**TEST GENETICI**

Per test genetico si intende qualunque tipo di analisi che a scopo clinico permette di definire

genotipi, mutazioni o altri tipi di alterazioni consentendo, dunque, di stabilire una diagnosi o di

confermare un sospetto diagnostico.

Questi includono screening prenatali, neonatali e dei portatori e i test sulle famiglie a rischio.

Possono essere di varia natura: possono dare una conferma di sospetto diagnostico dopo

un’indagine clinica ma ci possono essere anche test genetici rivolti ad individuare una

consanguineità o quelli volti ad indentificare il metabolismo di un farmaco.

Facendo riferimento a screening neonatali si può citare il test della fenilchetonuria,

dell’ipotiroidismo, o gli screening di poliposi al colon o per il tumore alla mammella.

Lo screening del portatore ci permette di capire se un individuo di una famiglia o una popolazione

in cui è frequente una patologia ha un genotipo malato. Permette, dunque, di individuare i portatori

asintomatici o preclinici che sono le persone che hanno un genotipo malattia ma non manifestano

ancora alcun sintomo. Questo è importante in quanto permette di fare prevenzione e di monitorare

una mutazione non ancora patologica.

Alcune patologie come la Corea di Huntington hanno una penetranza del 100%, il che vuol dire che

una mutazione si esprime sempre con quadro patologico. In questo caso un test genetico potrebbe

dire se verrà sviluppata la patologia.

Si presenta un problema etico: laddove non c’è una terapia per la patologia, è giusto fare un test

genetico? Con la consulenza genetica si danno solo informazioni, facendo decidere poi al paziente

cosa fare.

Una volta che eseguo un test genetico, il DNA viene conservato per poter essere rivalutato anche in

tempi successivi. Le strumentazioni evolute permettono di valutare il sequenziamento di uno stesso

DNA anche dopo 2 anni.

Ogni qualvolta si effettua un’indagine sul DNA va sempre firmato un consenso informato, e la

questione in ambito genetico è più complessa, in quanto il DNA andrà poi conservato e

potenzialmente riutilizzato in tempi successivi.

**PERCHE’ EFFETTUARE UN TEST GENETICO?**

Partendo dal presupposto che i test diagnostici si applicano alle persone affette da una malattia che

può avere un'origine genetica; quindi, offrono un importante aiuto al clinico nell'inquadramento di

una malattia.

Una diagnosi precisa validata da un test genetico diagnostico consente di:

* confermare il sospetto di una malattia
* sotto classificare una malattia (es. fibrosi cistica); si fa una stratificazione molecolare
* migliorare la consulenza genetica
* Stabilire la terapia (Medicina di precisione); questo migliora notevolmente la vita dei

pazienti. Esistono numerosi trials anche per malattie neurodegenerative.

Nel Parkinson e nell’Alzheimer la maggior parte dei trials sono inefficaci; non perché il

presupposto non sia stato giusto ma perché probabilmente quello che si sopravvaluta è la

classificazione clinica che viene fatta su variabili discrete. Questo significa che determinato

un sito d’esordio specifico, da lì con l’andare della patologia può cambiare. Un esempio è la

SLA che all’inizio coinvolge i motoneuroni, ma poi la sede cambia. Con la genetica le

variabili sono discrete e quindi certe: infatti una mutazione in un preciso punto, è lì e non

cambia. Classificare i pazienti a livello molecolare consente di avere terapie diverse.

**SENSIBILITA’ E SPECIFICITA’**

Specificità: corrisponde alla percentuale di campioni che sono negativi al test sul totale dei pazienti

non malati. Se esce un positivo significa che ho un falso positivo, in quanto in una popolazione non

malata non mi aspetto di trovare un positivo.

**Sensibilità**: percentuale dei campioni che hanno la mutazione rispetto alla popolazione affetta. In

questo caso posso avere dei falsi negativi.

Quale delle due è più importante? Spesso nella popolazione danno dei risultati sovrapponibili; non

vi è mai una specificità o sensibilità del 100%. Si cerca dunque di parlare di un range di veridicità a

discapito della specificità, **puntando** dunque sulla **sensibilità.**

**VALORE PREDITTIVO POSITIVO**: probabilità che un individuo risultato positivo al test abbia

effettivamente la patologia in esame.

**PERCORSO PER UNA INDAGINE GENETICA**

* Consulenza genetica pre-test
* Prelievo di sangue venoso ed Estrazione DNA
* Analisi molecolare
* Diagnosi e refertazione
* Consulenza post-test

La consulenza genetica di terzo livello può esser eseguita solo dal medico genetista, mentre quelle

di primo e secondo livello anche dai biologi.

**FASE PRE ANALITICA**

Prevede un’anamnesi familiare e la ricostruzione dell’albero genealogico, l’accettazione del

campione e la firma del consenso informato.

Sul DNA può essere eseguita una diagnosi sia **DIRETTA** che **INDIRETTA**. La diagnosi **indiretta**

è così definita in quanto si va a cercare l’allele malattia utilizzando un marcatore, seguendone la

segregazione.

Per diagnosi **diretta** si intende tutte le tecniche di analisi per l’identificazione delle varianti

(mutazioni o polimorfismi). L’estrazione del DNA può essere fatta da qualsiasi tessuto e in base a

ciò che si vuole conoscere si può utilizzare sangue, biopsie, liquor, saliva, liquido amniotico, bulbo

di capello, unghie.

**ESTRAZIONE DEL DNA**

Esistono numerosi metodi per isolare il DNA/RNA.

I principi generali per la purificazione degli acidi nucleici sono:

* Lisi delle cellule (o delle pareti) e rilascio del contenuto.
* Separazione del DNA/RNA dal contenuto cellulare in particolare dalle proteine (enzimi)

contaminanti.

* Recupero (e concentrazione) del DNA/RNA purificato.

Questa purificazione può essere ottenuta con diverse tecniche:

* L’ estrazione Fenolo/Cloroformio: prevedeva due fasi, e veniva separato il supernatante dal

DNA.

* “Salting Out”: prevede una separazione tramite concentrazioni crescenti di Sali
* kit commerciali (accorciano notevolmente i tempi di purificazione, spesso però a scapito

della resa finale); ormai sono automatici e si basano su colonne cromatografiche.

A seconda di ciò che si vuole estrarre e dal tessuto scelto si possono utilizzare tecniche

differenti. Una volta estratto il DNA, questo viene quantizzato tramite una lettura

spettrofotometrica.

**LETTURA SPETTROFOTOMETRICA**

Il DNA ha la capacità di assorbire i raggi ultravioletti alla lunghezza d’onda di 260 – 300 nm.

Immagine che contiene testo, schermata, Carattere

Descrizione generata automaticamente

C’è anche la fluorimetria che può

essere utilizzata per quantizzare il

DNA, e in quel caso si vede di più

anche il DNA libero.

Di fianco l’assorbanza.

**ELETTROFORESI SU GEL**

Una volta letto il DNA è possibile effettuare una elettroforesi su gel per una lettura

qualitativa/quantitativa. È una valutazione diversa, ma più immediata. L’elettroforesi è lo strumento

classico di cui si serve il biologo molecolare per separare, identificare ed isolare frammenti di DNA

o RNA. Come dice il nome l’elettroforesi consiste nel movimento di una molecola carica sottoposta

ad un campo elettrico generato dalla differenza di potenziale creata da un apposito alimentatore di

corrente. Poiché gli acidi nucleici sono molecole cariche negativamente (in un tampone neutro o

alcalino) migreranno verso il polo positivo.

Il DNA viene caricato in dei pozzetti e verrà visualizzato solo se colorato con un agente intercalante

in grado di emettere fluorescenza quando eccitato con lunghezze d’onda ultraviolette (es. di

colorante è l’EtidoBromuro).

L’elettroforesi è un’analisi quantitativa in quanto posso utilizzarla con un marker (DNA tagliato da

degli enzimi di restrizione) per quantizzarlo. Una volta quantizzato lo posso colorare, e una volta

caricato si avrà la corsa del DNA verso il polo positivo.

La corsa dipende dalla percentuale di agarosio nel gel. Ad esempio, in un gel di agarosio allo 0,5%

posso avere una risoluzione di 1000 – 30000 paia di basi.

**GEL ANALITICI E GEL PREPARATIVI**

Nel gel analitico ottengo già il risultato, mentre in quello preparativo appena iniziano le analisi.

**NUCLEASI**

**Immagine che contiene testo, Carattere, schermata, numero

Descrizione generata automaticamente**

Le nucleasi, ed in particolare le endonucleasi (o

enzimi di restrizione) sono dei particolari enzimi che

vanno a tagliare i legami fosfodiesterici all’interno

delle molecole di DNA. Possono avere diversi nomi

a seconda della specie batterica dalla quale derivano.

Tagliano il DNA in tutti i punti che contengono una

piccola e specifica sequenza di riconoscimento lunga

solitamente 4 – 8 nucleotidi.

Le sequenze di restrizione per la maggior parte delle nucleasi di restrizione sono normalmente

palindrome (sequenza di basi è identica su entrambi i filamenti quando ciascuno venga letto in

direzione 5’ - > 3’.

**Nomenclatura**

**Immagine che contiene testo, schermata, Carattere

Descrizione generata automaticamente**

Le estremità sporgenti (**sticky ends**) sono coesive: filamenti di DNA di origine diversa si possono

appaiare e possono essere uniti mediante legami idrogeno.

**TECNICHE PER UNA DETERMINAZIONE DIRETTA DEL GENOTIPO**

Se la sostituzione nucleotidica riguarda un sito di restrizione polimorfico (RLFP ANALYSIS)

possono essere applicate due tecniche:

1. tipizzazione mediante Southern Blotting
2. tipizzazione mediante PCR

**Immagine che contiene testo, schermata

Descrizione generata automaticamenteRFLP: POLIMORFISMI DI LUNGHEZZA DEI FRAMMENTI DI RESTRIZIONE**

Più del 50% del genoma umano presenta

sequenze che sono riconosciute dagli enzimi

di restrizione a disposizione; è possibile

individuare mutazioni o SNPs nel momento

in cui la base interessata cade all’interno di

una sequenza di riconoscimento per un

enzima di restrizione. Se un allele contiene un

sito di riconoscimento per un enzima e l’altro

no, la digestione enzimatica produrrà

frammenti di dimensione differente; in seguito, alla mutazione o alla comparsa di uno SNP può non

esistere più la sequenza per l’enzima (presente nel DNA wild type) oppure può crearsi una sequenza

per l’enzima (non presente nel DNA wild type).

**Immagine che contiene testo, schermata, giornale, Carattere

Descrizione generata automaticamenteSOUTHERN BLOTTING**

Se partiamo da DNA genomico si effettua il

Southern Blotting che è una tecnica che permette di

fissare il DNA che ha corso su un gel di agarosio su

una membrana di Nylon con una carta da filtro.

Creo, dunque, delle sonde ibridate con pezzi di

DNA noto. In questo modo capirò il punto preciso

in cui vi sono difetti molecolari come delezioni o

riarrangiamenti.

**PCR**

Tecnica scoperta da Kary Banks Mullis nel 1978 circa. Ancora oggi è l’elemento protagonista in

tutti i laboratori di biologia molecolare e genetica. Permette di avere un particolare target genico,

amplificato più e più volte. Questo significa che in poco tempo e con una piccolissima quantità di

DNA è possibile amplificare l’esone di un gene così da averne una quantità sufficiente per gli

esperimenti. Si basa sulla replicazione del DNA, con la possibilità di utilizzare dei primer che si

legano sui filamenti una volta che sono stati denaturati. La DNA polimerasi poi permette la sintesi

della nuova elica di DNA. Al termine del processo avremmo replicato il DNA di partenza.

Immagine che contiene testo, schermata

Descrizione generata automaticamente

La PCR prevede cicli ripetuti, composti ciascuno da **tre fasi**:

Immagine che contiene testo, schermata, diagramma, Carattere

Descrizione generata automaticamente1. **DENATURAZIONE**: il

DNA viene denaturato ad

una temperatura compresa

tra 92° e 95°C;

2. **ANNEALING**: la miscela

viene fatta raffreddare

gradualmente fino a

raggiungere la temperatura

che garantisce la specifica

ibridazione dei primers alle

regioni dello stampo ad essi

complementari;

3. **ALLUNGAMENTO**: la

temperatura della miscela

viene portata a 70° – 72°C

consentendo alla DNA polimerasi termostabile di sintetizzare il filamento complementare allo stampo a partire dall’innesco oligonucleotidico.

Immagine che contiene testo, schermata, Carattere, linea

Descrizione generata automaticamente

**Resa teorica**: 2n P = (2)n T

Il prodotto di PCR (P) incrementa

esponenzialmente con il numero di cicli di

PCR (n).

P dipende da T, numero di copie di stampo di

DNA di partenza. Si arriva poi ad un plateau

quando i reagenti vengono esauriti.

La scelta dei primers si può fare in rete su appositi siti. Tra i molti tools online si può usare quello

che si chiama Primer3 <http://primer3.ut.ee/> o anche UCSC Genome Browser.

Le applicazioni della PCR sono molteplici:

* diagnostica molecolare clinica; diagnosi prenatali
* identificazione di cellule tumorali, di infezioni batteriche e virali;
* analisi della variabilità genetica di popolazioni; analisi di DNA antico
* analisi di campioni biologici in medicina legale: “DNA Forense”
* analisi di campioni per controlli qualità e sicurezza alimenti
* analisi ambientali
* sequenziamento di DNA
* Clonaggio e manipolazione dei geni Mutagenesi casuale o sito-specifica; Produzione di sonde oligonucleotidiche; analisi di genoteche/identificazione e caratterizzazione di cloni ricombinanti; analisi di espressione

**ESEMPIO: DIAGNOSTICA MOLECOLARE PER L’ANEMIA FALCIFORME**

**MEDIANTE BLOTTING E PCR**

Immagine che contiene testo, schermata, diagramma, Carattere

Descrizione generata automaticamente

Nell’anemia falciforme vi è una

sostituzione nucleotidica a livello del

sesto codone. Da acido glutammico si

passa a Valina.

La sonda che utilizzo è la stessa, e riconosce una porzione del gene. A seconda però del taglio avrò

Immagine che contiene testo, schermata, Carattere

Descrizione generata automaticamentela formazione di frammenti di paia di basi di lunghezza diversa.

La PCR amplifica il DNA ma che viene

utilizzata per pezzi di 400 – 600 paia di basi,

massimo 1000. Altrimenti utilizzo il Blotting.

Amplifico l’esone che contiene la mutazione

per l’anemia falciforme. Il gene normale

viene tagliato, il patologico non viene

tagliato.

Una volta digerito vedo quante basi ho; ad

esempio, se so che il frammento amplificato è

di 500 paia di basi, so che, se il sito di restrizione è presente avrò 200 – 300 paia di basi in quanto il

DNA viene tagliato, oppure ne avrò 500 su un quadro di anemia falciforme in quanto non viene

tagliato il DNA.

La stessa cosa può essere fatta con altre mutazioni come, ad esempio, nel caso della fibrosi cistica

(CTFR).

**DNA FINGERPRINTING**

Possibilità di realizzare un’impronta genomica. VNTR indica i polimorfismi del DNA in cui la

differenza tra le diverse varianti non è data da un cambio nucleotidico (come è invece per i SNP -

polimorfismi a singolo nucleotide - o gli RFLP) ma dalla ripetizione in tandem di specifiche

sequenze nucleotidiche.

**Immagine che contiene testo, schermata, diagramma, Carattere

Descrizione generata automaticamenteTEST DI ATTRIBUZIONE DI PATERNITA’**

Si basa sull’analisi di diversi

microsatelliti. Poi viene fatta l’analisi dei

frammenti tramite GeneScan Analysis

Software.

Immagine che contiene testo, diagramma, Carattere, schermata

Descrizione generata automaticamente

Immagine che contiene testo, schermata, Carattere, diagramma

Descrizione generata automaticamenteQuando vi è un solo picco significa che

siamo in una situazione di omozigosi, mentre

quando si hanno due picchi significa che

siamo in eterozigosi.

Riveste un ruolo importante l’amelogenina

(AMEL), proteina coinvolta nel processo di

produzione dello smalto dei denti,

rappresentando in questa sede il 90% circa di

tutta la componente proteica dello smalto.

Determina inoltre il sesso: è un gene

presente sul cromosoma X e Y in posizioni

diverse, perché il sistema nel cromosoma X

sfrutta una delezione sul primo introne del gene, e presenterà un solo prodotto di amplificazione; nel caso del cromosoma Y, essendo eterozigote per la delezione sul primo introne, si avranno due prodotti di amplificazione.