

1^a Sessione

La Biologia Molecolare nella diagnostica di laboratorio

Moderatori: Prof. Salvatore Macaione (Messina)

Prof. Stefano Miccichè (Cefalù, Palermo)

Diagnostica molecolare delle malattie genetiche ereditarie

Giuseppe Castaldo

CEINGE-Biotecnologie avanzate - Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università di Napoli e Facoltà di Scienze, Università del Molise

Attualmente l'analisi molecolare permette di diagnosticare in modo rapido ed attendibile le malattie genetiche il cui numero, anno dopo anno, sta crescendo in modo esponenziale. Alla base di questo fenomeno ci sono: il progresso nella ricerca scientifica di base, che ha permesso l'identificazione di nuovi geni responsabili di malattie o associati ad esse, e lo sviluppo di tecnologie sempre più avanzate che ha consentito di aumentare la sensibilità delle analisi. L'analisi molecolare può oggi intervenire ai diversi livelli di evoluzione della malattia, qualche volta anche prima: nella diagnosi di predisposizione e nella diagnosi presintomatica, nella diagnosi - anche prenatale - di malattia, nel riconoscimento dei portatori, nella formulazione prognostica, ed infine nel monitoraggio terapeutico. Esistono mutazioni o polimorfismi genici che predispongono allo sviluppo di malattia, in questi casi è importante individuare tali varianti per effettuare diagnosi di predisposizione. Questo è il caso per esempio delle mutazioni dei geni BRCA1 e BRCA2 che codificano per geni oncosoppressori, la cui presenza non è indice di neoplasia in atto, ma di una predisposizione maggiore a sviluppare patologie tumorali familiari della mammella e dell'ovaio, esistono infatti altri eventi causali (ambientali e genetici) necessari per lo sviluppo del tumore. Le pazienti portatrici di tali mutazioni sono da considerarsi a rischio elevato e possono sottoporsi a monitoraggi frequenti ed accurati per una diagnosi tempestiva che consenta margini di terapia più ampi. Altri esempi riguardano i polimorfismi dei geni delle apolipoproteine B ed E associati a disordini del metabolismo lipidico che predispongono allo sviluppo di malattie cardiovascolari. In questo caso, gli altri fattori causali indispensabili per lo sviluppo della malattia sono gli squilibri nell'alimentazione, l'abitudine al fumo, la vita sedentaria, etc.

Diagnosi presintomatica significa individuare alterazioni di un gene che sicuramente sono causative della malattia conclamata, in una fase non ancora sintomatica, per potere intervenire tempestivamente con terapie adeguate. Distinguiamo tra le alterazioni geniche quelle quantitative nell'espressione di una proteina (e del corrispondente RNA messaggero), è questo il caso delle alterazioni nella regolazione genica che si verificano durante le trasformazioni neoplastiche che insorgono con elevata frequenza in pazienti cirrotici e che sono responsabili della riespressione di geni espressi nella vita fetale e soppressi nel fegato adulto, tra cui l'Aldolasi A. Il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato che l'analisi quantitativa dell'RNA messaggero dell'Aldolasi A in campioni biotici di fegato permette di individuare precocemente l'evoluzione neoplastica di una cirrosi (Castaldo G, et al, *Clinical Chemistry*, 2001). La diagnosi precoce può anche essere effettuata per malattie attualmente non curabili come nel caso della corea di Huntington, una severa malattia degenerativa del sistema nervoso centrale, che si manifesta intorno alla quarta-quinta decade di vita e per la quale non esiste ad oggi alcuna terapia efficace. Le alterazioni nel gene-malattia possono essere determinate geneticamente già alla nascita ma in questo caso il vantaggio della diagnosi genetica precoce sarebbe solo quella di informare il portatore del rischio di trasmettere la mutazione all'eventuale progenie. Inoltre, la consapevolezza di essere condannato a sviluppare una malattia grave ed inguaribile potrebbe comportare nel paziente gravi conseguenze psicologiche. Pertanto non sono da sottovalutare i rilevanti problemi di ordine etico, di consulenza genetica e comunicazione diagnostica al paziente e alla famiglia e, nei paesi in cui l'assistenza sanitaria è regolata da sistemi assicurativi privati, iniziano a svilupparsi anche problematiche ben più complesse di natura economica: "Condannati dal DNA" è il titolo di un capitolo dedicato a questi aspetti da una review (neanche tanto nuova) pubblicata su *Le Scienze* (Rennie J., *Le Scienze*, 1994). L'analisi molecolare svolge un ruolo di primaria importanza nella diagnosi di malattia in individui "sospetti" che presentano una storia clinica pregressa, personale o familiare. Sono innumerevoli le malattie genetiche ereditarie (talassemie ed emoglobinopatie, fibrosi cistica, emofilie, distrofie muscolari, etc) o acquisite (malattie emolinfoproliferative, alcuni tumori solidi, etc) per le quali oggi è possibile effettuare diagnosi rapide e sicure, analizzando i geni-malattia coinvolti. Ne esistono alcune nelle quali le mutazioni causative presentano un'elevata variabilità etnico-geografica come nel caso della fibrosi cistica per la quale si conoscono oltre 1000 mutazioni note nel gene-malattia, ed il nostro gruppo di ricerca, in uno studio preliminare, ha identificato un pannello di mutazioni che si riscontrano più frequentemente nel sud-Italia e che vengono testate nei pazienti provenienti da altre regioni (Castaldo G, et al, *Clinical Chemistry*, 1999). Per patologie come le leucemie oggi l'analisi molecolare permette la diagnosi e la classificazione della forma clinica in base al tipo di alterazione molecolare riscontrata in una serie di geni. Un gruppo di ricerca del CEINGE ha descritto una nuova forma di leucemia mieloide che si caratterizza per il decorso estremamente benigno, e che viene riconosciuta proprio attraverso la ricerca di uno specifico gene di fusione (Pane et al., *Blood*, 1996).

Nel caso delle malattie genetiche ereditarie recessive i soggetti affetti sono omozigoti per la mutazione causativa mentre i portatori sani, in genere asintomatici, sono eterozigoti. In molti casi soltanto l'analisi molecolare ci permette di identificare con certezza i portatori sani, perché i test di laboratorio tradizionali non sono sufficienti allo scopo. La tipizzazione molecolare può essere estesa, con un meccanismo a cascata, ai consanguinei e ad i partner dei portatori al fine di individuare coppie a rischio di procreare bambini affetti che devono essere informate, mediante un'adeguata consulenza genetica, sulla possibilità di effettuare diagnosi prenatale di malattia. Per quanto riguarda la Fibrosi Cistica, questo tipo di screening è stato attivato su oltre 200 famiglie provenienti da regioni del sud-Italia (Castaldo G, et al, *Clinica Chimica Acta*, 1998). Attualmente la diagnosi prenatale delle malattie genetiche può essere effettuata mediante amniocentesi, prelevando liquido amniotico durante il secondo semestre di gravidanza e mettendolo in coltura per consentire la crescita degli amniociti, o mediante villocentesi, prelevando già in decima settimana di gravidanza un campione di villi coriali da cui estrarre direttamente il DNA fetale per l'analisi molecolare (risparmiando quindi il tempo necessario alla coltura cellulare). Per l'analisi molecolare di molte patologie sono sufficienti 24 ore lavorative, questa riduzione dei tempi di risposta è molto utile nei casi in cui sia necessario ricorrere ad una interruzione terapeutica di gravidanza per intervenire nei tempi prescritti dalla legge. Di recente introduzione sono altre due tecniche di diagnosi prenatale effettuate sul DNA estratto da cellule fetali circolanti nel sangue materno, e sul DNA estratto da una singola cellula embrionaria in fase di preimpianto in utero o sul I globo polare, espulso dall'ovocita.

Tali tecniche offrono rispettivamente il vantaggio di potere eseguire l'analisi molecolare su un semplice prelievo di sangue periferico senza ricorrere a prelievi più invasivi che presentano un rischio, anche se minimo, di conseguenze per il feto e la madre e il vantaggio di potere pilotare la scelta dell'impianto nelle coppie che ricorrono alla fecondazione di tipo assistito (considerando tutti i problemi etici del caso). Per alcune malattie genetiche ereditarie l'analisi molecolare permette di intervenire nella formulazione prognostica prevedendo la gravità e l'espressione della malattia stessa (cosiddetta correlazione genotipo-fenotipo). E' questo il caso della correlazione genotipo-fenotipo nella fibrosi cistica, descritta dal nostro gruppo di ricerca in una review di recente pubblicazione (Salvatore F, et al, *American Journal of Medical Genetics*, 2002). L'analisi molecolare si aiuta anche nella prognosi delle neoplasie (e in qualche caso anche la scelta della terapia) che è fortemente influenzata dalla presenza di metastasi a distanza che possono sfuggire alle rilevazioni strumentali. Dal nostro gruppo di ricerca è stato dimostrato che in pazienti con tumore del polmone, circolano a livello periferico cellule neoplastiche che esprimono l'RNA messaggero dell'antigene carcinoembrionario (CEA) non prodotto dalle cellule normali di sangue circolante. Il riscontro nel sangue periferico di cellule esprimenti CEA consente di individuare i pazienti affetti da tumore del polmone che presentano un rischio più elevato (o già) metastasi a distanza (Castaldo G, et al, *Journal of Clinical Oncology*, 1997). L'analisi molecolare può essere utilizzata per il monitoraggio terapeutico, valutando per esempio il "residuo minimo di malattia" in pazienti leucemici durante la terapia. E' infatti possibile evidenziare la scomparsa delle cellule leucemiche o la persistenza di eventuali residui e quindi stabilire la linea terapeutica idonea. L'analisi molecolare può consentire inoltre di prevedere la risposta a farmaci antineoplastici come l'interferone (Pane F, et al, *Blood*, 1999). Le applicazioni della biologia molecolare clinica sono in continua di espansione. Lo sviluppo di procedure diagnostiche sempre più rapide, sensibili e, se effettuate su larga scala, anche relativamente economiche. Ci pone di fronte al problema del controllo di qualità e, più estesamente, della gestione della qualità globale nel laboratorio di biologia molecolare clinica. La situazione del nostro Paese, che vede ancora le attività di molti laboratori non conformi agli standard previsti dalle normative ISO, non è dissimile a quella degli altri paesi europei. L'Istituto Superiore di Sanità ha esteso alla citogenetica e ad alcune indagini di biologia molecolare clinica un sistema di controllo di qualità su base nazionale (Taruscio et al., *Clin Chem Lab Med*, 2004). Per quanto riguarda la diagnostica molecolare della Fibrosi Cistica, i risultati della prima esperienza di controllo di qualità europea (pubblicati senza vergogna, e per giunta su una rivista molto prestigiosa!) hanno dimostrato che quasi la metà di 136 laboratori europei partecipanti avevano commesso almeno un errore nell'analisi molecolare di sei campioni di controllo (Dequecker E, et al, *Nature Genetics* 2000). Tutto ciò è molto grave perché bisogna tenere presente che questi risultati vengono utilizzati per formulare risposte diagnostiche a pazienti affetti da malattie gravi. Un altro aspetto da non sottovalutare è l'indispensabile interazione che ci deve essere tra il personale di laboratorio ed i clinici. Solo in questo modo si possono unire le diverse competenze per potere scegliere le indagini più idonee da effettuare, interpretarle, offrire una adeguata consulenza genetica al paziente e ai familiari prima e dopo l'analisi. Un ultimo punto riguarda l'aggiornamento continuo di tutte le figure professionali coinvolte nel laboratorio di biologia molecolare clinica, per assicurare lo sviluppo di tecnologie sempre più sensibili indispensabili per stare al passo con la crescita continua delle conoscenze di base sui meccanismi patogenetici delle malattie genetiche ereditarie. Nel nostro Paese, per rispondere in modo adeguato alla richiesta di formazione di nuove figure professionali, sono stati introdotti nuovi corsi di diploma e di laurea, anche specialistica, corsi di specializzazione, master, fortemente proiettati verso la formazione nel campo della diagnostica molecolare.

Ma non dobbiamo dimenticare le figure professionali già esistenti ed operanti per le quali è indispensabile organizzare corsi di aggiornamento mirati e distribuiti sul territorio in modo da offrire possibilità omogenee di aggiornamento professionale. Il corso in cui è stata presentata questa relazione si iscrive pienamente in questa dinamica ed è uno degli esempi dell'interesse crescente che si manifesta rispetto alle tematiche dell'aggiornamento nel campo della biologia molecolare clinica.

Approccio integrato clinico-molecolare allo studio delle malattie genetiche in età evolutiva

Giovanni Corseolo

Cattedra di Pediatria, Università di Palermo

Le malattie genetiche possono essere classificate in modo vario, in rapporto alla tipologia ed al livello in cui risiedono le alterazioni stesse. Possiamo infatti identificare:

1. Aberrazioni cromosomiche, in cui esiste una variazione del numero dei cromosomi (in eccesso o in difetto) oppure una alterazioni strutturale di uno o più cromosomi che comporta comunque una modifica del patrimonio genetico individuale.
2. Difetti monogenici, con meccanismo di trasmissione di tipo mendeliano, che segue cioè le leggi classiche della dominanza, della recessività e della trasmissione legata al cromosoma X.
3. Malattie multifattoriali, dovute cioè ad una interazione tra predisposizione genetica (poligenica, legata cioè ad un particolare assetto di più geni interagenti) e fattori ambientali che agiscono come elementi scatenanti.

Lo sviluppo tecnologico applicato alle scienze biomediche ha notevolmente contribuito ai progressi recentemente ottenuti nel campo della prevenzione e della identificazione precoce delle malattie genetiche. Il momento fondamentale di ogni intervento di prevenzione è rappresentato dalla consulenza genetica offerta alla famiglia che deve spesso affrontare decisioni impegnative e difficili per cui si impongono informazione adeguata e consapevolezza.

La domanda di consulenza genetica nella popolazione odierna è certamente in sensibile aumento. Ciò in parte è dovuto alla sensibilizzazione avviata dai mass-media e dal fatto che il numero delle patologie genetiche conosciute e diagnosticabili a livello genotipico è notevolmente cresciuto.

I motivi che inducono oggi a richiedere una consulenza genetica sono numerosi:

- a) la presenza nella famiglia di uno o più soggetti con una patologia genetica nota o con una patologia malformativa o neurologica non inquadrata,
- b) la consapevolezza o il sospetto di alterazioni genetiche fenotipicamente silenti (portatore sano di mutazioni recessive, portatore di alterazioni strutturali bilanciate),
- c) poliabortività nella coppia o problemi di infertilità e sterilità,
- d) fattori di rischio anamnestico per malattie genetiche (consanguineità, età materna o paterna avanzata).

E' comunque la nascita di un neonato con un disordine su base genetica che costituisce il momento di avvio di un complesso iter diagnostico indirizzato verso l'inquadramento nosologico. Anamnesi accurata, analisi del fenotipo e diagnostica orientata sono gli elementi di maggior rilievo in questo percorso diagnostico che riguarda tutte le classi di malattie genetiche. Nel caso di malattie ereditarie a trasmissione mendeliana (autosomica dominante, autosomica recessiva, X-linked), il calcolo del rischio di insorgenza o di ricorrenza nella prole è semplice e deve essere illustrato alla famiglia insieme con le prospettive di trattamento specifico, recupero funzionale, riabilitazione e con le possibilità di diagnosi preconcezionale o prenatale. Alcune malattie genetiche ereditarie mostrano una eterogeneità eziologica (determinata da molteplicità di fattori genetici ed ambientali interagenti) e genetica (intervento di meccanismi diversi). In questi casi è spesso arduo formulare un rischio di ricorrenza preciso alla famiglia in sede di consulenza.

La individuazione di nuovi meccanismi genetici (disomia uniparentale, imprinting, amplificazione) rappresenta un ulteriore contributo non solo diagnostico ma anche preventivo. I servizi di consulenza genetica sono oggi una realtà sempre più rappresentata nei paesi occidentali. Il loro numero è cresciuto enormemente negli ultimi 30 anni parallelamente al crescere della domanda di consiglio genetico, sebbene in paesi come l'Italia ed in regioni come la Sicilia esso risulti ancora del tutto insufficiente rispetto ai bisogni di salute e di prevenzione. Alcuni fattori hanno certamente contribuito a questo fenomeno: il miglioramento delle tecniche di indagine citogenetica e molecolare del DNA, l'innalzamento dell'età media di procreazione nei paesi occidentali, la maggiore richiesta e informazione nella società e la disponibilità di diagnosi prenatale sempre più precisa ed affidabile. La consulenza genetica si basa essenzialmente su un rapporto di comunicazione, informazione e supporto della famiglia, in modo da metterla in condizioni di effettuare la propria scelta in piena libertà e consapevolezza. La consulenza genetica è, quindi, un processo di istruzione ed informazione che ha per oggetto il rischio di manifestarsi o di ricorrere di una patologia nelle famiglie e le implicazioni diagnostiche, prognostiche e terapeutiche. A tal fine è necessario che il consulente sia in possesso degli strumenti indispensabili per fornire un adeguato consiglio genetico: una diagnosi certa (qualora sia presente un caso indice) ed una buona conoscenza delle implicazioni prognostiche e terapeutiche, del modello di trasmissione della malattia e delle opportunità di diagnosi prenatale.

Indicatori molecolari di rischio cardiovascolare

Giuliana Fortunato

Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Università di Napoli, Federico II

Le malattie cardiovascolari rappresentano la maggiore causa di mortalità e morbilità nei paesi occidentali. Gli studi epidemiologici hanno identificato i fattori di rischio conosciuti come "tradizionali" (ipercolesterolemia, età, sesso,

ipertensione, diabete, fumo) che spiegano soltanto il 50% dei casi di malattia. In questi ultimi anni si è reso, quindi, indispensabile riconsiderare la migliore strategia da adottare nel laboratorio di Biochimica Clinica per la valutazione del rischio cardiovascolare. Se da una parte è necessario sempre considerare i fattori di rischio meglio conosciuti (colesterolo, HDL colesterolo, LDL colesterolo, trigliceridi), sui quali è già a disposizione una valida esperienza, dall'altra lo studio di fattori "emergenti", oggetto dell'attuale ricerca epidemiologica clinica e biomolecolare, è oggi essenziale.

Il laboratorio di Biologia Molecolare Clinica può intervenire nella determinazione di indicatori genetici di rischio coronarico (polimorfismi). Essi sono un ausilio per la caratterizzazione del rischio individuale, dovuto anche alla concomitanza di altri fattori causali, legati allo sviluppo della malattia. Oggi il laboratorio di Biochimica Clinica non può non considerare il dosaggio di nuovi fattori di rischio cardiovascolare quali le LDL ossidate, considerate un antigene chiave nel processo aterosclerotico e gli anticorpi anti-LDL ossidate (OLAB) prodotti durante lo sviluppo del processo aterogeno.

Per il dosaggio di entrambi i marcatori sono già disponibili kit commerciali che utilizzano metodi immunoenzimatici o metodi separativi (cromatografici ed elettroforetici). La standardizzazione di queste metodologie è tuttora problematica: i kit disponibili per il dosaggio immunoenzimatico degli anticorpi OLAB, a seconda dell'entità e del tipo di ossidazione (ad esempio con rame o con ferro) cui le LDL utilizzate come antigene sono sottoposte, determinano risposte anticorpali diverse, pertanto uno stesso campione può risultare con un titolo anticorpale alterato se valutato con un Kit e normale se valutato con altro in cui le LDL, utilizzate come antigene, sono state ossidate in modo differente.

Si è ancora lontani da poter utilizzare queste determinazioni sulla popolazione generale in fase di screening, ma conviene utilizzarle su sottogruppi di popolazione in cui non siano presenti i classici fattori di rischio o che presentino una storia familiare di malattia cardiovascolare. Per completare il panorama dei fattori di rischio cardiovascolare "emergenti" è necessario ricordare che in questi ultimi anni i progressi nel campo delle conoscenze di biologia molecolare hanno permesso di identificare numerosi polimorfismi genici associati ad aumento del rischio cardiovascolare. Tali polimorfismi sono correlati:

1) al metabolismo lipidico: come ad esempio il caso del polimorfismo di restrizione dell'apolipoproteina E, caratterizzato dalla presenza di tre possibili alleli (E2, E3, E4) che sembrano influenzare i livelli di colesterolo totale e colesterolo LDL (l'allele E4 si associa a valori elevati di colesterolo);

2) alla regolazione del tono vascolare: come ad esempio il caso del polimorfismo in delezione del gene dell'enzima di conversione dell'angiotensinogeno (ACE);

3) all'integrità della parete vascolare: come ad esempio il caso del polimorfismo del gene della metilene-tetraidrofolato-reduttasi (MTHFR), un enzima chiave del metabolismo dell'omocisteina. La presenza della mutazione C677T nel gene della MTHFR che determina la sostituzione di una alanina con una valina nel prodotto proteico, si associa a livelli elevati di omocisteina, conferendo al soggetto portatore della mutazione un aumento del rischio trombotico;

4) allo stato ossidativo: polimorfismi del gene della paraoxonase (PON) enzima che circola nelle HDL legato all'Apo AI, il cui ruolo sembra essere quello di inibire, nelle LDL, la formazione dei perossidi lipidici prevenendone la trasformazione in particelle aterogeniche. I principali polimorfismi genici della PON sono Gln-Arg (Q/R)192 e Met-Leu (M/L) 55 per PON 1 e Ser -Cys (S/C) 311 per PON 2.

Il nostro gruppo di ricerca ha effettuato uno studio su un gruppo di 300 donne, clinicamente sane, tipizzate dal punto di vista biochimico, genetico, vascolare (ultrasonografia carotidea), al fine di individuare fattori associati all'insorgenza di placche aterosclerotiche. I risultati raggiunti hanno evidenziato che livelli bassi di assunzione di vitamina E, elevata pressione sistolica, alto BMI, fumo, elevati livelli di LDL colesterolo, di anticorpi anti-LDL ossidate, perossidi lipidici ed il polimorfismo M55L del gene della paraoxonase sono fattori di rischio per l'insorgenza della placca aterosclerotica.

Un altro originale dato aggiuntivo, ottenuto dal nostro gruppo, è stata l'evidenza di associazione tra il polimorfismo PON2 (SC+CC) e il deficit uditivo. Tali risultati sono stati ottenuti in uno studio su soggetti lavoratori dell'industria meccanica Alenia, sottoposti a stimoli sonori intensi e protratti, dimostrando come i polimorfismi genici della PON sono coinvolti in patologie su base ossidativa. Anche lo studio dei polimorfismi associati a danno ossidativo e a rischio cardio vascolare va effettuata su sottogruppi di popolazione ben selezionati ed è auspicabile che studi prospettici effettuati su grandi popolazioni confermino sia il valore patogenetico che prognostico di tali polimorfismi, permettendone un uso costruttivo in fase di screening. Il laboratorio di Biologia Molecolare Clinica, con lo sviluppo di nuove strategie per lo studio dell'espressione genica, sia a livello della lesione aterosclerotica che a livello periferico, sta ponendo le migliori basi per la determinazione dell'espressione di geni coinvolti nel metabolismo lipidico, nello stato ossidativo e nell'infiammazione etc. L'immediato futuro clinico potrebbe quindi avvalersi dell'identificazione di nuovi marcatori genetici prognostici per lo sviluppo della patologia aterosclerotica.

Malattie monogeniche del metabolismo lipidico

Maurizio Averna

Dipartimento di Medicina Clinica e delle Patologie Emergenti, Università di Palermo, Palermo

Ad oggi numerose malattie del metabolismo lipoproteico sono causate da alterazioni di singoli geni.

Verranno passate in rassegna le Malattie Monogeniche più rilevanti, responsabili di elevati o bassi livelli di Colesterolo,

bassi livelli di HDL ed elevati livelli di Chilomicroni. Saranno affrontati in particolare alcuni aspetti della Ipercolesterolemia Autosomica Dominante (ADH). La ADH (OMIM143890), rappresenta un fattore di rischio per malattia coronarica su base aterosclerotica. È caratterizzata da elevati livelli di LDL-Colesterolo dovuti a mutazioni dei geni del recettore delle LDL o dell'APOB. Recentemente un terzo locus genico è stato associato con ADH ed il gene responsabile è stato identificato sul cromosoma 1p32. Ad oggi sono state identificate cinque mutazioni su questo gene (PCSK9 codificante per NARC-1 - neural apoptosis regulated convertase). Questi pazienti sono clinicamente indistinguibili dai pazienti FH e FDB eterozigoti. Ad oggi sono note più di 750 mutazioni nel gene del recettore per LDL responsabili di Ipercolesterolemia Familiare (FH), ma il "pattern" di queste mutazioni varia considerevolmente in popolazioni differenti. In un nostro studio precedente abbiamo valutato la frequenza di mutazioni note in un gruppo di pazienti con FH non consanguinei che rispondevano ai criteri diagnostici di FH "probabile" utilizzando una strategia di screening basata su PCR e restrizione enzimatica e procedure di PCR-ibridazione allele specifica. Questo metodo di screening non è risultato efficace (9,8 % di diagnosi molecolari) e per tale motivo abbiamo disegnato una strategia di screening basata su procedura di sequenza diretta per analizzare la regione del promotore, i 18 esoni e le sequenze fiancheggianti introniche del gene del recettore delle LDL, per studiare la gamma di mutazioni che causano FH in pazienti che rispondono ai criteri diagnostici di FH "definito" nei quali non era stato identificato alcun grosso riarrangiamento del gene del recettore delle LDL.

La tipizzazione molecolare condotta utilizzando questa metodologia di screening ci ha permesso di identificare il difetto molecolare del gene del recettore delle LDL nel 70 % circa dei probandi e delle famiglie oggetto di studio. Le mutazioni Palermo-1 (esone 11) e 1257 C<G (esone 9) sono le più frequenti nella nostra popolazione (29 % delle diagnosi molecolari). Inoltre abbiamo identificato quattro nuove mutazioni del gene LDL-R che confermano la eterogeneità di questa malattia in Sicilia. Una di queste interessa il sito di splicing 3' dell'introne 16 (G>A a 2390 -1). Questa mutazione altera il sito di splicing ed abbiamo dimostrato gli effetti sull'espressione proteica e su mRNA utilizzando fibroblasti in coltura ottenuti attraverso la biopsia cutanea effettuata su uno dei pazienti portatori di questa variante nucleotidica. La ADH è costituita da un gruppo di malattie monogeniche e l'eterogeneità genetica di tale fenotipo fa prevedere la scoperta di nuovi geni candidati.

Terapia genica: prospettive per l'applicazione clinica

Lucio Pastore

Dipartimento di Biochimica e Biotecnologie Mediche, Università degli Studi di Napoli "Federico II" e CEINGE-Biotecnologie Avanzate, Napoli, Italia

Nonostante i notevoli progressi in campo medico, le terapie farmacologiche convenzionali non sono efficaci per una buona parte di patologie geneticamente determinate. L'introduzione di una versione corretta del gene alterato mediante procedure di terapia genica sembra essere l'unica possibilità terapeutica in alcune malattie ereditarie. I progressi nel campo della terapia genica sono stati rallentati dalla scarsa efficienza o dall'elevata tossicità di alcuni dei vettori utilizzati per favorire la trasduzione del DNA contenente l'informazione corretta nella cellule bersaglio. Negli ultimi anni gli sforzi maggiori sono stati incentrati sullo sviluppo di vettori sempre più efficienti e sicuri per l'espressione di geni terapeutici in organi bersaglio quali polmoni, fegato e tessuto nervoso centrale. Alcune esperienze fatte con vettori adenovirali di tipo helper-dependent e vettori adeno-associati in modelli animali di patologie fanno ritenere che con opportune modifiche questi vettori potranno contribuire alla terapie di alcune patologie geneticamente determinate.