crossing over.

RNA messaggero (mRNA) RNA che serve come stampo per la sintesi delle proteine. Vedere codice genetico.

Sequenza ordine con cui i nucleotidi sono disposti in una molecola di DNA.

Sequenze complementari sequenza di basi di acidi nucleici che possono formare una struttura a doppio filamento attraverso l'appaiamento di basi complementari.

Sequenze conservate una sequenza di DNA (o la sequenza aminoacidica di una proteina) che non subisce modificazioni durante l'evoluzione.

Sequenze ripetute in tandem copie multiple della stessa sequenza di basi su un cromosoma; usata come marker nella mappatura fisica.

Sequenziamento determinazione dell'ordine dei nucleotidi (sequenza di basi) in una molecola di DNA o di RNA o dell'ordine degli aminoacidi in una proteina.

Sito di taglio degli enzimi di restrizione una specifica sequenza di DNA che viene riconosciuta e tagliata da un particolare enzima di restrizione. Alcuni siti ricorrono più frequentemente nel DNA (es. ogni diverse centinaia di paia di basi), altri meno frequentemente (siti rari; es., ogni 10.000 paia di basi).

Sonda specifici frammenti di DNA o RNA a singolo filamento, marcati radioattivamente o immunologicamente, utilizzati per identificare sequenze complementari in un saggio di ibridazione.

Southern blotting trasferimento su membrana di nitrocellulosa o di nylon, di frammenti di DNA separati mediante gel elettroforesi, per la ricerca di specifiche sequenze nucleotidiche utilizzando sonde complementari marcate radioattivamente.

Tecniche di DNA ricombinante metodiche utilizzate per unire frammenti di DNA in un sistema cellulare libero (un ambiente esterno alla cellula o all'organismo). In opportune condizioni, una molecola di DNA ricombinante può entrare in una cellula e replicarsi in essa, sia autonomamente sia in seguito all'integrazione in un cromosoma cellulare.

Terapia genica inserzione di un DNA normale nelle cellule per correggere un difetto genetico.

Traduzione il processo mediante il quale l'informazione genetica portata da un RNA messaggero viene tradotta nella sequenza aminoacidica di una proteina. Vedere anche trascrizione.

Trascrizione la sintesi di una copia di RNA da una sequenza di DNA (un gene); la prima tappa nell'espressione di un gene. Vedere anche traduzione.

Trasferimento tecnologico applicazione al settore commerciale dei risultati scientifici ottenuti nei laboratori di ricerca.

Trasformazione un processo mediante il quale una molecola di DNA esogeno viene incorporata in una cellula precedentemente resa competente.

Vettore di Clonaggio molecola di DNA di origine virale, plasmidica o di lievito in cui viene integrato un frammento di DNA esogeno, di appropriate dimensioni, senza che vengano perse le capacità di replicazione autonoma del vettore in una cellula ospite.

YAC (cromosoma artificiale di lievito) un vettore usato per clonare frammenti di DNA di dimensioni maggiori di 400 kb; contiene sequenze telomeriche, sequenza centromerica e origine di replicazione necessaria per la replicazione nelle cellule di lievito. Vedere anche vettore di clonaggio, cosmide.