

7

Test genetici

7.1 INTRODUZIONE

I progressi compiuti nell'isolamento e nella caratterizzazione dei geni, descritti in questo libro, potenziano enormemente la capacità di diagnosticare le malattie genetiche con i metodi più tradizionali basati sull'abilità del medico sorretta da test biochimici. Questo capitolo descrive le tecniche che si possono impiegare di routine per identificare mutazioni in geni di interesse. L'applicazione di queste tecniche crea spesso rilevanti problemi etici, che verranno esaminati nel capitolo 11.

Vi sono numerose differenti situazioni in cui si potrebbero eseguire test genetici.

- Quando vi è un rischio noto di una particolare malattia, si può sottoporre a test l'embrione in vista di un'interruzione della gravidanza; oppure, i futuri genitori possono desiderare di conoscere la loro condizione di portatori per prendere decisioni riguardo alla procreazione. La situazione ottimale nei test sull'embrione si ha quando la natura della mutazione è stata definita precedentemente e quindi la sua presenza può essere testata specificamente nell'embrione. Nel caso di una malattia autosomica recessiva si dovranno identificare due mutazioni. In assenza di tale informazione, si possono "ricercare le tracce" (tracking) dei cromosomi che ospitano la mutazione usando a questo scopo marcatori polimorfici associati (linked).
- Screening di popolazione dei neonati per l'identificazione di malattie genetiche quando una diagnosi precoce assicura un chiaro beneficio e quando è disponibile un test semplice e affidabile. Viene eseguito comunemente lo screening neonatale per la fenilchetonuria usando il test di Guthrie: si preleva dal neonato un piccolo campione di sangue e lo si lascia essiccare su un cartoncino; poi si saggia la concentrazione di fenilalanina nella macchia di sangue. La stessa macchia di sangue può anche fornire materiale per altri test, come lo screening per la mutazione $\Delta F508$ in *CFTR* nelle popolazioni europee.
- Per confermare o escludere una diagnosi di malattia genetica fatta sulla base della sintomatologia clinica.
- Per diagnosticare la condizione di un individuo, di solito un adulto, a rischio di una malattia genetica a insorgenza tardiva quale la corea di Huntington (HD) o una delle predisposizioni ereditarie al cancro.
- Per determinare la condizione dei geni che predispongono a malattie complesse. È probabile che questo settore diventerà sempre più importante via via che verranno allestiti test per la suscettibilità a malattie come il diabete mellito insulino dipendente (IDDM).

Argomenti principali

- Quando si usano i test genetici
- Tipi di mutazione
- Principi generali di test genetici
- Test per mutazioni nel gene *CFTR*
- Test per mutazioni nel gene per la distrofina
- Test per mutazioni non caratterizzate
 - Polimorfismi della conformazione a singolo filamento
 - Elettroforesi su gel in gradiente denaturante
 - Identificazione mediante taglio degli appaiamenti errati
 - Test delle proteine troncate
 - Chip a DNA
 - Tracking dei cromosomi

Sommario

Lecture consigliate

- Quando è stato identificato un gene candidato coinvolto in una malattia genetica, si usano test genetici per ricercare una correlazione tra la presenza di una mutazione e l'insorgenza dei sintomi di una malattia. Questa è spesso la tappa finale nella "caccia" a un gene responsabile di una malattia (genemalattia).

I test del DNA sono stati rivoluzionati in questi ultimi anni

Qualche anno fa il lavoro in un laboratorio di diagnosi basata sul DNA consisteva principalmente nel "ricercare le tracce" (tracking) dei cromosomi responsabili di malattia nei membri di una famiglia usando RFLP analizzati mediante Southern blotting. Il Southern blotting è laborioso, implica l'impiego di radioisotopi, con i problemi di sicurezza che l'accompagnano, e richiede molto lavoro per stabilire la fase delle mutazioni e dei polimorfismi RFLP associati (linked) che segregano in una famiglia. Molte meiosi non erano informative poiché gli RFLP non erano eterozigoti e, se i marcatori associati non erano abbastanza vicini alla mutazione, la diagnosi poteva essere falsificata dalla ricombinazione. Le tecniche impiegate per lo screening delle mutazioni sono state rivoluzionate in questi ultimi anni da due sviluppi. In primo luogo, la clonazione dei geni responsabili di malattia (geni-malattia) ha permesso di allestire test diretti verso le sequenze geniche stesse invece di seguire l'eredità di cromosomi mutanti attraverso una famiglia. In secondo luogo, viene impiegata la PCR per amplificare le sequenze di DNA in modo da generare una quantità di prodotto sufficiente per essere visualizzata per fluorescenza di bromuro di etidio o per colorazione con argento. Il tracking (o "tracciamento") dei cromosomi (*chromosome tracking*) talvolta è ancora necessario quando la natura della mutazione è sconosciuta, ma oggi si può eseguire questo procedimento usando polimorfismi dei microsatelliti altamente informativi che possono essere analizzati mediante PCR.

Tre differenti problemi per chi esegue test genetici

In alcuni casi si conosce la natura della mutazione che è probabilmente a carico di un gene: in primo luogo, quando una malattia è dovuta a una sola mutazione o a un piccolo numero di differenti mutazioni in una popolazione, derivanti tipicamente da mutazioni del fondatore; in secondo luogo, quando la malattia è causata di solito da un particolare tipo di mutazione. L'esempio ovvio è costituito dalle mutazioni per espansione di ripetizioni trinucleotidiche (TRE), ma si possono considerare anche malattie come la DMD, in cui delezioni sono responsabili del 60% dei casi.

In altri casi tali informazioni non saranno disponibili. Ciò è inevitabile quando un gene viene clonato per la prima volta, nel tentativo di correlare la presenza di mutazioni con i sintomi patologici. Esistono anche molti geni in cui sono state catalogate numerose differenti mutazioni. Talvolta esse sono esclusive di una particolare famiglia o di un particolare individuo e sono dette **mutazioni private**. L'esecuzione di test per identificare la presenza di mutazioni in questi geni è un problema tecnico enorme: spesso i geni possono essere di grande dimensione e può essere che la mutazione eziologica sia un cambiamento di una singola base. Possiamo quindi riassumere tre differenti problemi che chi esegue test genetici deve risolvere.

1. La malattia è causata da una sola mutazione o da un piccolo numero di mutazioni ben caratterizzate. Questo problema verrà affrontato usando test progettati per identificare specifiche mutazioni. Questi test sono descritti nella sezione 7.2.

2. Il gene è clonato, ma vi sono molte possibili mutazioni. Per risolvere questo problema sono necessari test capaci di identificare differenze tra geni normali e geni mutanti senza definire necessariamente la natura della mutazione. Si tratta di un problema più difficile, che richiede un differente approccio, descritto nella sezione 7.2.
3. La mutazione non può essere caratterizzata, ma si può seguire il cromosoma che reca la mutazione attraverso una famiglia. Questa sarebbe stata la situazione normale 10 anni fa; oggi è meno frequente, ma talvolta può ancora presentarsi. Un esempio è presentato nella sezione 7.2.

Natura delle mutazioni

Prima di considerare le tecniche per identificare le mutazioni, dobbiamo considerare i differenti tipi di mutazione che possono presentarsi (la nomenclatura usata per descrivere le mutazioni è presentata nella scheda 7.1):

- alterazioni cromosomiche su grande scala quali delezioni e inversioni, che possono essere identificate mediante esame citogenetico;
- delezioni su piccola scala;
- espansioni di ripetizioni trinucleotidiche (TRE): questo tipo di mutazione può essere identificato facilmente e si è dimostrato assai utile nella caccia a geni come il gene per la HD;
- mutazioni che influenzano la produzione e la maturazione dell'RNA, quali le mutazioni dei promotori o dei siti di splicing;
- mutazioni che troncano la proteina codificata, quali le mutazioni nonsense e le mutazioni per slittamento del modulo di lettura (mutazioni frameshift);

Scheda 7.1

Nomenclatura usata per descrivere le mutazioni

Tutti gli esempi sono tratti da mutazioni nel gene CFTR.

Sostituzioni di amminoacidi

acido aspartico	D	leucina	L
acido glutammico	E	lisina	K
alanina	A	metionina	M
arginina	R	nonsenso	X
asparagina	N	prolina	P
cisteina	C	serina	S
fenilalanina	F	tirosina	Y
glicina	G	treonina	T
glutamina	Q	triptofano	W
isoleucina	I	valina	V
istidina	H		

Ciascun amminoacido è rappresentato con un codice a singola lettera presentato nella tabella a sinistra. La sostituzione di un amminoacido è rappresentata con un numero, che designa il residuo nel polipeptide, fiancheggiato dal codice a singola lettera dell'amminoacido originale e di quello sostituito, per esempio:

R553X Una mutazione di troncamento in cui l'arginina in posizione 553 è sostituita da un codone di terminazione.

N1303K L'asparagina in posizione 1303 è sostituita dalla lisina.

Scheda 7.1 (segue)**Nomenclatura usata per descrivere le mutazioni****Sostituzioni di nucleotidi**

Le sostituzioni di nucleotidi sono designate da un numero che rappresenta la posizione del nucleotide nel cDNA, talvolta preceduto da nt, seguito da una lettera che rappresenta il nucleotide originale (G, A, T o C) e da una freccia o da un "segno di maggiore" prima della singola lettera che rappresenta il nucleotide sostituito. Le variazioni nucleotidiche vengono normalmente specificate quando si riferiscono a sequenze nell'introne che influenzano la maturazione dell'RNA, poiché le sostituzioni nucleotidiche negli esoni le quali hanno conseguenze fenotipiche determineranno una variazione amminoacidica e verranno descritte come tali (vedi sopra). Se si riferiscono a un nucleotide in un introne, viene indicata la posizione del nucleotide più vicino, seguita da un'indicazione di quanti nucleotidi prima o dopo è avvenuta la sostituzione di base, per esempio:

621+1 G>T oppure nt621+1 G→T

Il primo nucleotide (G) nell'introne 3' vicino al nucleotide 621 nel cDNA è sostituito da T.

1717-1 G>A oppure nt1717-1 G→A

L'ultimo nucleotide (G) nell'introne 5' vicino al nucleotide 1717 nel cDNA è sostituito da A.

Delezioni e inserzioni

Le delezioni sono rappresentate da "del" o dalla lettera Δ (delta maiuscola) dell'alfabeto greco. Le inserzioni sono rappresentate da un numero, che designa il nucleotide prima dell'inserzione, seguito da "ins" e da una singola lettera che designa il nucleotide inserito, per esempio:

ΔF508	La fenilalanina in posizione 508 è deleta.
394 delT	Il nucleotide T in posizione 394 nel cDNA è deletato.
3905 insT	T è inserito dopo il nucleotide 3905.

- sostituzioni di basi che determinano una variazione della sequenza amminoacidica della proteina codificata.

Alcune di queste mutazioni, quali le mutazioni che troncano la proteina codificata o le delezioni, avranno un'influenza piuttosto ovvia sulla funzione del gene. Altre possono essere più problematiche. Per esempio, come vedremo nel capitolo 9, sono frequenti polimorfismi apparentemente neutrali e quindi talvolta è difficile stabilire se una variazione di una base abbia conseguenze funzionali. Talvolta può essere importante la natura della variazione, per esempio essa può influenzare un amminoacido altamente conservato o un sito accettore di splicing.

Materiali usati per i test

I materiali usati per i test possono essere prelevati da numerose differenti sorgenti. Un vantaggio importante dei test basati sulla PCR sta nel fatto che essi possono essere usati con piccolissime quantità di materiale.

- Una singola cellula prelevata da un embrione di otto cellule prodotto mediante fecondazione *in vitro* permette test pre-impianto (pre-annidamento). I genitori a rischio di generare un bambino affetto producono un embrione mediante fecondazione *in vitro*; poi questo viene testato per la presenza della malattia genetica e viene impiantato soltanto se non risulta affetto.
- **Villocentesi.** Il corion deriva dallo zigote ma non fa parte dell'embrione in sviluppo. È una membrana che reca estroflessioni ramificate, o villi corionici, che circondano l'embrione. La villocentesi, ossia il prelievo di una porzione di

villi corionici, si esegue introducendo attraverso la vagina un catetere finché non tocca il corion. Il test può essere eseguito con sicurezza nell'8ª o nella 9ª settimana di gravidanza. La villocentesi ha quindi un vantaggio sull'amniocentesi poiché, abbinata all'amplificazione del campione mediante PCR, permette un'interruzione della gravidanza più precoce nel caso che i risultati del test genetico indichino che è necessario questo provvedimento.

- **Amniocentesi.** Consiste nel prelievo di un campione del liquido amniotico che circonda il feto in sviluppo, contenente cellule fetali da sottoporre a test genetici. Questo procedimento richiede la puntura del sacco amniotico attraverso le pareti addominale e uterina della madre. Le cellule prelevate vengono coltivate *in vitro* per circa 3 settimane affinché aumentino di numero. Questo procedimento non può essere tentato prima della 16ª settimana di gravidanza e oggi viene eseguito meno frequentemente rispetto alla villocentesi.
- Sangue prelevato dal cartoncino del test di Guthrie. Il DNA è stabile e quindi il cartoncino può essere facilmente spedito a un laboratorio di analisi o conservato come sorgente di DNA da utilizzare in test successivi.
- Cellule boccali recuperate da un lavaggio del cavo orale.
- Un campione di sangue, usato molto spesso per test su adulti.

I test genetici vengono eseguiti di solito su materiale amplificato mediante PCR. Come stampi si possono usare sia mRNA sia DNA. Il DNA genomico può essere prelevato da qualsiasi sorgente opportuna, come un campione di villi corionici, un campione di sangue o un lavaggio del cavo orale. Contiene informazioni potenzialmente pertinenti in sequenze, quali i promotori, che non vengono espresse in mRNA. Lo svantaggio principale del DNA genomico sta nel fatto che molti geni hanno grandi dimensioni e una complessa organizzazione di introni ed esoni. Se si conosce la struttura del gene, si possono amplificare gli esoni con specifici inneschi (primer). Si usano di solito campioni di DNA per caratterizzare la presenza di specifiche mutazioni.

Poiché gli introni sono stati rimossi dal processo di maturazione, il cDNA prodotto usando mRNA come stampo è un bersaglio molto più semplice da analizzare quando non si conosce la struttura del gene. È sempre questa la situazione che si ha quando un gene viene isolato per la prima volta mediante clonazione posizionale: in questa situazione si deve dimostrare che il gene è responsabile della condizione patologica individuando una correlazione tra la presenza di una mutazione e l'occorrenza della malattia. A questo scopo si deve sottoporre a scanning il gene derivato da individui affetti e da individui normali per identificare eventuali differenze, usando le tecniche descritte nella sezione 7.3. L'mRNA è il punto di partenza anche per l'identificazione di proteine troncate, che richiede l'analisi della proteina codificata dal gene affetto e si è dimostrato superiore per l'impiego nei chip a DNA (vedi oltre).

7.2 TEST PER L'IDENTIFICAZIONE DI MUTAZIONI CONOSCIUTE

Questa sezione considera i tipi generali di test che si possono usare per identificare specifiche mutazioni e poi illustra come essi vengono impiegati con esempi tratti dalla diagnosi di fibrosi cistica (CF), distrofia muscolare di Duchenne (DMD) e una mutazione per espansione di ripetizioni trinucleotidiche (TRE).

Scheda 7.1 (segue)

Sostituzioni di nucleotidi

Le sostituzioni di nucleotidi sono indicate da un numero che rappresenta la posizione del nucleotide nel DNA, talvolta preceduto da un segno di meno (-) che rappresenta il nucleotide originale. Le variazioni nucleotidiche vengono specificate quando si riferiscono a una singola lettera che rappresenta il nucleotide. Le sostituzioni nucleotidiche degli esoni possono avere conseguenze fenotipiche determinate dalla sostituzione amminiacidica e verranno descritte (vedi sopra). Se si riferiscono a un introne, viene indicata la posizione del nucleotide vicino, seguita da un'indicazione di quando la sostituzione è avvenuta (prima o dopo) e da una indicazione di quale nucleotide è stato sostituito. Esempio:

621+1 C>T oppure 621+1 G>A

Principi generali

I test per particolari mutazioni si basano oggi per lo più sulla PCR e sono progettati secondo il particolare tipo di mutazione testato (vedi sopra). Un vantaggio della PCR sta nel fatto che in una singola reazione PCR si può includere più di una coppia di inneschi, il che permette di sottoporre a screening più di una mutazione in ciascuna reazione. Tale reazione è detta **PCR multiplex**. Mutazioni specifiche possono essere riconosciute da **oligonucleotidi allele-specifici** (ASO, *allele-specific oligonucleotides*), che si appaiano (annealing) o a una sequenza mutante oppure una sequenza di tipo selvatico, ma non a entrambe. Riguardo alla PCR, un principio importante è il fatto che i test la cui interpretazione dipende dalla presenza o dall'assenza di un prodotto di amplificazione devono avere un controllo positivo per assicurare che la reazione della PCR non fallisca per motivi tecnici, quali una polimerasi inattiva o la presenza di impurezze nel campione di DNA.

Alcuni metodi generali per riconoscere specifiche mutazioni sono i seguenti.

- Le grandi delezioni si possono riconoscere usando inneschi (primer) per la PCR in cui uno dei due inneschi o entrambi si appaiano (annealing) alla regione deleta. Il DNA deleta usato come stampo non riesce a produrre una banda di amplificazione. Questo test non può essere impiegato facilmente negli eterozigoti, in cui il cromosoma selvatico produrrà la banda attesa. È possibile eseguire la PCR quantitativa, che però, essendo tecnicamente impegnativa, non può essere usata come procedimento routinario. In pratica, l'impiego della PCR per identificare grandi delezioni è limitato alle malattie legate al sesso nei maschi.
- Le piccole delezioni si possono riconoscere amplificando una regione di 100 nucleotidi che si estende sul sito della mutazione. Una delezione si riconosce come uno spostamento di banda (*band shift*) nel prodotto. Persino differenze di un solo nucleotide si possono risolvere con un'elettroforesi accurata.
- Le mutazioni puntiformi, comprendenti sia sostituzioni di basi sia delezioni/inserzioni di uno o due nucleotidi, si possono riconoscere mediante la PCR usando ASO come inneschi. Una forma comune di test basata su questo sistema è il test noto come **sistema di mutazione refrattario all'amplificazione** (ARMS, *amplification refractory mutation system*). In questo test, si eseguono due reazioni PCR in parallelo e si fanno correre i prodotti in corsie adiacenti durante l'elettroforesi. Un innesco è comune a entrambe le reazioni; l'altro è un ASO che si appaia (annealing) nel sito della mutazione. In una reazione l'ASO si appaia all'allele selvatico, mentre nell'altra si appaia all'allele mutante. Viene così prodotta una banda nell'una o nell'altra delle corsie, a seconda che lo stampo porti l'allele selvatico oppure quello mutante. Generalmente, il test ARMS è allestito in forma multiplex che permette di procedere allo screening simultaneo di più mutazioni. Ciò richiede una costruzione accurata degli inneschi affinché si ottengano bande ben separate in seguito a elettroforesi dei prodotti di amplificazione.
- Talvolta una mutazione creerà oppure distruggerà un sito di restrizione. Si può identificare questo evento amplificando semplicemente una regione attorno al sito e tentando di digerire il prodotto con l'appropriato enzima di restrizione.
- Lo screening delle mutazioni per espansione di ripetizioni trinucleotidiche (TRE) si può effettuare usando prodotti della PCR che si appaiano (annealing) da ambo i lati del sito di espansione. Lo slittamento della replicazione durante

l'amplificazione determina spesso un effetto "scala a pioli" (*ladder effect*), che può essere molto utile per determinare con precisione il numero di ripetizioni. Un'amplificazione ampia talvolta farà sì che la distanza tra i due innesci diventi troppo grande perché la PCR operi efficientemente. Tali casi devono essere studiati mediante Southern blotting.

- Gli ASO possono essere utilizzati anche in saggi di ibridazione per identificare una mutazione. Gli ASO sono di solito attaccati alla membrana utilizzata come supporto. Essi vengono poi ibridati a DNA amplificato mediante PCR derivante dalla regione testata. Disponendo in una serie un certo numero di ASO, si possono sottoporre a screening simultaneamente numerose differenti mutazioni puntiformi. I chip a DNA sono un'estensione di questo concetto, in cui la serie di ASO è miniaturizzata per permettere di incorporare un grandissimo numero di ASO. Portando all'estremo questo procedimento, si può includere un ASO per ogni singola posizione nucleotidica, consentendo così di identificare ogni possibile mutazione puntiforme.

Test per mutazioni nel gene *CFTR*

Negli Europei e negli individui di origine europea, la mutazione $\Delta F508$ è il più comune allele CF. La frequenza degli alleli CF che sono $\Delta F508$ presenta un gradiente attraverso l'Europa: va da circa il 50% nei paesi europei meridionali all'85% in Danimarca e nella regione basca della Spagna (vedi figura 9.8). La frequenza media è di circa il 70%. Altre 12 mutazioni sono anch'esse relativamente comuni, avendo una frequenza combinata di circa il 15% (a seconda del paese). Il restante 15% di mutazioni sono singolarmente poco frequenti, ma ne sono state caratterizzate oltre 550. La distribuzione degli alleli CF ha conseguenze per i test genetici per la CF. Se si suppone che l'allele $\Delta F508$ abbia una frequenza del 70% e che gli altri alleli comuni abbiano una frequenza combinata del 15%, la frequenza delle varie classi di individui affetti da CF si può calcolare come segue:

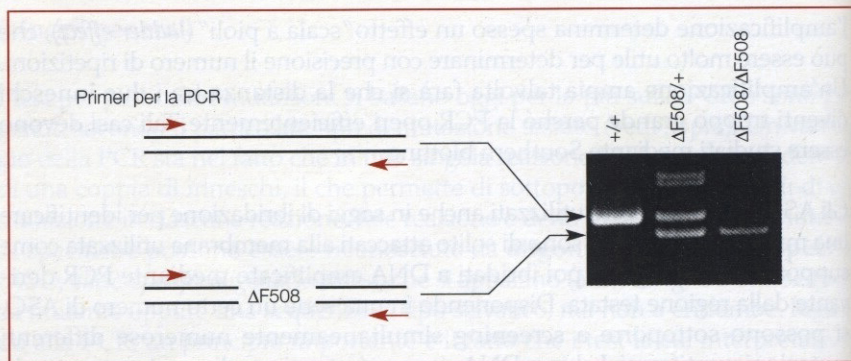
49%	$\Delta F508/\Delta F508$
21%	$\Delta F508$ /mutazione comune non $\Delta F508$
21%	$\Delta F508$ /mutazione rara
4,5%	mutazione comune non $\Delta F508$ /mutazione rara
2,25%	mutazione comune non $\Delta F508$ /mutazione comune non $\Delta F508$
2,25%	mutazione rara/mutazione rara

Questi valori numerici saranno diversi in differenti paesi europei essendo diverse le frequenze alleliche. Il punto importante è che oltre il 90% dei pazienti affetti da CF porteranno almeno un allele $\Delta F508$. Un test iniziale per la mutazione $\Delta F508$ identificherà quindi la maggior parte degli individui che sono o affetti da CF o portatori. Il test per la mutazione $\Delta F508$ insieme alle 12 mutazioni comuni identificherà il 70% dei casi di CF negli Europei (una percentuale maggiore in alcuni paesi). Sarà però difficile identificare gli **eterozigoti composti** tra la mutazione $\Delta F508$ e una mutazione rara. Questo è un fattore importante che complica i test sugli embrioni, lo screening neonatale o lo screening dei portatori negli adulti. In altre popolazioni, possono essere più frequenti differenti mutazioni e quindi i test per le mutazioni in *CFTR* devono essere progettati in modo da tenere conto della struttura genetica della popolazione locale o dell'origine etnica del soggetto.

La mutazione $\Delta F508$ si può identificare con un semplice e robusto test basato sulla PCR che amplifica una regione di 100 bp estesa sul sito della mutazione. La delezione di 3 bp fa sì che l'allele $\Delta F508$ migri un po' più velocemente rispetto all'allele selvatico; di conseguenza, tutti e tre i possibili genotipi possono esse-

Figura 7.1**Un test basato sulla PCR per la mutazione $\Delta F508$.**

Il DNA cromosomico viene amplificato usando inneschi (primer) che si appaiano da ambo i lati del sito della mutazione $\Delta F508$. I prodotti di amplificazione vengono separati su un gel di poliaccrilammide denaturante e visualizzati mediante fluorescenza di bromuro di etidio. L'allele selvatico è di 3 bp più lungo dell'allele mutante e quindi migra un po' più lentamente. Sono chiaramente distinguibili i tre possibili genotipi diploidi. Le due bande addizionali nella corsia dell'eterozigote sono eteroduplex tra il filamento di DNA di tipo selvatico e quello mutante. (Dati per cortesia del North Trent Molecular Genetic Laboratory, UK.)

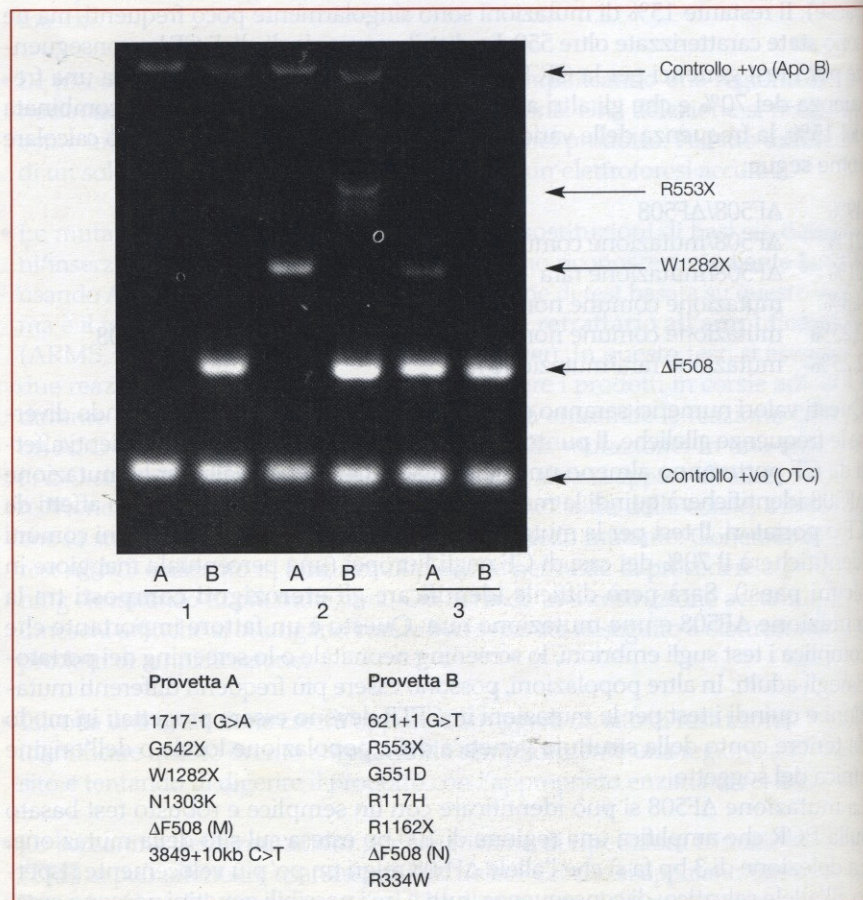


re distinti facilmente l'uno dall'altro (figura 7.1). Per riconoscere le altre 12 mutazioni CF comuni presenti nelle popolazioni europee si può usare un test ARMS multiplex. La figura 7.2 mostra il risultato di un test multiplex in cui è stato usato un kit che si trova in commercio. Questo particolare test è una lieve modificazione della forma originale del test ARMS. Eccettuati gli inneschi $\Delta F508$, le due reazioni in parallelo non sono sotto forma di coppie di ASO per l'allele mutante e l'allele selvatico, ma contengono serie di coppie di inneschi che identificano differenti mutazioni. Sono stati incorporati controlli esterni per assicurare il funzionamento della PCR.

La variazione di base talvolta crea o distrugge un sito di restrizione, il che costituisce il fondamento di un semplicissimo test per la presenza della mutazione

Figura 7.2**Test ARMS modificato per mutazioni in *CFTR*.**

Ciascun test è costituito da due reazioni (corsie A e B), ciascuna delle quali contiene sei coppie di inneschi (primer) che si appaieranno soltanto a particolari alleli mutanti; quindi, comparirà una banda soltanto se è presente la mutazione. Sono elencate le mutazioni testate da ciascuna provetta. Inoltre, la provetta B contiene una coppia di inneschi che amplifica specificamente l'allele selvatico $\Delta F508(N)$ [si noti che la provetta A contiene inneschi che amplificano l'allele mutante $\Delta F508(M)$]. Ciascuna corsia contiene due reazioni di controllo per assicurare che la PCR sia operante: una amplifica una porzione del gene per la ornitina-transcarbamilasi (OTC, *ornithine transcarbamylase*), l'altra una porzione di un gene per la apolipoproteina B (Apo B). La reazione Apo B è allestita deliberatamente in modo che sia subottimale affinché cessi di svolgersi prima se c'è un problema riguardo alla PCR. La figura mostra i risultati di test condotti su tre individui. I prodotti della PCR sono stati separati in un gel di agarosio e visualizzati mediante fluorescenza di bromuro di etidio. L'individuo 1 non contiene alcuna delle mutazioni testate, poiché nella corsia A (segue)



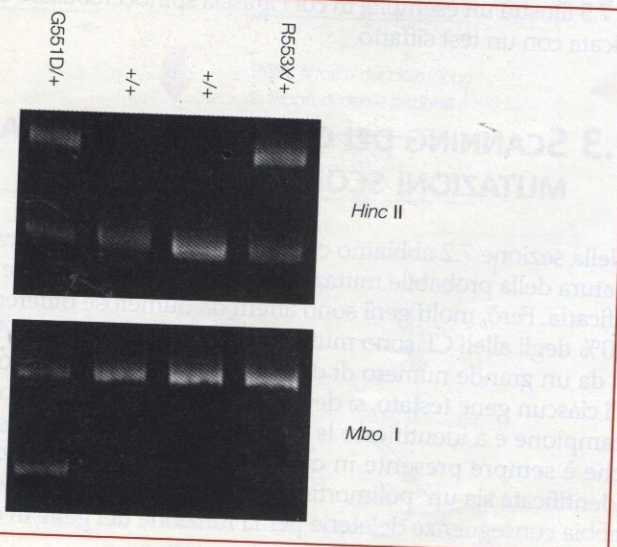
Ne è offerto un esempio nella figura 7.3 per le mutazioni G551D e R553X, che sono la terza e la sesta mutazione CF in ordine di frequenza decrescente su scala mondiale. Entrambe le mutazioni sono a carico della sequenza GTCAAC, che è il sito bersaglio per l'enzima di restrizione *HincII*. Perciò, la presenza dell'una o dell'altra mutazione è indicata dalla perdita di questo sito di restrizione. Inoltre, la mutazione G551D crea un sito *MboI*, che quindi può essere utilizzato come ulteriore test per distinguere tra le due mutazioni quando si osserva la perdita del sito *HincII*.

Questi test e altri simili forniscono un semplice mezzo per identificare l'80% + 90% delle mutazioni CF. Le rimanenti mutazioni costituiscono un problema molto più difficile, essendo impossibile sviluppare test individuali per ciascuna delle centinaia di mutazioni che sono state registrate. Si devono invece impiegare le tecniche che sottopongono a scanning il gene per identificare eventuali differenze rispetto al tipo selvatico senza definire l'esatta natura di queste differenze. Queste tecniche sono esaminate più avanti, insieme ad alcuni esempi di identificazione di mutazioni CF rare.

Lo screening neonatale per la CF si può eseguire saggiando le concentrazioni di tripsina immunoreattiva nel campione costituito dalla macchia di sangue impiegata nel test di Guthrie. Una concentrazione anormalmente elevata può indicare CF, ma potrebbe essere dovuta ad altre cause. Perciò, questi bambini vengono sottoposti a test del DNA. Poiché la maggior parte dei casi di CF avrebbero almeno un allele $\Delta F508$, lo screening per questa mutazione identificerebbe quasi tutti i casi. Questo test può essere eseguito anche sul campione di sangue usato nel test di Guthrie. Una diagnosi di CF verrebbe confermata dalla permanenza di concentrazioni elevate di tripsina immunoreattiva dopo 28 giorni e dalla misurazione degli elettroliti presenti nel sudore.

Distrofia muscolare di Duchenne (DMD)

Due terzi dei casi di distrofia muscolare di Duchenne (DMD) sono causati da grandi delezioni che rimuovono uno o più esoni. Le delezioni si raggruppano in due regioni: all'estremità 5', a carico degli esoni 3 + 8, e verso l'estremità 3', a carico degli esoni 44 + 60 (in prevalenza 44 + 50). Per identificare la perdita di questi esoni si può usare la PCR multiplex. In questo test si impiega la PCR con una miscela di differenti coppie di inneschi. Ciascuna coppia di inneschi è progettata per amplificare un singolo esone usando come stampo DNA genomico.



non vi è prodotto di amplificazione e nella corsia B vi è una banda corrispondente all'allele selvatico $\Delta F508(N)$. L'individuo 2 è un eterozigote composto W1282X/R553X, poiché vi sono una banda corrispondente a W1282X nella corsia A e una banda corrispondente a R553X nella corsia B. L'individuo 3 è un eterozigote composto W1282X/ $\Delta F508(M)$, poiché nella corsia A vi sono due bande corrispondenti a W1282X e a $\Delta F508(M)$. Benché i controlli Apo B nelle due corsie relative all'individuo 3 fossero molto deboli, la presenza delle altre bande ha confermato che la reazione della PCR si svolgeva normalmente. (Dati per cortesia del North Trent Molecular Genetic Laboratory, UK.)

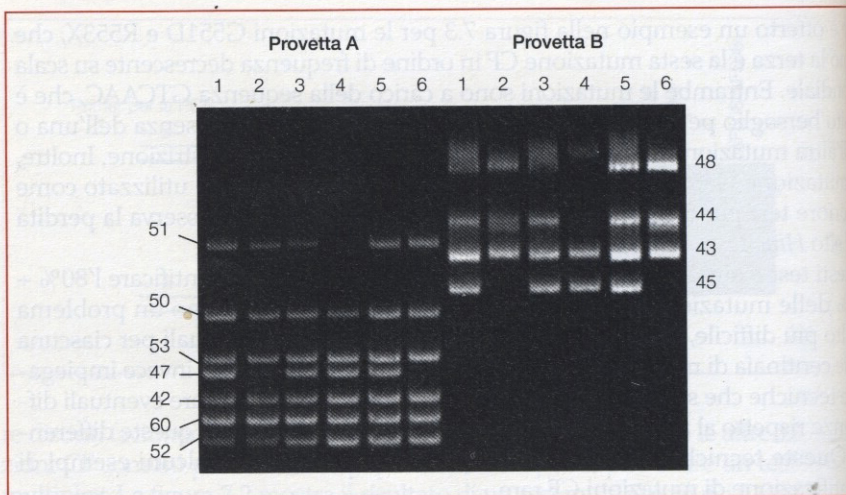
Figura 7.3

Saggi diagnostici con enzimi di restrizione per le mutazioni G551D e R553X in *CFTR*.

La sequenza di tipo selvatico, GGTCAAC, è un bersaglio per l'enzima *HincII* (sequenza sottolineata). Essa viene alterata in GATCAAC nella mutazione G553X; la sequenza alterata (sottolineata) contiene un bersaglio per l'enzima *MboI*, ma non viene più digerita da *HincII*. Nella mutazione R553X la sequenza selvatica è alterata a GGTCAAC, che non è un bersaglio per nessuno dei due enzimi. Nel test, un frammento contenente il sito di mutazione viene amplificato mediante PCR e sottoposto a digestione separatamente con ciascun enzima. Se l'individuo contiene l'una o l'altra mutazione, la digestione con *HincII* non si svolge e quindi un eterozigote produce due bande (l'allele selvatico viene ancora digerito). Quando il frammento viene digerito con *MboI*, soltanto un eterozigote G551D produce due bande poiché un allele è un bersaglio per questo enzima. (Dati per cortesia del North Trent Molecular Genetic Laboratory, UK.)

Figura 7.4**Test multiplex per delezioni nel gene per la distrofina.**

Ciascun test è costituito da due provette (A e B) contenenti coppie di innesci per la PCR che amplificano specifici esoni del gene per la distrofina, come è indicato ai lati. L'individuo 6 ha una delezione degli esoni 45 e 47, come si può giudicare in base alle bande mancanti nella provetta B e nella provetta A, rispettivamente. Ciò è dovuto probabilmente a una singola delezione che si estende sull'esone 46, che non è stato testato. L'individuo 2 ha una delezione dell'esone 45; in questo individuo la banda per l'esone 47 è debole, ma era chiaramente visibile nella fotografia originale. L'individuo 4, a quanto pare, ha una delezione degli esoni 44, 48 e 51. Questi esoni non sono contigui e quindi questo risultato verrebbe considerato con sospetto e il campione verrebbe sottoposto di nuovo a test. La spiegazione più probabile è che la PCR non sia riuscita ad amplificare le tre bande più grandi in questo campione. (Dati per cortesia del North Trent Molecular Genetic Laboratory, UK.)



I prodotti della PCR presentano una banda per ogni esone presente; perciò, l'assenza di una banda è diagnostica di una delezione. La figura 7.4 mostra un esempio di questo test basato sulla PCR multiplex per identificare delezioni di esoni nel "punto caldo" (*hotspot*) di delezioni 3'. Come abbiamo già detto, non è facile usare questo test per identificare le portatrici poiché gli esoni del cromosoma selvatico verranno amplificati.

I restanti casi di DMD non causati da delezioni sono in prevalenza dovuti a mutazioni nonsense o frameshift che causano terminazione della catena; queste mutazioni si possono identificare con il test delle proteine troncate descritto più avanti.

Espansioni di ripetizioni trinucleotidiche (TRE)

Ciascuna espansione di ripetizioni trinucleotidiche (TRE) è un evento distinto, ma ciascuna mutazione è a carico dello stesso sito e quindi può essere identificata facilmente con una reazione PCR basata su innesci che si appaiano (annealing) da ambo i lati del sito di espansione. La dimensione del prodotto della PCR indica se sia avvenuto un evento di espansione. L'entità dell'espansione può essere importante nella prognosi dell'età di insorgenza e del grado della malattia, informazioni che sono rivelate anch'esse dall'espansione. La figura 7.5 illustra un esempio, in cui l'ataxia spinocerebellare di tipo 2 viene diagnosticata con un test siffatto.

7.3 SCANNING DEI GENI PER L'IDENTIFICAZIONE DI MUTAZIONI SCONOSCIUTE

Nella sezione 7.2 abbiamo considerato alcuni studi del caso in cui si conosce la natura della probabile mutazione e si possono progettare test specifici per identificarla. Però, molti geni sono affetti da numerose differenti mutazioni: il 10% ÷ 20% degli alleli CF sono mutazioni rare. Geni quali *BRCA1* e *BRCA2* sono affetti da un grande numero di differenti mutazioni. All'infuori del sequenziamento di ciascun gene testato, si devono usare tecniche atte a sottoporre a scanning un campione e a identificare le differenze rispetto al gene selvatico. Un problema che è sempre presente in questo tipo di analisi è decidere se una variazione identificata sia un "polimorfismo" oppure una "mutazione", cioè se la variazione abbia conseguenze deleterie per la funzione del gene in questione.



Polimorfismi della conformazione a singolo filamento (SSCP)

Le molecole di acido nucleico a singolo filamento formano, in soluzione, estese strutture secondarie dovute ad appaiamento di basi intramolecolari. Questa struttura secondaria ha un grande effetto sulla velocità di migrazione durante l'elettroforesi in condizioni non denaturanti. Persino una variazione di una singola base può alterare radicalmente la struttura secondaria e quindi la velocità di migrazione di un frammento di acido nucleico. Ciò costituisce la base della tecnica dei polimorfismi della conformazione a singolo filamento (SSCP, *single stranded conformational polymorphism*), che permette di identificare la presenza di una variazione di una base senza definire il nucleotide affetto. Si impiega la PCR per amplificare il gene in corti segmenti lunghi meno di 200 bp e si separano i prodotti della PCR in condizioni non denaturanti mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide. Nella figura 7.6 è presentato un esempio in cui è stata identificata una mutazione rara nel gene *CFTR*. Questa tecnica è molto semplice e poco costosa ed è capace di identificare il 70% ÷ 95% delle variazioni di basi in frammenti di lunghezza inferiore a 200 bp.

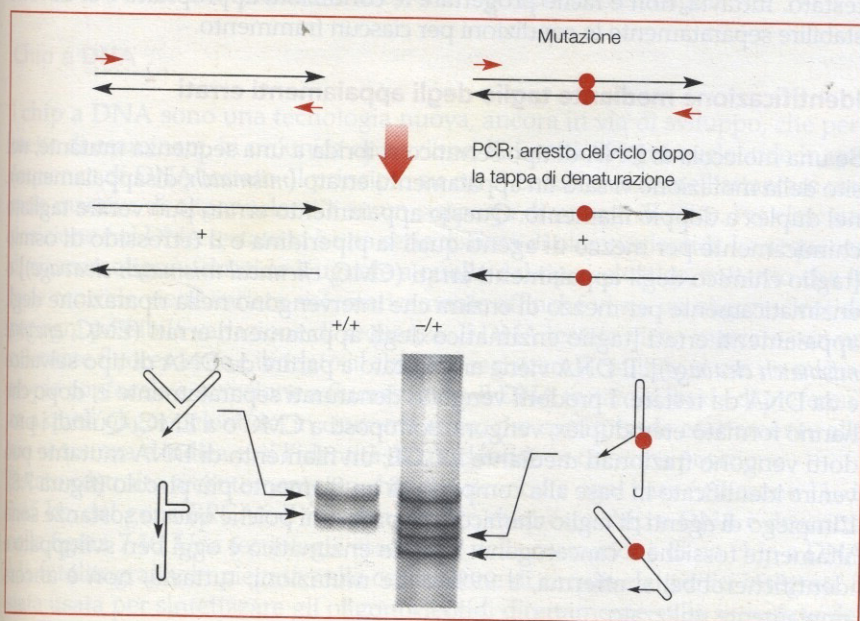


Figura 7.5

Espansioni di ripetizioni trinucleotidiche (TRE) nell'ataxia spinocerebellare di tipo 2 (SCA2). La sequenza ripetuta CAG è stata amplificata mediante innesci per la PCR che si appaiano alle regioni fiancheggianti. Gli eterozigoti SCA2 hanno una banda supplementare corrispondente all'allele amplificato. I campioni sono stati separati su un gel di poliacrilammide e visualizzati mediante colorazione con argento. (Dati per cortesia del North Trent Molecular Genetic Laboratory, UK.)

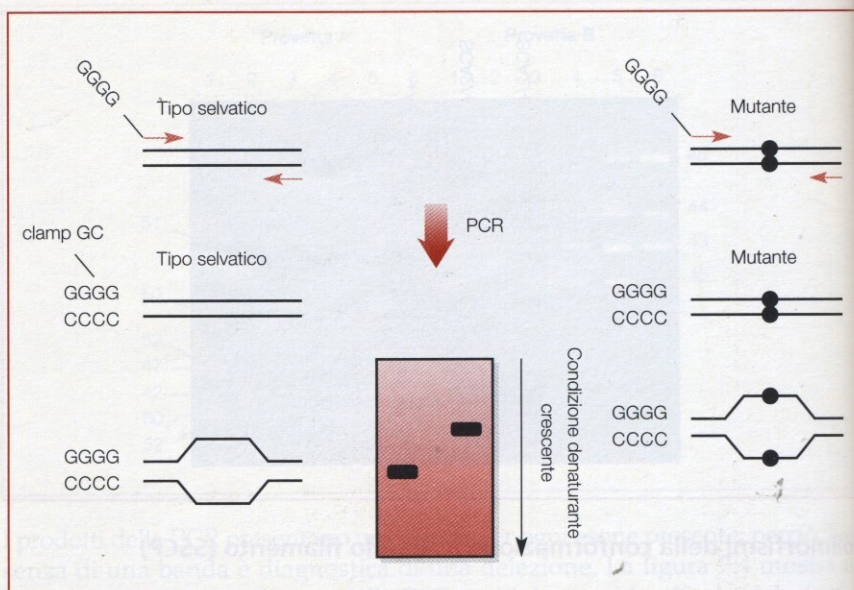
Figura 7.6

Identificazione di una mutazione rara in *CFTR* mediante la tecnica dei polimorfismi della conformazione a singolo filamento (SSCP).

Il campione di DNA selvatico di riferimento e il campione di DNA da testare vengono amplificati mediante PCR e la reazione PCR viene arrestata allo stadio di denaturazione del ciclo. I prodotti vengono caricati su un gel di poliacrilammide nativo che permette alle molecole a singolo filamento di formare una struttura secondaria, che influenza la loro velocità di migrazione. Poiché ciascun filamento assume una differente struttura, nel DNA selvatico si osservano due bande. Anche una variazione di una singola base altera la struttura secondaria, cosicché una molecola di DNA mutante produce due bande in una differente posizione e un eterozigote produrrà quattro bande (due di tipo selvatico, due mutanti). (Dati per cortesia del North Trent Molecular Laboratory, UK.)

Figura 7.7

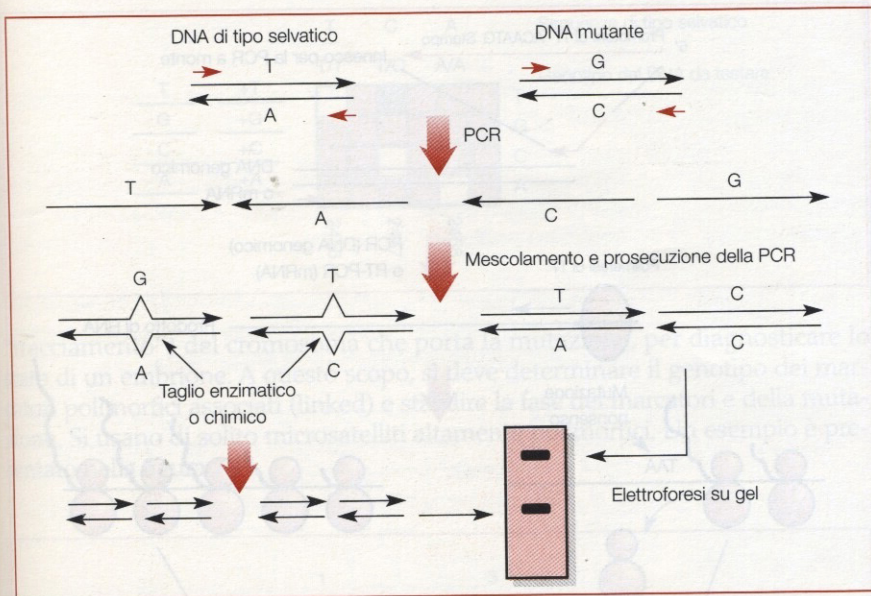
Un esempio di elettroforesi su gel in gradiente denaturante (DGGE). Il DNA selvatico di riferimento e il DNA da testare vengono amplificati mediante PCR. L'estremità 5' dell'innesco a monte viene estesa con una serie di residui C, determinando un "clamp GC" ("morsetto GC") nel prodotto amplificato. I prodotti vengono separati in un gel di poliacrilammide con un gradiente di condizioni sempre più denaturanti. Quando le molecole di DNA duplex cominciano a denaturarsi, il loro moto viene rallentato drasticamente. Questo punto è sensibile a una variazione di una coppia di basi nella sequenza, cosicché le molecole di DNA mutante e le molecole di DNA selvatico migrano fino a raggiungere differenti posizioni. Il "clamp GC" si denatura lentamente per la presenza dei tre legami a idrogeno in una coppia di basi GC. Ciò stabilizza un'estremità della molecola e, come è stato osservato empiricamente, aumenta la discriminazione tra molecole di DNA selvatico e molecole di DNA mutante.

**Elettroforesi su gel in gradiente denaturante (DGGE)**

Le molecole di DNA parzialmente denaturato migrano a una velocità molto più bassa durante l'elettroforesi su gel. Se una molecola viene sottoposta a elettroforesi in un gradiente di agenti denaturanti, quali il calore o denaturanti chimici, essa migrerà fino al punto in cui comincia a denaturarsi e poi cesserà in effetti di migrare. Questa tecnica è nota come elettroforesi su gel in gradiente denaturante (DGGE, *denaturing gradient gel electrophoresis*). Il punto in cui comincia la denaturazione è estremamente sensibile alla sequenza e verrà alterato da una variazione sia pure di una singola base. Le mutazioni possono essere quindi identificate da uno spostamento di banda (*bandshift*) nei prodotti della PCR derivati dal DNA testato rispetto al tipo selvatico (figura 7.7). Questo metodo identifica circa il 99% delle mutazioni ed è di semplice attuazione dopo che sono state stabilite completamente le condizioni per ciascun frammento di DNA testato. Tuttavia, non è facile progettare le condizioni appropriate e si devono stabilire separatamente le condizioni per ciascun frammento.

Identificazione mediante taglio degli appaiamenti errati

Se una molecola di DNA di tipo selvatico si ibrida a una sequenza mutante, nel sito della mutazione vi sarà un appaiamento errato (*mismatch*, disappaiamento), nel duplex a doppio filamento. Questo appaiamento errato può venire tagliato chimicamente per mezzo di agenti quali la piperidina o il tetrossido di osmio [taglio chimico degli appaiamenti errati (CMC, *chemical mismatch cleavage*)] o enzimaticamente per mezzo di enzimi che intervengono nella riparazione degli appaiamenti errati [taglio enzimatico degli appaiamenti errati (EMC, *enzyme mismatch cleavage*)]. Il DNA viene amplificato a partire da DNA di tipo selvatico e da DNA da testare. I prodotti vengono denaturati separatamente e, dopo che hanno formato eteroduplex, vengono sottoposti a CMC o a EMC. Quindi i prodotti vengono frazionati mediante DGGE; un filamento di DNA mutante può venire identificato in base alla comparsa di un filamento più piccolo (figura 7.8). L'impiego di agenti di taglio chimico crea problemi poiché queste sostanze sono altamente tossiche e cancerogene. Il taglio enzimatico è oggi ben sviluppato e identificherebbe, si afferma, il 99% delle mutazioni; tuttavia, non è ancora ampiamente utilizzato.

**Figura 7.8****Identificazione mediante taglio chimico degli appaiamenti errati.**

Il campione di DNA selvatico di riferimento e il campione di DNA da testare vengono amplificati separatamente mediante la PCR per un certo numero di cicli, poi vengono miscelati e sottoposti a ulteriori cicli di amplificazione mediante la PCR, il che permette la formazione di eteroduplex se è presente una mutazione nel DNA da testare. Per tagliare il DNA nel sito di eventuali appaiamenti errati vengono usati agenti chimici (quali il tetrossido di osmio o la piperidina) o enzimi di riparazione degli appaiamenti errati nel DNA. Le molecole tagliate sono più piccole e quindi migrano più velocemente sul gel.

Test delle proteine troncate

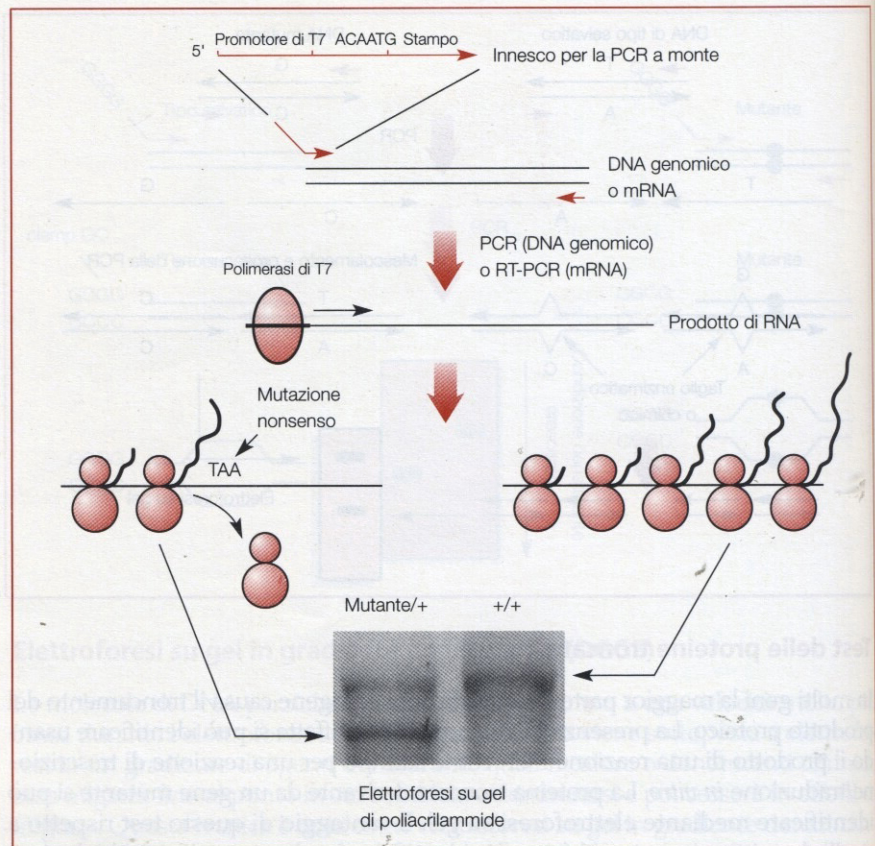
In molti geni la maggior parte delle mutazioni patogene causa il troncamento del prodotto proteico. La presenza di una mutazione siffatta si può identificare usando il prodotto di una reazione PCR come stampo per una reazione di trascrizione/traduzione *in vitro*. La proteina troncata derivante da un gene mutante si può identificare mediante elettroforesi su gel. Il vantaggio di questo test rispetto a quelli descritti prima sta nel fatto che identificherà soltanto variazioni biologicamente significative. Gli altri metodi, invece, presentano un problema: verranno identificati molti polimorfismi biologicamente neutrali e non è disponibile un metodo semplice per distinguerli dalle mutazioni patogene. Questo test è probabilmente il metodo di scelta per lo screening delle mutazioni in geni oncosoppressori quali *BRCA1*, *BRCA2* e i geni *APC*, in cui oltre il 90% ÷ 95% delle mutazioni causano la terminazione della catena. Un esempio del suo impiego nell'identificazione di una mutazione in *BRCA2* è presentato nella figura 7.9.

Chip a DNA

I chip a DNA sono una tecnologia nuova, ancora in via di sviluppo, che permette di esaminare, in un'unica operazione, l'identità di ogni nucleotide in una sequenza di DNA testato. Il principio su cui si basa consiste nell'attaccare una serie massiva di oligonucleotidi su un supporto di vetro o di silice. Per ciascuna posizione nel DNA testato vi è una serie distinta di oligonucleotidi. La sequenza di ciascun oligonucleotide è uguale a quella del tipo selvatico, soltanto che la base centrale viene variata sistematicamente affinché vi sia un oligonucleotide per ogni possibile variazione di sequenza. Il DNA testato viene marcato con un colorante fluorescente e ibridato al chip. Per registrare il risultato si usa un microscopio confocale a scansione a fluorescenza. Il DNA testato si ibrida di preferenza a quell'oligonucleotide, in ciascuna serie, che corrisponde esattamente alla sua sequenza e indica così l'identità del nucleotide in ciascuna posizione. È stato costruito recentemente un chip che riconosce ogni base nell'esone 11, di 3,45 kb, del gene *BRCA1*. Il funzionamento di questo chip a DNA è descritto nella figura 7.10. Una tecnologia essenziale nella costruzione di un chip a DNA è la fotolitografia, impiegata nella costruzione di circuiti elettronici integrati: è stata usata per sintetizzare gli oligonucleotidi direttamente sulla superficie del

Figura 7.9**Identificazione di una mutazione in *BRCA2* mediante il test per le proteine troncate.**

Un segmento del gene *BRCA2* è stato amplificato mediante la PCR. È importante la progettazione dell'innesco a monte. Esso ha un'estensione 5' che contiene la sequenza promotore per la RNA-polimerasi del fago T7, seguita da una sequenza consenso eucariotica di inizio della traduzione in proteine. L'innesco è costruito in modo che il modulo di lettura della sequenza amplificata di *BRCA2* sia allineato correttamente con la tripletta ATG della sequenza di inizio della traduzione. Il prodotto amplificato può venire trascritto *in vitro* usando la polimerasi del fago T7 e il risultante RNA può venire tradotto *in vitro* usando metionina radiomarcata con ^{35}S per visualizzare il prodotto mediante autoradiografia. Se la sequenza di *BRCA2* contiene una mutazione nonsense, la traduzione viene arrestata prematuramente e il prodotto viene troncato. Ne consegue una più elevata velocità di migrazione nel gel di poliacrilammide usato per frazionare i prodotti della traduzione *in vitro*. [RT-PCR è la sigla della PCR dopo trascrizione inversa (*reverse transcription PCR*) N.d.T.] (Dati per cortesia del North Trent Molecular Genetic Laboratory, UK.)



chip. Questa tecnologia ha permesso di attaccare i 90 000 oligonucleotidi usati nel chip *BRCA1* a un supporto che misura 1,28 cm × 1,28 cm.

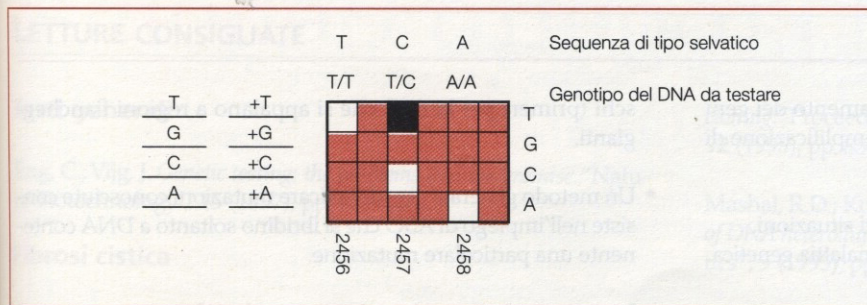
I chip a DNA possono essere costruiti in modo che riconoscano mutazioni specifiche invece di esaminare ogni coppia di basi. Ciò può semplificare l'interpretazione dei risultati poiché verrebbero identificate soltanto le mutazioni che sono certamente causa di malattia, invece di identificare tutte le variazioni di basi, molte delle quali possono essere polimorfismi neutrali. Sono già stati costruiti chip che effettuano lo screening per mutazioni note nel gene *CFTR*, nel gene per la globina β e nel genoma mitocondriale.

Sequenziamento del DNA

Il sequenziamento del DNA testato è il metodo più diretto per determinare se sia presente una mutazione. Come abbiamo già detto, il ri-sequenziamento di un grande gene per un test di routine non è fattibile per motivi pratici; però, come vedremo nel prossimo capitolo, è necessario migliorare l'efficienza di sequenziamento per portare a termine il Progetto Genoma Umano. Il metodo di sequenziamento di Sanger basato sui dideossinucleotidi è già stato automatizzato ed è oggi molto più efficiente di quanto fosse soltanto alcuni anni fa. È quindi possibile che il sequenziamento dei geni per lo screening alla ricerca di mutazioni diventi una tecnica routinaria nei prossimi anni.

Tracking di cromosomi

Quando la mutazione che causa una malattia genetica che segrega in una famiglia non può essere identificata, è necessario "ricercare le tracce" (tracking o



“tracciamento”) del cromosoma che porta la mutazione, per diagnosticare lo stato di un embrione. A questo scopo, si deve determinare il genotipo dei marcatori polimorfici associati (linked) e stabilire la fase dei marcatori e della mutazione. Si usano di solito microsatelliti altamente polimorfici. Un esempio è presentato nella figura 7.11.

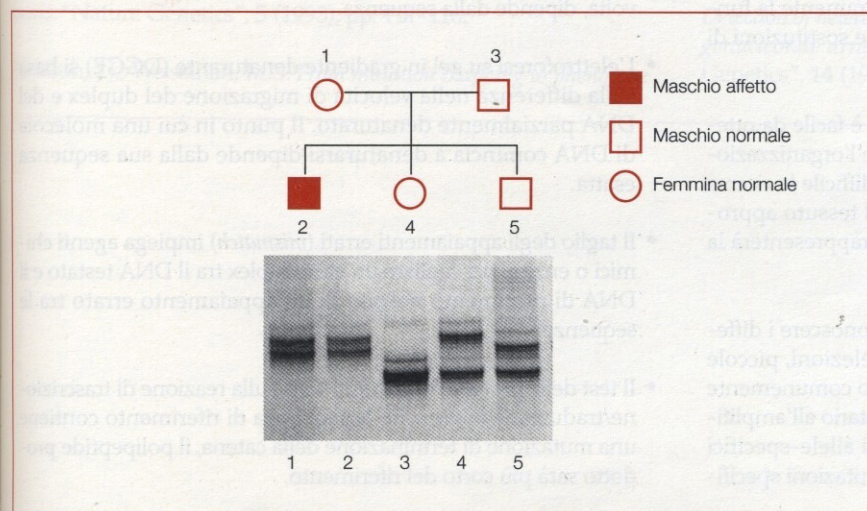


Figura 7.11

Ricerca delle tracce (tracking) della sindrome di Prader-Willi in una famiglia.

La sindrome di Prader-Willi (PWS) è caratterizzata da bassa statura, obesità e ritardo mentale ed è causata di solito da una delezione sulla copia del cromosoma 15 ereditata dal padre. La regione corrispondente nel cromosoma ereditato dalla madre viene inattivata, durante l'ovogenesi, da un processo noto come imprinting genomico. Nella famiglia mostrata qui, è stato effettuato, mediante la PCR, il tracking di un polimorfismo di microsatelliti strettamente associato (linked). Il probando (l'individuo 2), a quanto pare, ha ereditato dalla madre entrambe le copie del cromosoma 15. La spiegazione della non-paternità è stata esclusa da altri marcatori non indicati qui. Poiché entrambe le copie materne del locus per

la PWS sono inattivate dall'imprinting genomico, è assente la proteina funzionale e ne consegue la PWS. In base a questa analisi, si può assicurare la famiglia del fatto che il padre non è portatore della delezione e, se la madre concepisce di nuovo, è assai improbabile una ricorrenza della malattia. L'eredità di due differenti copie di un cromosoma dallo stesso genitore è detta **eterodisomia uniparentale**. Non è stato ancora delucidato come avvenga esattamente, ma si ritiene che la non-disgiunzione dia origine a una cellula-uovo con due copie del cromosoma 15. Lo zigote risultante sarà trisomico, ma può avvenire compensazione con conseguente perdita di una copia del cromosoma 15. Se va perduto il cromosoma paterno, allora entrambe le copie rimanenti saranno di origine materna. (Dati per cortesia del North Trent Molecular Laboratory, UK.)

Figura 7.10

Identificazione di una sostituzione di base eterozigote nel gene *BRCA1* per mezzo di un chip a DNA.

La parte sinistra del disegno schematico mostra l'organizzazione di una griglia (array) di oligonucleotidi che “interroga” la posizione di una singola base nel DNA da testare. Ogni oligonucleotide è lungo 20 nucleotidi; questa sequenza corrisponde a quella selvatica, tranne che vi è una sostituzione o un'inserzione in corrispondenza del residuo 11, come è indicato. La sequenza di RNA di tipo selvatico e la sequenza di RNA da testare sono state marcate con coloranti fluorescenti di differenti colori e poi sono state ibridate separatamente al chip. L'immagine composta per tre posizioni consecutive è mostrata a destra. Gli oligonucleotidi sono attaccati al chip in celle quadrate. Le celle rappresentate in bianco si sono ibridate con uguali intensità alla sequenza di tipo selvatico e alla sequenza da testare, le cellule di colore blu non si sono ibridate ad alcuno dei due bersagli e la cella nera si è ibridata all'RNA da testare ma non all'RNA di tipo selvatico. La sequenza di RNA da testare si è ibridata alle celle contenenti T, C e A negli oligonucleotidi corrispondenti alla sequenza di tipo selvatico, ma si è ibridata anche alla cella contenente T nella posizione 2457, la qual cosa indica che un allele conteneva T in questa posizione. L'individuo da cui è stato derivato l'RNA da testare è quindi eterozigote per una sostituzione di base nella posizione 2457. La mutazione è stata identificata anche dall'analisi quantitativa del segnale di ibridazione, poiché il DNA di tipo selvatico ha prodotto un segnale più intenso rispetto al DNA da testare nella posizione 2457C. È stato usato l'RNA poiché si è trovato che esso dà risultati superiori rispetto al DNA. L'RNA è stato generato per trascrizione *in vitro* del DNA amplificato mediante PCR. Oltre agli oligonucleotidi indicati, in ciascuna griglia sono stati inclusi anche oligonucleotidi con varie delezioni.

7.4 SOMMARIO

- I test genetici sono stati rivoluzionati dall'isolamento dei geni responsabili di malattia (geni-malattia) e dall'amplificazione di piccole quantità di materiale mediante la PCR.
- Si eseguono test genetici in numerose differenti situazioni.
 - Per diagnosticare embrioni a rischio di una malattia genetica.
 - Come screening neonatale.
 - Come ausilio alla diagnosi clinica.
 - Per diagnosticare lo stato di un adulto a rischio di una malattia genetica a insorgenza tardiva.
 - Per determinare la suscettibilità a una malattia complessa.
 - Per confermare l'identità di un gene candidato dimostrando una correlazione tra malattia e mutazione.
- Alcune mutazioni, quali le mutazioni che determinano il troncamento di una proteina, sopprimeranno chiaramente la funzione della proteina in questione. Altre, quali le sostituzioni di basi, possono essere polimorfismi neutrali.
- Per i test si può usare il DNA o l'RNA. Il DNA è facile da ottenere, ma le dimensioni estremamente grandi e l'organizzazione complessa di alcuni geni possono rendere difficile la ricerca di mutazioni sconosciute. L'RNA derivato dal tessuto appropriato può essere più difficile da ottenere, ma rappresenterà la sequenza genica in una forma più gestibile.
- Sono stati allestiti test basati sulla PCR per riconoscere i differenti tipi di mutazioni, per esempio grandi delezioni, piccole delezioni e mutazioni puntiformi. Un test usato comunemente è quello noto come sistema di mutazione refrattario all'amplificazione (ARMS), che impiega oligonucleotidi allele-specifici (ASO) per ricercare la presenza di parecchie mutazioni specifiche in due reazioni PCR parallele.
- La mutazione $\Delta F508$ in *CFTR* può essere identificata con un semplice test basato sulla PCR. Per identificare altre mutazioni comuni si può usare un test basato sulla PCR multiplex.
- Circa il 60% dei casi di distrofia muscolare di Duchenne (DMD) sono causati da delezioni nel gene per la distrofina. Esse possono essere identificate mediante un test basato sulla PCR multiplex.
- Le espansioni di ripetizioni trinucleotidiche (TRE) si possono identificare amplificando il sito di espansione mediante innesci (primer) per la PCR che si appaiano a regioni fiancheggianti.
- Un metodo generale per identificare mutazioni conosciute consiste nell'impiego di ASO che si ibridino soltanto a DNA contenente una particolare mutazione.
- Le mutazioni sconosciute si possono identificare con numerosi test che tentano di identificare differenze tra il campione testato e una sequenza di riferimento di tipo selvatico.
- La tecnica dei polimorfismi della conformazione a singolo filamento (SSCP) si basa sul fatto che la velocità di migrazione del DNA a singolo filamento attraverso un gel elettroforetico nativo è altamente sensibile alla struttura secondaria che, a sua volta, dipende dalla sequenza.
- L'elettroforesi su gel in gradiente denaturante (DGGE) si basa sulla differenza nella velocità di migrazione del duplex e del DNA parzialmente denaturato. Il punto in cui una molecola di DNA comincia a denaturarsi dipende dalla sua sequenza esatta.
- Il taglio degli appaiamenti errati (*mismatch*) impiega agenti chimici o enzimi per tagliare un eteroduplex tra il DNA testato e il DNA di riferimento nel sito di un appaiamento errato tra le sequenze.
- Il test delle proteine troncate si basa sulla reazione di trascrizione/traduzione *in vitro*. Se la sequenza di riferimento contiene una mutazione di terminazione della catena, il polipeptide prodotto sarà più corto del riferimento.
- Il sequenziamento diretto del DNA allo scopo di test routinari non è attualmente fattibile, ma può diventare più facile con il miglioramento della tecnologia di sequenziamento.
- Quando una famiglia richiede test genetici e consulenza genetica per una malattia genetica in cui la mutazione eziologica non è stata identificata, è necessario "ricercare le tracce" del cromosoma che porta la mutazione (tracking o "tracciamento" del cromosoma). Questo test viene effettuato oggi normalmente con marcatori microsatelliti associati (linked) amplificati mediante PCR.

LETTURE CONSIGLIATE

Testi generali

Eng, C.; Vijg, J. *Genetic testing: the problems and the promise*. "Nature Biotechnology", 15 (1997), pp. 422-426.

Fibrosi cistica

Ferrie, R.M.; Martin, M.J.; Robertson, N.H.; et al. *Development, multiplexing, and application of ARMS tests for common mutations in the CFTR gene*. "American Journal of Human Genetics", 51 (1992), pp. 251-262.

Metodi per mutazioni sconosciute

Grompe, M. *The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids*. "Nature Genetics", 5 (1993), pp. 111-116.

Jonsson, J.J.; Weissman, M.S. *From mutation mapping to phenotype*

cloning. "Proceedings of the National Academy of Sciences USA", 92 (1995), pp. 83-85

Mashal, R.D.; Koontz, J.; Sklar, J. *Detection of mutations by cleavage of DNA heteroduplexes with bacteriophage resolvases*. "Nature Genetics", 9 (1995), pp. 177-183.

Youil, T.; Kemper, B.W.; Cotton, R.G.H. *Screening for mutations by enzyme mismatch cleavage with T7 endonuclease VII*. "Proceedings of the National Academy of Sciences USA", 92 (1995), pp. 87-91.

Identificazione di mutazioni in BRCA1 mediante un chip a DNA

Harcia, J.G.; Brody, L.C.; Chee, M.S.; Fodor, S.P.A.; Collins, F.S. *Detection of heterozygous mutations in BRCA1 using high density oligonucleotide arrays and two-colour fluorescence analysis*. "Nature Genetics", 14 (1996), pp. 441-447.