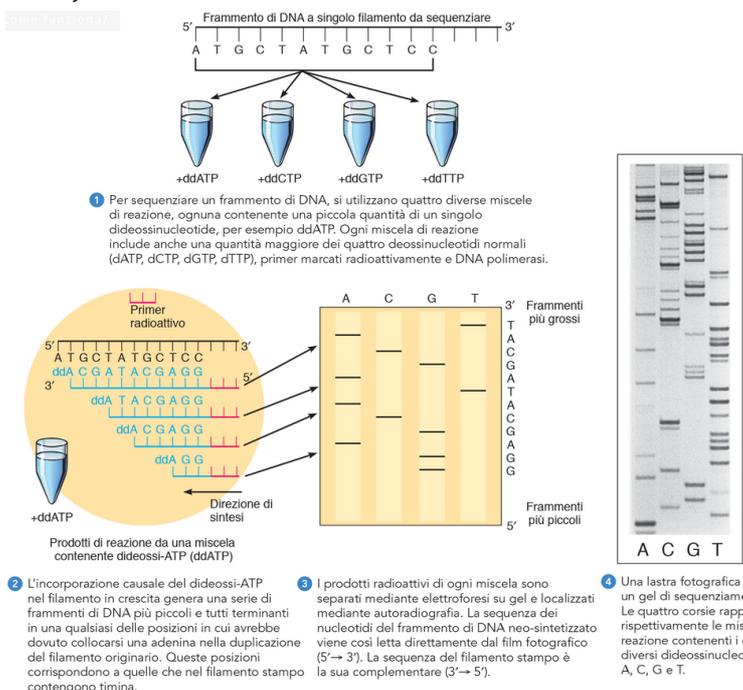


qualche processo industriale o farmaceutico. Indipendentemente dal tipo di applicazione, molto deve essere noto sul gene e su come funziona prima che possa essere “ingegnerizzato” per una particolare applicazione. Normalmente, la prima tappa consiste nella determinazione della sequenza nucleotidica.

Negli anni '90, l'avvento di macchine per il sequenziamento automatizzato del DNA connesse a potenti computer ha permesso ai ricercatori di sequenziare enormi quantità di DNA in maniera rapida ed affidabile. Il sequenziamento automatizzato del DNA si basa sul metodo di terminazione della catena, sviluppato nel 1974 dal biochimico britannico Fred Sanger. Nel 1980 Sanger condivise con il biochimico statunitense Walter Gilbert il premio Nobel per la Chimica grazie a questo contributo. Per Sanger si trattava del secondo premio Nobel, avendone già ricevuto uno per il suo lavoro sulla struttura della proteina insulina. Sebbene il sequenziamento del DNA sia oggi completamente automatizzato, molte delle tecniche automatizzate sono ancora basate sul metodo di terminazione della catena sviluppato da Sanger (FIG. 15-10).



## METODO DI RICERCA

### Perché si usa?

Il metodo di terminazione della catena con dideossinucleotidi è un sistema rapido ed efficiente per sequenziare il DNA.

### Come funziona?

FIGURA 15-10

*Il metodo di sequenziamento del DNA basato sulla terminazione del filamento con dideossinucleotidi*

Questo metodo usato per sequenziare il DNA è basato sul fatto che un filamento di DNA che si replica e che ha incorporato un particolare tipo di nucleotide modificato, noto come **dideossinucleotide**, non può essere allungato oltre quel punto. Rispetto a un deossinucleotide “normale” il quale ha un gruppo ossidrilico al carbonio 3', un

dideossinucleotide manca appunto dello stesso gruppo ossidrilico nella posizione 3'. (Ricordate dal Capitolo 12 che il gruppo ossidrilico al 3' è necessario per la reazione che porta alla formazione del legame fosfodiesterico). Perciò, i dideossinucleotidi interrompono l'allungamento durante la replicazione del DNA.

Si preparano quindi quattro differenti miscele di reazione. Ognuna contiene copie multiple a singolo filamento del DNA da sequenziare, DNA polimerasi, primer marcati radioattivamente e tutti e quattro i deossinucleotidi necessari per sintetizzare il DNA: dATP, dCTP, dGTP e dTTP. Ogni miscela di reazione include anche una piccola quantità di uno solo dei quattro dideossinucleotidi, ddATP, ddCTP, ddGTP e ddTTP. Il prefisso “dd” viene utilizzato per distinguere i dideossinucleotidi dai deossinucleotidi, che vengono identificati con “d”.

Consideriamo ora come procede la reazione nella miscela che include ddATP. In ogni punto in cui c'è un'adenina, il filamento in sintesi può incorporare casualmente un ddATP e non essere più in grado di allungarsi oltre. Di conseguenza, si forma una miscela di frammenti di DNA di varia lunghezza nella miscela di reazione. Ogni frammento che contiene un ddATP marca una specifica posizione in cui l'adenina si trova normalmente. Allo stesso modo, nella miscela di reazione che include ddCTP, ogni frammento che contiene ddCTP marca la posizione di una citosina, e così via.

I frammenti radioattivi di ogni reazione sono denaturati e poi separati per elettroforesi su gel; ogni miscela di reazione, corrispondente a A, T, G e C, occupa una corsia separata sul gel. Le posizioni dei frammenti nel gel possono essere determinate per autoradiografia. Poiché l'alta risoluzione del gel rende possibile la distinzione tra frammenti che differiscono in lunghezza per un solo nucleotide, si può leggere la sequenza una base alla volta.

Il metodo di terminazione della catena è ancora oggi utilizzato negli apparecchi per il sequenziamento automatizzato del DNA. Tuttavia, il metodo di rivelazione è cambiato, in quanto la sequenza di nucleotidi non viene più visualizzata mediante radioattività, ma attraverso la marcatura del primer o di ognuno dei quattro ddNTP con una molecola fluorescente di diverso colore. Il computer utilizza un laser per leggere la

fluorescenza dei marcatori colorati, ogni volta che una base attraversa il raggio del laser durante la corsa nel gel elettroforetico ( FIG. 15-11 ).

### L'utilizzo dei sequenziatori automatici del DNA ha permesso di sequenziare interi genomi

Le odierne macchine per il sequenziamento sono estremamente potenti e possono decodificare circa 1,5 milioni di basi in un periodo di 24 ore. Gli avanzamenti nella tecnologia del sequenziamento hanno reso possibile lo studio della sequenza nucleotidica di interi genomi in una grande varietà di organismi, sia procariotici che eucariotici.

Molta di questa ricerca ha ricevuto un forte impulso iniziale con il Progetto Genoma Umano , avviato nel 1990. Nel 2001, l'intera sequenza dei tre miliardi di coppie di nucleotidi che costituiscono il genoma umano è stata praticamente completata. Attualmente, i genomi di più di 100 organismi diversi sono stati sequenziati e molte altre centinaia sono in progettazione o vicine al completamento. Siamo nel mezzo di una straordinaria esplosione di dati riguardanti le sequenze geniche, e ciò è certamente attribuibile all'utilizzo sempre più frequente di metodi di sequenziamento automatizzati.

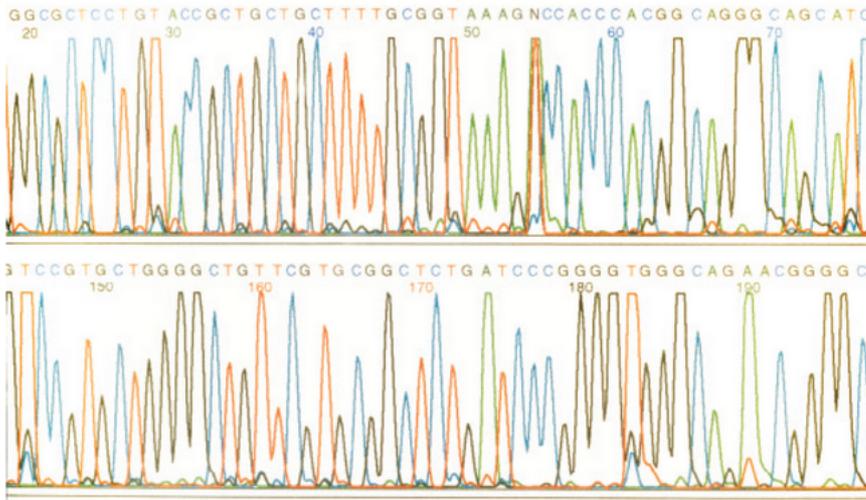


FIGURA 15-11

*Un piccolo segmento dell'elettroferogramma con i risultati di un sequenziamento automatizzato del DNA*

Il computer produce la serie di picchi illustrata, mediante la lettura delle bande fluorescenti sul gel. La base adenina è colorata in verde, la guanina in nero, la citosina in blu e la timina in rosso. La sequenza precisa del DNA, decifrata dal computer, appare al margine superiore della stampa.

Le informazioni inerenti le sequenze del DNA vengono oggi depositate in grandi

banche dati informatizzate, a molte delle quali si può accedere attraverso Internet. Esempi includono le banche dati del National Center for Biotechnology Information e della Human Genome Organization (HUGO). I genetisti possono utilizzare queste banche dati per confrontare una nuova sequenza con quelle già conosciute ed identificare geni, nonché ottenere molte altre informazioni, non solo sulla funzione e la struttura del prodotto genico, ma anche sul rapporto fra i vari geni in termini evolutivi e sulla variabilità delle sequenze geniche in una popolazione. Il sequenziamento del DNA nelle diverse specie ha inoltre portato un contributo importante a supporto delle teorie evolutive (come sarà discusso nel Capitolo 18 ).

### Verifica

- Che cos'è un Southern blot?
- Quale tecnica viene utilizzata per il sequenziamento automatico del DNA? Descrivete i passaggi fondamentali di tale metodica.

## 15.3 LA GENOMICA

### OBIETTIVO DI APPRENDIMENTO

7. Descrivere le tre grandi aree di ricerca della genomica.
8. Spiegare come funziona un DNA microarray e fornire un esempio del suo potenziale in campo medico e nella ricerca.
9. Definire la farmacogenomica e la proteomica.

Adesso che abbiamo sequenziato il genoma umano e quello di molte altre specie, cosa ne facciamo di tutte queste informazioni? La genomica è un campo emergente della biologia che studia l'intera sequenza del DNA del genoma di un organismo per identificare i singoli geni, per determinare i corrispondenti RNA o prodotti proteici e per comprendere le loro modalità di regolazione. Come si vedrà in seguito, la genomica presenta importanti applicazioni pratiche, oltre a fornire risposte agli interrogativi scientifici.

La genomica presenta diverse aree di ricerca che comprendono la genomica strutturale, la genomica funzionale, la genomica comparativa e la metagenomica. La *genomica strutturale* si occupa della

mappatura e del sequenziamento dei genomi. La **genomica funzionale** riguarda le funzioni dei geni e delle sequenze non codificanti presenti nei genomi. La **genomica comparativa** consiste nella comparazione dei genomi di specie differenti per determinare quali cambiamenti siano avvenuti nel DNA nel corso dell'evoluzione. Tali informazioni approfondiscono le nostre conoscenze sulle relazioni evolutive in quanto geni caratterizzati da bassa, o addirittura assente, variabilità genetica tra specie rivestono un ruolo funzionale importante. La metagenomica utilizza le tecniche della genomica per analizzare comunità di microrganismi al posto di singoli individui. La **metagenomica** consente l'identificazione e lo studio contemporaneo di tutti i geni in una comunità.

### **L'identificazione dei geni che codificano proteine è utile per la ricerca e per le applicazioni mediche**

La maggior parte del genoma umano contiene sequenze di DNA che non codificano proteine. Sebbene l'intero genoma sia interessante per i biologi, le regioni codificanti proteine sono di particolare interesse per i ricercatori in campo medico. Gli scienziati hanno raccolto decine di migliaia di corte sequenze di cDNA (da 25 a 30 nucleotidi), note come EST, ovvero expressed sequence tags (pur non esistendo un corrispettivo italiano nella terminologia potremmo definire questi marcatori come "etichette di sequenze espresse") che possono contribuire ad identificare i geni che codificano proteine.

Su Internet è disponibile una gran quantità di dati contenenti migliaia di EST umane. Con l'utilizzo di un programma per la ricerca dei geni, i biologi che lavorano con una determinata sequenza di DNA possono accedere a questi dati e confrontare la loro sequenza con una sequenza EST nota.

Molte delle EST presenti in banca dati sono state identificate mettendole a confronto con sequenze di DNA note di altre specie. Per esempio, il gene della telomerasi umana **TRT** è stato identificato confrontando la sua sequenza EST con quella di una telomerasi di lievito nota. (Ricordate dal Capitolo 12 che la telomerasi aggiunge sequenze nucleotidiche ripetute alle estremità, o telomeri, dei cromosomi eucariotici).

### **Una modalità di studio della funzione genica consiste nel silenziare i geni uno per volta**

L'RNA interference (RNAi), scoperta nella metà degli anni '90, può essere utilizzata per determinare rapidamente la funzione di uno specifico gene. Si ricordi dal Capitolo 13 che la RNA interference (RNAi) è un fenomeno determinato da piccole molecole di RNA che interferiscono con l'espressione dei geni o, più precisamente, con i loro trascritti di mRNA maturi. L'RNA interference coinvolge i piccoli RNA interferenti (siRNA), i microRNA ed altri tipi di corte molecole di RNA. I biologi ipotizzano che l'RNAi, che si verifica in molti organismi eucariotici, si sia evoluta originariamente in natura come meccanismo di protezione delle cellule da virus contenenti molecole di RNA a doppio filamento.

Dopo l'identificazione di un gene codificante una proteina, avvenuta eventualmente mediante l'utilizzo delle EST, la funzione di quel gene può essere studiata adoperando l'RNA interference per reprimerne l'espressione. Per fare ciò, si sintetizza una breve sequenza di RNA complementare ad una parte della sequenza di DNA del gene in esame. L'RNA è veicolato all'interno della cellula e, una volta ottenuto il silenziamento del gene, si osservano gli eventuali cambiamenti fenotipici per determinare la funzione della proteina mancante.

### **Anche il "gene targeting" rivela la funzione di un gene**

Un altro strumento estremamente potente per rivelare la funzione di un gene è il gene targeting (che potremmo tradurre come "bersagliamento genico"), una procedura nella quale un singolo gene viene scelto e messo "fuori combattimento" (knockout genico) o inattivato in un organismo. I **topi knockout** sono modelli comunemente utilizzati per lo studio del ruolo di geni ortologhi con funzione sconosciuta nei mammiferi, incluso l'uomo. I geni ortologhi sono geni omologhi identificati in specie diverse e così definiti in quanto ereditati da un progenitore comune (ancestore). Il ruolo del gene inattivato può essere determinato osservando il fenotipo del topo portatore del gene inattivato. Per esempio, se il gene codifica per una proteina, lo studio di individui privi di quella proteina può portare alla comprensione della sua funzione. Dato che circa il 98-99% dei loci genici del topo sono ortologhi a quelli dell'uomo, le conoscenze su quelli geni inattivati nel topo forniscono informazioni anche su quelli corrispondenti presenti nell'uomo.

A differenza della RNA interference, il gene targeting è una procedura piuttosto complessa e laboriosa; è richiesto infatti circa un anno per ottenere un nuovo ceppo di topi knockout con un gene "spento". Inizialmente, il gene non funzionale (knockout) è introdotto in cellule staminali embrionali ( cellule ES ) di topo (vedi anche i Capitoli 1 e 17 ). La manipolazione delle cellule ES è particolarmente semplice, in quanto, come le cellule tumorali, possono essere mantenute in coltura per un tempo indefinito. Ancora più importante è il fatto che, se vengono introdotte in un embrione di topo, esse sono in grado di dividersi e di originare tutti i tipi cellulari normalmente presenti. In una frazione molto piccola di queste cellule ES, il gene knockout introdotto si associa fisicamente con il gene corrispondente, presente in uno specifico cromosoma. Se questo avviene, il gene introdotto e quello originario avranno la possibilità di scambiarsi

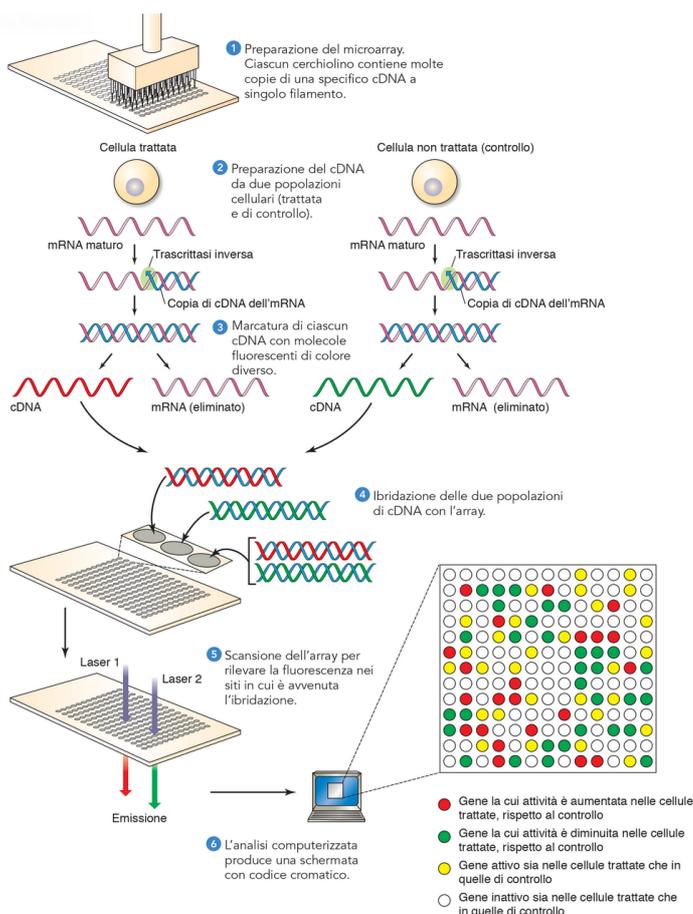
segmenti di DNA, mediante un meccanismo chiamato *ricombinazione omologa*. In questo modo, l'allele normale nel cromosoma di topo è sostituito con quello non funzionale introdotto, producendo un knockout genico.

In pratica, i ricercatori introducono un gene inattivato in cellule ES di topo ed iniettano le cellule geneticamente modificate in embrioni precoci di topo che vengono poi fatti crescere fino al raggiungimento della maturità. Tuttavia, poiché molti geni sono essenziali per la sopravvivenza degli animali, i ricercatori sono stati obbligati a modificare la tecnica del knockout per ottenere ceppi di topi nei quali un gene specifico è inattivato selettivamente solo in un determinato tipo cellulare. Oggigiorno, sono disponibili migliaia di ceppi diversi di topi knockout prodotti in diversi laboratori a livello mondiale ed ognuno di essi mostra il proprio specifico fenotipo; il loro numero è in continuo aumento.

La sostituzione mirata dei geni nel topo sta fornendo risposte a problemi di biologia di base, connessi allo sviluppo embrionale, allo sviluppo del sistema nervoso e al funzionamento del sistema immunitario. La stessa tecnica apre ampie prospettive di conoscenza su diverse malattie dell'uomo, la maggior parte delle quali ha una base genetica. La sostituzione mirata dei geni può essere usata per lo studio dei tumori, delle malattie cardiovascolari, dell'anemia falciforme, di malattie respiratorie quali la fibrosi cistica, e di altre patologie.

### Lo screening per mutagenesi rivela i geni implicati in un particolare fenotipo

Attualmente sono in corso numerosi progetti di screening per mutagenesi su larga scala nei topi e in altri organismi. Lo screening per mutagenesi consiste nel trattare i topi maschi con *mutageni* chimici, che causano la comparsa di mutazioni nel DNA. Dopodiché, si fanno accoppiare tali maschi con femmine normali e si analizza la progenie per l'eventuale presenza di fenotipi anomali. Diversamente dal gene targeting, la mutagenesi non inattiva completamente un gene, ma determina l'insorgenza di piccole mutazioni casuali, che risultano in una variazione nelle proprietà delle proteine codificate dal DNA. Lo screening per mutagenesi è una metodica effettuata su larga scala; per esempio, un progetto di screening in Germania ha permesso di esaminare circa 28.000 topi mutanti differenti per la ricerca di varianti fenotipiche associate.



### METODO DI RICERCA

Il DNA microarray è una metodica che rivela i livelli di espressione genica di centinaia o addirittura migliaia di geni specifici in diversi tipi di cellule. Questa tecnica aiuta gli scienziati a comprendere quali geni sono attivi (o inattivi) ad esempio in cellule trattate con un farmaco specifico rispetto a cellule non trattate, di controllo. *Perché si usa?*

FIGURA 15-12  
Un'analisi di DNA microarray

### I microarray di DNA sono uno strumento potente per lo studio dell'espressione genica

I DNA microarray sono una metodica di studio dei quadri di espressione genica nei diversi animali. Ogni punto (spot) in un microarray di DNA è costituito da una sonda a singolo filamento posizionata su un supporto di vetro o chip (FIG. 15-12). Inizialmente un robot meccanico prepara il microarray, ponendo in ogni punto della griglia microgocce contenenti da migliaia a milioni di copie di uno specifico filamento di DNA complementare (cDNA). Ogni punto (spot), noto come *microdot*, contiene diverse copie di una specifica molecola di cDNA a singolo filamento. Le molecole di cDNA a singolo filamento vengono sintetizzate a partire da

uno specifico mRNA utilizzando la trascrittasi inversa, ed in seguito amplificate mediante la reazione a catena della polimerasi (PCR).

I ricercatori quindi isolano le molecole di mRNA mature da due popolazioni cellulari; per esempio, cellule epatiche trattate con un nuovo farmaco e cellule epatiche di controllo non trattate. (Si utilizzano solitamente cellule epatiche in quanto il fegato produce numerosi enzimi che metabolizzano le molecole

estraneie, xenobiotici, inclusi i farmaci. I farmaci che il fegato non riesce a metabolizzare o che metabolizza debolmente possono risultare troppo tossici per essere utilizzati).

Le molecole di mRNA isolate vengono utilizzate per sintetizzare molecole di cDNA per ciascuna popolazione cellulare, le quali vengono successivamente marcate con molecole fluorescenti di diversi colori. Per esempio, le molecole di cDNA derivanti dalle cellule trattate potrebbero essere marcate con un colorante rosso e quelle derivanti dalle cellule non trattate con un colorante verde. Le due popolazioni di cDNA vengono aggiunte all'array; alcune ibridano (per appaiamento complementare delle basi) con il cDNA presente sull'array.

Dopo aver effettuato un lavaggio dell'array per rimuovere tutti i cDNA che non hanno ibridato, un raggio laser fa una scansione per identificare i segnali fluorescenti rossi e verdi nei punti in cui è avvenuta l'ibridazione. L'analisi computerizzata del rapporto tra i segnali fluorescenti rosso e verde in ciascun microdot dell'array produce una schermata con un codice cromatico che può essere ulteriormente analizzata. Per esempio, un ricercatore medico può confrontare il pattern complessivo di attività genica risultante dall'uso di un farmaco in via di sperimentazione, con quello di cellule esposte alla somministrazione di farmaci o tossine conosciuti. Se l'attività genica delle cellule trattate con il farmaco sperimentale è paragonabile a quella delle cellule trattate con una tossina che danneggia il fegato, il farmaco non potrà essere avviato a test clinici.

I microarray di cDNA consentono ai ricercatori di mettere a confronto l'attività di migliaia di geni presenti in cellule normali ed in altre malate, prelevate da campioni di tessuto. Dal momento che il cancro ed altre patologie mostrano quadri di espressione genica alterati, i microarray di DNA possono identificare i geni o le proteine da essi codificate che potranno essere utilizzati come bersaglio di una terapia farmacologica. Presentiamo un esempio applicativo. Nel 2002, i ricercatori medici hanno identificato 17 geni che risultano attivi in diversi sottotipi di linfoma delle cellule B. Con l'utilizzo del DNA microarray, essi hanno determinato quale combinazione dei 17 geni risulta attiva in ciascun sottotipo di questa forma di cancro. Avendo la possibilità di sapere da quale sottotipo di linfoma è affetto ogni singolo paziente, i medici possono scegliere il trattamento che molto probabilmente sarà il più efficace per quel paziente. L'analisi dei quadri di attività genica con i microarray di DNA permette ai medici anche di prevedere quali pazienti, in seguito alla terapia, probabilmente guariranno completamente dal cancro e quali invece probabilmente andranno incontro ad una ricaduta.

### **Il Progetto Genoma Umano è stato uno stimolo per lo studio delle sequenze genomiche di altre specie**

Allo scopo di facilitare l'analisi del genoma umano, studi di genomica comparativa basati sul sequenziamento e sulla mappatura genica sono stati condotti simultaneamente sui genomi del topo e del ratto. Topi e ratti sono stati scelti per il sequenziamento del DNA in quanto, essendo stati studiati per quasi un secolo, si conosceva molto della loro biologia. Questi organismi sono sufficientemente diversi dall'uomo da poter affermare che qualunque sequenza risulti conservata (cioè identica) tra roditori e uomo è presumibilmente importante dal punto di vista funzionale.

Inoltre, il topo è sufficientemente simile all'uomo da condividere con esso numerose caratteristiche fisiologiche, incluse alcune malattie. Per dimostrare la similarità tra il genoma murino e quello umano, nel 2002 un consorzio di scienziati ha pubblicato uno studio in cui il cromosoma 16 del topo è stato confrontato con il genoma umano. Soltanto 14 dei 731 geni noti presenti sul cromosoma 16 del topo non hanno un corrispettivo umano; i rimanenti 717 geni sono presenti, in una forma o in un'altra, nel genoma umano.

La comparazione in specie diverse delle sequenze geniche e della loro organizzazione nei cromosomi rappresenta uno strumento molto importante per l'identificazione degli elementi fondamentali per la loro funzione. Se la funzione di un gene umano non è nota, indicazioni sul suo possibile ruolo possono essere spesso derivate dallo studio di geni equivalenti in specie diverse.

Sono stati sequenziati anche i genomi di altri organismi modello appartenenti ai vertebrati, come il pesce palla ed il pesce zebra (zebrafish). Il pesce palla ha il più piccolo genoma conosciuto tra i vertebrati. Confrontando il genoma umano con quello del pesce palla, sono state identificate sequenze comuni che sono rimaste invariate per diverse centinaia di milioni di anni. Essendo sopravvissute alle forze selettive dell'evoluzione, è stato ipotizzato che tali sequenze possano appartenere a geni o ad elementi di regolazione importanti per lo sviluppo e essenziali in tutti i vertebrati. L'analisi del genoma di organismi importanti dal punto di vista commerciale, come il salmone, il pollo, il maiale ed il riso, rappresenta un'altra priorità. Sono state pubblicate le sequenze genomiche del riso, del parassita che provoca la malaria e di quello che provoca la malattia del sonno africana.

Uno degli sforzi più significativi in una prospettiva evuzionistica si focalizza sul sequenziamento del genoma di uno o più primati non umani, come lo scimpanzé (i cui risultati sono stati pubblicati nel 2005). Il confronto delle sequenze del DNA dell'uomo e dei suoi più stretti "parenti" viventi sta aiutando a comprendere i cambiamenti genetici avvenuti nel corso dell'evoluzione dell'uomo, compresi quelli avvenuti in geni responsabili delle capacità mentali e linguistiche.

### **La bioinformatica, la farmacogenetica e la proteomica sono discipline scientifiche emergenti**

Abbiamo già sottolineato che la valutazione della gran quantità di dati genomici attualmente disponibile richiede l'uso di potenti computer. La disciplina nota come bioinformatica, o *biocomputing*, include l'immagazzinamento, il recupero ed il confronto di sequenze nucleotidiche o aminoacidiche nell'ambito di una data specie o tra specie differenti. La bioinformatica fa uso di potenti computer e sofisticati software per la gestione e l'analisi di enormi quantità di dati ottenuti con il sequenziamento ed altre tecnologie. Per esempio, quando i ricercatori determinano nuove sequenze di DNA, le analizzano mediante programmi informatici automatizzati alla ricerca di regioni nucleotidiche specifiche presenti nei geni. Mediante il confronto delle sequenze di DNA di diversi organismi presenti nelle banche dati, la bioinformatica ha già dato risultati nell'identificazione di geni e delle loro funzioni e nella comprensione delle relazioni evolutive.

La nuova scienza della medicina basata sui geni, nota come farmacogenetica, cerca di comprendere come la variabilità genetica individuale dei pazienti influenzi l'azione terapeutica dei farmaci. L'obiettivo della farmacogenetica è quindi quello di progettare terapie individuali sulla base dei singoli profili genetici. Attualmente, non è possibile sapere in anticipo se un determinato farmaco può apportare benefici o causare gravi effetti collaterali ad un paziente. I geni di un individuo, in particolare quelli che codificano per enzimi che metabolizzano i farmaci, determinano la risposta individuale ad un certo farmaco. La farmacogenetica tiene conto delle sottili differenze genetiche esistenti tra gli individui. Tra 5-10 anni, i pazienti potranno effettuare degli screening genetici di routine prima che il medico prescriva loro un farmaco.

La farmacogenetica, come altri campi della genetica umana, pone importanti questioni etiche. I test genetici, che saranno parte integrante della farmacogenetica, sollevano problemi di privacy, di possibile non corretta interpretazione dei risultati e di discriminazione genetica. Considereremo tali questioni nel Capitolo 16.

I test genetici individualizzati potrebbero creare nelle persone inutili preoccupazioni rispetto ad una certa malattia genetica di cui probabilmente non svilupperanno mai i sintomi. Quasi tutte le patologie più comuni sono il risultato di complesse interazioni tra geni multipli e fattori non genetici o ambientali. (Ricordiamo dal Capitolo 11 che l'ambiente rappresenta un fattore importante per la sua influenza sull'espressione genica). Nell'uomo, i fattori ambientali che contribuiscono ad un buono stato di salute includono una dieta corretta, un'attività fisica adeguata e il non fumare.

Lo studio di tutte le proteine espresse in una cellula in un determinato momento è definito proteomica. I ricercatori hanno identificato tutte le proteine sintetizzate da un certo tipo cellulare, ma il processo è molto più complicato del sequenziamento del genoma umano. Innanzitutto, alcuni geni codificano per una serie di proteine differenti (vedi Fig. 14-14 per un esempio di splicing alternativo). Inoltre, tutte le cellule somatiche del corpo umano hanno essenzialmente lo stesso genoma, ma le cellule di tessuti diversi presentano notevoli variazioni nel tipo di proteine che producono. I quadri di espressione proteica variano non solo tra tessuti diversi, ma anche tra i diversi stadi di sviluppo di una singola cellula.

I ricercatori si sono posti l'obiettivo di comprendere il ruolo di ciascuna proteina in una cellula, il modo in cui le proteine interagiscono tra loro, la loro struttura tridimensionale, come le proteine sono distribuite spazialmente nel citosol e negli organelli, nonché i profili proteici presenti in cellule malate. Gli avanzamenti delle conoscenze biologiche sono promettenti anche per il progresso in campo medico. Infatti, conoscere la forma di una proteina associata ad un certo tipo di cancro o ad un'altra patologia significa poter sviluppare un farmaco che si leghi al sito attivo della proteina inibendone l'attività. Attualmente, l'industria farmaceutica ha a disposizione farmaci diretti contro circa 500 proteine cellulari; si stima che la proteomica potrà far salire questo numero fino a 10.000-20.000.

### **Verifica**

- Fate una distinzione tra genomica strutturale, funzionale e comparativa.
- Che cos'è un microarray di DNA?
- Che cos'è la farmacogenetica? E la proteomica?

---

## 15.4 LE APPLICAZIONI DELLE TECNOLOGIE DEL DNA

### OBIETTIVO DI APPRENDIMENTO

---

10. Descrivere almeno un'importante applicazione della tecnologia del DNA ricombinante in ciascuno dei seguenti campi: medicina, fingerprinting del DNA, organismi transgenici.

La tecnologia del DNA ricombinante non ha fornito solo una nuova serie di strumenti per rispondere a domande biologiche fondamentali sui meccanismi cellulari, ma ha permesso anche un approccio diverso a problemi tecnologici in molti altri campi. In alcuni casi, la produzione di proteine e di organismi geneticamente modificati ha iniziato ad avere un certo impatto sulla nostra vita; basti pensare all'industria farmaceutica ed alla medicina.

#### **La tecnologia del DNA ha rivoluzionato la medicina**

In un numero sempre maggiore di casi, i medici effettuano test genetici per determinare se un individuo presenta una particolare mutazione genetica associata a patologie come la malattia di Huntington, l'emofilia, la fibrosi cistica, la malattia di Tay-Sachs, il carcinoma della mammella e l'anemia falciforme. La terapia genica, ovvero l'uso di un DNA specifico per il trattamento di una malattia genetica mediante la correzione del problema genetico, rappresenta un'ulteriore applicazione della tecnologia del DNA che è attualmente ancora in fase iniziale. Poiché i test genetici e la terapia genica riguardano quasi esclusivamente gli esseri umani, queste applicazioni della tecnologia del DNA saranno discusse nel Capitolo 16. In questo paragrafo, focalizzeremo la nostra discussione sull'utilizzo della tecnologia del DNA per la produzione di prodotti farmaceutici.

L'**insulina** umana prodotta da *E. coli* è stata la prima, fra le proteine geneticamente ingegnerizzate, ad essere approvata per l'uso umano. Prima che si ottenessero batteri modificati per produrre l'ormone umano, l'insulina derivava esclusivamente da animali. Molti individui diabetici manifestarono allergie all'insulina di origine animale, poiché questa differisce lievemente nella sequenza aminoacidica rispetto a quella umana; la possibilità, dunque, di ottenere la proteina mediante il DNA ricombinante ha costituito un reale beneficio per i diabetici insulino-dipendenti.

L'**ormone della crescita (GH)** umano, modificato geneticamente, permette di compensare deficienze nell'accrescimento dei bambini, in particolare il nanismo ipofisario (vedi Capitolo 49). In passato, tale ormone si otteneva solo dai cadaveri; non se ne potevano avere che piccole quantità ed inoltre alcune prove suggerivano che certe preparazioni erano contaminate da agenti infettivi simili a quelli che causano l'encefalopatia spongiforme bovina, anche detto morbo della mucca pazza (discusso nel Capitolo 24).

La lista delle sostanze che possono essere prodotte mediante l'ingegneria genetica è in costante aumento. Per esempio, l'**attivatore tissutale del plasminogeno (TPA)**, una proteina che previene o dissolve i coaguli di sangue, è utilizzato per il trattamento delle malattie cardiovascolari. Se somministrato poco dopo un infarto, il TPA riduce il rischio di un infarto successivo. Il **fattore di crescita tissutale-beta (TGF- $\beta$ )** promuove l'accrescimento dei vasi sanguigni e della pelle ed è utilizzato per la rimarginazione delle ferite e delle ustioni. Il TGF- $\beta$  viene anche utilizzato nell'ingegneria tissutale, una tecnologia in via di sviluppo mediante la quale si cercherà di far fronte alle pressanti richieste di tessuti umani ed eventualmente di organi per i trapianti, che si potranno sviluppare da colture cellulari.

La U.S. Food and Drug Administration (FDA) ha approvato i trapianti di pelle ingegnerizzata nei casi di ustioni gravi ed estese, mentre la cartilagine ingegnerizzata è utilizzata nella ricostruzione delle articolazioni. Sono in corso ricerche sull'utilizzo di cellule staminali embrionali per la ricostruzione cardiaca successivamente ad infarto del miocardio.

L'emofilia A viene trattata con il **fattore VIII della coagulazione** del sangue umano. Prima dello sviluppo delle tecniche del DNA ricombinante, il fattore VIII era ottenibile solo dal sangue umano o animale, e ciò presentava un rischio di trasmissione di agenti infettivi, come l'HIV. Infine, la **Dornasi Alfa (DNasi)** aumenta la funzionalità respiratoria e lo stato generale di benessere nei pazienti affetti da fibrosi cistica (facilita la fluidificazione del muco compatto).

La tecnologia del DNA ricombinante è usata sempre più di frequente per produrre vaccini che conferiscono un'immunità efficace e sicura contro le malattie infettive umane ed animali. Un modo per sviluppare un vaccino ricombinante consiste nel clonare un gene per una proteina di superficie prodotta dal patogeno (l'agente che causa la malattia) e nell'introdurre questo gene in un vettore non patogeno. Quando il vaccino viene somministrato ad un uomo o ad un animale, esso stimola una risposta immunitaria contro la proteina

di superficie; di conseguenza, quando l'organismo si troverà a contatto con il patogeno che porta quella specifica proteina di superficie, il sistema immunitario lo riconoscerà e lo indirizzerà alla distruzione. Esempi di vaccini ricombinanti antivirali umani sono quelli per l'influenza A, l'epatite B e la poliomielite. Si stanno sviluppando vaccini ricombinanti anche contro alcune malattie batteriche e tumori umani. Per esempio, la Food and Drug Administration ha approvato nel 2006 un vaccino ricombinante contro diversi tipi di papillomavirus umano (HPV). Il vaccino, somministrato a giovani ragazze di età compresa tra 9 e 26 anni, è in grado di proteggere da circa il 70% delle forme di carcinoma della cervice uterina causate da HPV.

### Il DNA fingerprinting presenta numerose applicazioni

L'analisi di frammenti del DNA estratti da un individuo, che sono caratteristici di quell'individuo, è nota come DNA fingerprinting (impronte digitali molecolari o tipizzazione del DNA). Il DNA fingerprinting presenta svariate applicazioni nell'uomo ed in altri organismi, come nei seguenti esempi:

1. L'analisi delle prove trovate sulla scena di un crimine (analisi forense) ( FIG. 15-13 )
2. L'identificazione delle vittime di una strage
3. L'attribuzione di relazioni di parentela nei cani per la registrazione dei pedigree
4. L'identificazione di linee cellulari cancerose nell'uomo
5. Lo studio delle specie a rischio di estinzione nella biologia della conservazione
6. L'individuazione di cibi contaminati
7. Gli studi genealogici delle popolazioni umane
8. La risoluzione di dispute nelle attribuzioni di parentela
9. Lo scagionamento di individui erroneamente inquisiti per crimini.

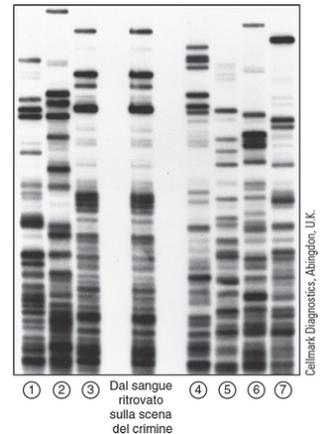


FIGURA 15-13 *Fingerprinting del DNA*

Questi fingerprint di DNA mostrano il DNA derivante dalla scena di un crimine ( al centro ) insieme ai profili del DNA di sette individui sospettati. Riuscite ad individuare il profilo di DNA del sospettato che corrisponde al campione di sangue ritrovato sulla scena del crimine?

Storicamente il DNA fingerprinting era basato sulla tecnica RFLP (discussa in precedenza). Oggi molte tecniche di fingerprinting si basano sull'individuazione di marcatori molecolari mediante amplificazione PCR, digestione con enzimi di restrizione ed elettroforesi su gel. I marcatori molecolari più utili sono quelli che presentano un alto grado di polimorfismo all'interno di una popolazione umana (si ricordi la discussione sul **polimorfismo**). Le brevi ripetizioni in tandem ( Short Tandem Repeats, STR ) sono marcatori molecolari costituiti da brevi sequenze di DNA ripetute (fino a 200 nucleotidi con un semplice schema ripetuto, ad esempio GTGTGTGTGT oppure CAGCAGCAGCAG). Le STR sono altamente polimorfiche poiché variano in lunghezza da individuo a individuo; questa caratteristica le rende utili per l'identificazione degli individui con un alto grado di certezza.

Se si confronta un numero sufficiente di marcatori, la probabilità che due persone prese a caso da una popolazione abbiano profili del DNA identici è di 1 su diversi miliardi. L'FBI utilizza una serie di STR derivante da 13 marcatori differenti per stabilire il profilo unico del DNA di un individuo, che lo distingue da tutti gli altri individui degli Stati Uniti, tranne nel caso di gemelli identici. Ricordiamo che il DNA è presente anche nei mitocondri delle cellule. Mentre il DNA nucleare è presente in doppia copia in ogni cellula (coppie di cromosomi omologhi), in una singola cellula sono presenti circa 100.000 copie di DNA mitocondriale. Per tale ragione, il DNA mitocondriale rappresenta la molecola di elezione per la tipizzazione del DNA in quei casi in cui i campioni biologici siano stati danneggiati (ad esempio, nell'identificazione di resti umani riesumati).

La tipizzazione del DNA ha rivoluzionato gli aspetti esecutivi della legge. Nel 1990, l'FBI ha stabilito il "Combined DNA Index System" (CODIS), che consiste in una banca dati di DNA provenienti da tutti i 50 Stati. Attualmente, il profilo del DNA di un sospettato non identificato può essere confrontato con i profili del DNA di milioni di pregiudicati presenti in banca dati; questa operazione risulta spesso nell'identificazione del sospettato. Il DNA del sospettato non identificato può derivare da sangue, sperma, ossa, denti, capelli, saliva, urine o feci rinvenuti sulla scena del delitto. Minuscole quantità di DNA umano sono state estratte addirittura da cicche di sigarette, buste da lettera chiuse con la saliva o francobolli, forfora, impronte digitali, lame di rasoio, gomme da masticare, orologi da polso, cerume delle orecchie, residui prelevati sotto le unghie e spazzolini da denti.

Se applicata correttamente, la tipizzazione del DNA ha la capacità di identificare il colpevole e di scagionare un innocente. Infatti, centinaia di individui inizialmente condannati hanno vinto nuovi processi e sono stati rilasciati sulla base dell'applicazione della prova del DNA a reperti provenienti dalla scena del crimine. Il

principale limite in questo approccio è da porre in relazione al fatto che i campioni di DNA sono generalmente piccoli e possono essere degradati. Ovviamente, bisogna prestare anche molta attenzione a non contaminare i prelievi. Ciò è un aspetto cruciale se si utilizza la tecnica della PCR per amplificare il DNA partendo da minime quantità di campione.

### **Gli organismi transgenici hanno DNA estraneo incorporato nelle loro cellule**

Piante ed animali che abbiano incorporato geni estranei si dicono organismi transgenici. Si sono affermati diversi metodi di inserimento di geni estranei in cellule vegetali od animali. I virus sono spesso usati come vettori, ma si può effettuare anche un'iniezione diretta del DNA nelle cellule.



FIGURA 15-14 *Un topo transgenico*

Il topo sulla destra è normale, mentre quello sulla sinistra è transgenico ed esprime l'ormone della crescita di ratto.

### **Gli animali transgenici sono utili alla ricerca**

Gli animali transgenici si ottengono iniettando il DNA di un particolare gene all'interno del nucleo di una cellula uovo fecondata o di una cellula staminale embrionale.

Successivamente, le uova vengono impiantate nell'utero di una femmina perché si sviluppino normalmente. Alternativamente, la cellula staminale embrionale (totipotente) modificata geneticamente è iniettata in una *blastocisti*, uno stadio precoce dello sviluppo embrionale, che viene successivamente impiantata in una madre adottiva.

Iniettare il DNA nelle cellule non è l'unico modo per ottenere animali transgenici. I ricercatori possono utilizzare i virus come vettori di DNA ricombinanti. I virus a RNA, chiamati retrovirus, producono copie di DNA mediante trascrizione inversa. Talvolta, il DNA si integra nel cromosoma dell'ospite e viene quindi replicato insieme al DNA dell'ospite.

Gli animali transgenici hanno dimostrato di avere numerose utili applicazioni in campo scientifico, che includono lo studio della regolazione dell'espressione genica, della funzione del sistema immunitario, delle malattie genetiche e virali, e dei geni responsabili dello sviluppo del cancro. Il topo da laboratorio è diventato un organismo modello particolarmente importante per questo tipo di studi.

In uno studio pionieristico di questo tipo, condotto dal genetista dell'Università della Pennsylvania Ralph L. Brinster nel 1983, sono stati costruiti topi transgenici che portavano un gene per l'ormone della crescita di ratto (vedi Fig. 17-18). Brinster e i suoi collaboratori volevano capire quali tipi di controllo permettessero a certi geni di essere espressi in alcuni tessuti, ma non in altri. Normalmente, un topo produce nell'ipofisi piccole quantità dell'ormone della crescita, ma i ricercatori pensavano che anche altri tessuti avrebbero potuto produrre lo stesso ormone. Come prima cosa, il gene per l'ormone della crescita fu isolato da una libreria genomica di ratto ed associato alla regione promotrice di un gene di topo che normalmente codifica la metallothioneina, una proteina attiva nel fegato la cui sintesi è stimolata dalla presenza di concentrazioni tossiche di metalli pesanti, come lo zinco. Le sequenze regolative della metallothioneina furono utilizzate come interruttore per accendere o spegnere a piacimento la produzione dell'ormone della crescita di ratto. Dopo aver iniettato il gene ingegnerizzato con una micropipetta nelle cellule embrionali di topo, gli embrioni furono impiantati nell'utero di un topo per l'ulteriore sviluppo.

FIGURA 15-15 *Mucche transgeniche "pharm"*

Queste mucche contengono il gene umano che codifica per la lattoferrina, una proteina che si trova nel latte materno umano ed in alcune secrezioni, come le lacrime, la saliva, la bile ed i succhi pancreatici. La lattoferrina rappresenta una delle linee di difesa del sistema immunitario contro gli organismi patogeni. Queste mucche transgeniche secernono la lattoferrina umana nel proprio latte.



Data la difficoltà di manipolare gli embrioni senza danneggiarli, l'impianto ebbe successo solo in una piccola frazione di animali. Esposti ad una piccola quantità di zinco, i topi transgenici produssero grandi quantità di ormone della crescita, perché il fegato è un organo molto più grande dell'ipofisi. I topi crebbero velocemente, ed uno che si era sviluppato da un embrione che aveva ricevuto due copie del gene raggiunse una taglia doppia del normale (FIG. 15-14). Come atteso, questi topi sono in grado di trasmettere alla progenie la loro aumentata capacità di crescita.

### **Gli animali transgenici possono produrre proteine geneticamente modificate**

Alcuni ceppi di animali transgenici sono stati generati per produrre latte contenente proteine estranee di importanza terapeutica o di alto valore commerciale. Per esempio, il gene per l'attivatore tissutale del

plasminogeno (TPA) umano è stato introdotto nelle pecore. La produzione di bestiame transgenico (maiali, pecore, mucche e capre) che secerne proteine estranee nel latte è nota comunemente come “pharming”, una combinazione dei termini “pharmaceutical” (farmaceutico) e “farming” (agricoltura) ( FIG. 15-15 ). Nel pharming, i geni ricombinanti sono fusi con sequenze regolatrici di geni codificanti proteine del latte e perciò espresse solo nel tessuto mammario durante il processo di secrezione. Il vantaggio di ottenere le proteine dal latte è che questo può essere prodotto in grandi quantità e può essere raccolto semplicemente mungendo gli animali. La proteina di interesse viene poi purificata dal latte. Poiché l'introduzione dei geni ricombinanti non è dannosa per l'animale e i loro discendenti producono solitamente essi stessi la proteina ricombinante, sono stati creati e stabilizzati veri e propri ceppi transgenici.

### Le piante transgeniche stanno acquisendo sempre maggiore importanza in agricoltura

Le piante vengono riprodotte per selezione da migliaia di anni. Il successo di queste operazioni dipende dalla presenza di caratteri affermatasi nella varietà di pianta selezionata, o in piante selvatiche o domestiche strettamente correlate a questa, le cui caratteristiche possono essere trasmesse attraverso incroci reciproci. Le varietà primitive di piante coltivate, o le specie più strettamente correlate a queste, presentano spesso caratteri utili, come la resistenza a determinate malattie, che, se introdotti nelle varietà più utilizzate in agricoltura, possono portare vantaggi alle necessità dell'uomo. Se geni vengono introdotti nelle piante appartenenti a ceppi o specie che di solito non si incrociano, le possibilità di miglioramento delle specie aumentano.



(a) Si noti la bassa resa produttiva di piante di granturco normali utilizzate come controlli.



(b) Piante di granturco modificate geneticamente sopportano meglio la siccità rispetto a quelle normali.

Il sistema vettore più ampiamente usato per introdurre geni ricombinanti all'interno di linee cellulari vegetali è il batterio *Agrobacterium tumefaciens*, che produce normalmente tumori nelle piante introducendo un plasmide, denominato *plasmide Ti* nelle cellule ospiti; Ti è l'acronimo di “tumor inducing”. Il plasmide provoca una crescita anomala, in quanto costringe le cellule vegetali a produrre livelli elevati di un ormone della crescita, chiamato citochinina (vedi Capitolo 38).

È possibile “disarmare” il plasmide Ti in modo che non induca la formazione tumorale, così da utilizzarlo come vettore per introdurre geni nelle cellule delle piante. Le cellule nelle quali viene introdotto il plasmide alterato sono essenzialmente normali, eccetto che per i geni che sono stati introdotti. I geni introdotti nel genoma della pianta possono in questo modo essere trasmessi alla generazione successiva per via sessuata, attraverso cioè i semi, oppure per via asessuata. Sfortunatamente, non tutte le piante incorporano facilmente il DNA e ciò è vero in particolare per i cereali, che sono la principale risorsa di nutrimento per l'uomo. Un approccio utile nel tentativo di risolvere il problema è stato lo sviluppo di una tecnica denominata “shotgun” genetico, letteralmente “colpo di fucile”.

### FIGURA 15-16

*Prove sperimentali su granturco transgenico resistente alla siccità*

Microscopici frammenti di (oro o di tungsten) vengono ricoperti con DNA e quindi sparati all'interno delle cellule delle piante, oltrepassando le pareti cellulari. Alcune di queste cellule trattengono il DNA e quindi vengono trasformate da esso e possono così essere coltivate e usate per rigenerare un'intera pianta (vedi Fig. 17-2 ). Questo approccio, ad esempio, è stato usato con successo per trasferire un gene per la resistenza ad una malattia batterica dal riso selvatico a quello coltivato.

Un'ulteriore complicazione per l'ingegneria genetica in campo botanico è che circa 120 geni delle piante si trovano nel DNA dei cloroplasti; gli altri circa 3000 geni necessari alla vita della pianta si trovano nel nucleo). I cloroplasti sono essenziali per la fotosintesi, che è alla base della produttività delle piante. Dal momento che gran parte del potenziale agricolo fa affidamento sull'incremento della produttività fotosintetica, sarebbe utile sviluppare metodologie per modificare la parte di DNA delle piante che risiede all'interno dei cloroplasti. Attualmente, dozzine di laboratori stanno studiando metodi per ingegnerizzare i cloroplasti, anche se si sta procedendo molto lentamente. Nel 2001, alcuni fisiologi vegetali australiani hanno riportato di aver modificato la rubisco, l'enzima chiave per la fissazione fotosintetica del carbonio (vedi Capitolo 9 ), alterando uno dei geni presenti nel DNA del cloroplasto.

Gli Stati Uniti sono i maggiori produttori mondiali di piante da raccolto transgeniche, anche conosciute come colture geneticamente modificate ( GM ). Nel 2007 gli agricoltori americani hanno coltivato 57,7 milioni di ettari (143 milioni di acri) di colture GM. Nello specifico, il 51% dei raccolti di soia, il 31% di quelli di granturco, il 13% di quelli di cotone ed il 5% di quelli di canola sono raccolti GM.

Alcune applicazioni delle piante transgeniche I genetisti agrari stanno sviluppando piante GM che sono resistenti ad insetti dannosi, malattie virali e fungine, siccità, caldo, freddo, erbicidi e suoli salati o acidi. Ad esempio, alberi di papaya geneticamente modificati e resistenti a diverse forme di virus, vengono coltivati da oltre 10 anni alle Isole Hawaii. Una varietà di granturco resistente alla siccità è attualmente in corso di sperimentazione con prove sul campo ( FIG. 15-16 ).

Il granturco è stato inoltre modificato geneticamente mediante l'introduzione del gene batterico Bt, che codifica per una proteina con proprietà insetticide (Bt è una sigla che indica il nome scientifico del batterio, *Bacillus thuringensis*). Il granturco *Bt*, introdotto negli Stati Uniti nel 1996, ha eliminato la necessità di spruzzare periodicamente insetticidi chimici per il controllo della piralide del mais, l'insetto infestante del mais più dannoso negli Stati Uniti e in Canada.

La tecnologia del DNA ha anche la potenzialità di sviluppare piante da raccolto con maggiori qualità nutrizionali. Per esempio, nel 1990 alcuni genetisti hanno ingegnerizzato il riso in modo tale che producesse una gran quantità  $\beta$ -carotene, che viene utilizzato nel corpo umano per la sintesi della vitamina A. Nei paesi in via di sviluppo, la carenza di vitamina A è una delle maggiori cause di cecità nei bambini. La carenza di vitamina A rende i bambini anche più suscettibili al morbillo e ad altre malattie infettive. Dal momento che il riso rappresenta l'alimento base nella dieta di molti paesi afflitti dalla carenza di vitamina A, un uso diffuso del riso GM, ricco  $\beta$ -carotene, aiuterebbe a prevenire la carenza di vitamina A in molti bambini a livello mondiale.

Come alcuni animali transgenici, anche le piante possono essere potenzialmente usate per operazioni di "pharming" ovvero per produrre grosse quantità di proteine utili in medicina, come per esempio gli anticorpi contro il virus dell'herpes, oppure vaccini specifici contro il linfoma (una forma tumorale). Alcune persone sono preoccupate riguardo agli effetti sulla salute dei cibi derivati dalle piante GM e pensano che questi cibi dovrebbero essere vietati. Per esempio, un timore diffuso è che alcuni consumatori possano sviluppare allergie alimentari. Gli scienziati riconoscono anche questo problema ed effettuano delle analisi di routine sulle eventuali proprietà allergizzanti delle nuove piante da raccolto GM. Esiste anche un forte dibattito sulla necessità di etichettare in modo specifico i cibi GM. La FDA e la maggior parte degli scienziati ritengono che tale operazione sarebbe controproducente, in quanto non farebbe altro che aumentare il timore delle persone rispetto ad una tecnologia che è sicura come i metodi tradizionali di allevamento. Nel 1996, la Corte d'Appello degli Stati Uniti ha sostenuto la posizione della FDA secondo la quale non dovrebbe essere richiesta un'etichettatura specifica per i cibi GM.

### Verifica

- Perché la produzione dell'insulina umana mediante i metodi del DNA ricombinante ha apportato notevoli vantaggi in campo medico per i diabetici?
- Che cosa sono le brevi ripetizioni in tandem (STR) e perché sono così utili per la tipizzazione del DNA?
- Perché il gene targeting e lo screening per mutagenesi nei topi presentano dei potenziali benefici per l'uomo?

---

## 15.5 LA TECNOLOGIA DEL DNA ha sollevato preoccupazioni relative alla sicurezza

---

### OBIETTIVO DI APPRENDIMENTO

---

11. Citare almeno due questioni relative alla sicurezza della tecnologia del DNA ricombinante e spiegare in che modo sono state affrontate.

Negli anni '70, quando fu introdotta la tecnologia del DNA ricombinante, oltre ai benefici che questa innovazione avrebbe portato, molti scienziati si preoccupavano anche per i possibili abusi che ne sarebbero derivati. Si temeva che potesse essere prodotto un organismo con effetti indesiderabili sull'ambiente. Effettivamente, poteva risultare difficile controllare totalmente nuovi ceppi batterici o altri organismi di cui il mondo non aveva alcuna esperienza, per cui i ricercatori insistettero sulla necessità di rigide procedure per rendere sicura la nuova tecnologia.

Gli esperimenti condotti negli ultimi 35 anni in migliaia di università e laboratori industriali hanno dimostrato che la manipolazione del DNA può essere effettuata in sicurezza. I ceppi di *E. coli* prodotti in laboratorio non possono competere con quelli naturali presenti nell'ambiente e muoiono rapidamente

all'esterno dei laboratori. Gli esperimenti considerati rischiosi vengono effettuati in speciali strutture realizzate per ospitare organismi che possono causare effetti dannosi e per consentire ai ricercatori di lavorare in piena sicurezza. Fino ad ora, non vi è alcuna indicazione che suggerisca che i ricercatori abbiano mai clonato accidentalmente geni pericolosi o abbiano rilasciato organismi pericolosi nell'ambiente. Ciò non significa naturalmente che non siano possibili manipolazioni *intenzionali* di geni pericolosi.

Molte delle norme per l'uso del DNA ricombinante sono state rese meno restrittive da quando è stata garantita la sicurezza sperimentale. Tuttavia, esistono ancora pesanti restrizioni in certe aree di ricerca sul DNA dove viene riconosciuto un pericolo certo e le domande sui possibili effetti sull'ambiente sono ancora senza risposta.

Queste restrizioni sono molto evidenti nella ricerca che si propone di introdurre organismi ricombinanti in natura, come specie di piante i cui semi o pollini potrebbero diffondersi in maniera incontrollata. Numerose ricerche sono ora dedicate alla determinazione degli effetti dell'introduzione di organismi transgenici in un ambiente naturale. Prove condotte con ogni precauzione hanno dimostrato che gli organismi ricombinanti non sono dannosi per l'ambiente solamente perché transgenici.

Tuttavia, è importante stabilire i rischi di ogni nuovo organismo ricombinante. Gli scienziati devono determinare se esso ha caratteristiche tali da poter essere, in certe condizioni, rischioso per l'ambiente. Per esempio, potrebbe avvenire che, se una pianta transgenica è stata modificata geneticamente per resistere agli erbicidi, quel gene venga trasferito attraverso il polline o per qualche altra via alle piante selvatiche correlate, generando dei superinfestanti resistenti agli erbicidi? Nel 2003, gli ecologi dell'Università del Tennessee, a Knoxville, hanno annunciato di aver incrociato le piante transgeniche di rapa dai semi oleosi che contenevano il gene Bt, con le corrispondenti piante selvatiche (erbe infestanti). Gli ibridi risultanti sono stati poi incrociati di nuovo con le piante selvatiche e si è testata la capacità della progenie di competere con altre erbe infestanti in un campo di grano. L'erbaccia transgenica è risultata un competitore debole ed ha sortito minori effetti sulla produzione delle piante di grano rispetto alle corrispondenti erbacce selvatiche in un campo di controllo. Questi risultati, sebbene incoraggianti, devono essere interpretati con attenzione. I ricercatori devono testare indipendentemente ogni tipo di pianta da raccolto transgenica per valutare se si verifica la trasmissione del gene estraneo alle piante selvatiche correlate e, in caso positivo, quali effetti ne risultano.

Altre preoccupazioni sono rivolte alle piante che sono state modificate per produrre pesticidi, come per esempio quelle in grado di produrre la tossina Bt. La presenza di bassi livelli di Bt potrebbe fornire le condizioni ideali per la selezione di individui resistenti all'interno della popolazione di insetti. Infatti, sembra che certi insetti possano sviluppare la resistenza alla tossina Bt prodotta dalle piante transgeniche proprio come sviluppano la resistenza agli insetticidi chimici.

Un'altra preoccupazione riguarda la possibilità che le specie non infestanti siano in pericolo di estinzione. Per esempio, si è data grande importanza alla scoperta che le larve di farfalla monarca, cresciute in laboratorio, sono a rischio se vengono nutrite con polline di piante di grano ingegnerizzate geneticamente per produrre la tossina Bt. Benché studi più recenti suggeriscano che le larve che vivono in un ambiente naturale non consumino sufficiente polline da averne danno, queste preoccupazioni persistono e dovranno essere valutate caso per caso.

Esistono anche preoccupazioni ambientali rispetto agli animali transgenici. Diversi paesi stanno per procedere allo sviluppo di pesci transgenici a crescita rapida, mediante l'inserzione di un gene che codifica per un ormone della crescita. Ad esempio, il salmone atlantico transgenico cresce sei volte più velocemente del salmone non transgenico allevato per il consumo umano. Il pesce transgenico non raggiunge dimensioni superiori rispetto al normale, cresce solo più velocemente. I benefici di tali pesci geneticamente potenziati includono la ridotta pressione di pesca portata sui salmoni selvatici ed il minore inquinamento causato dagli allevatori ittici. Tuttavia, se un pesce transgenico scappasse dall'allevamento, che effetto avrebbe sui corrispondenti pesci selvatici? Per ovviare a questa preoccupazione, tutti i salmoni transgenici sviluppati negli Stati Uniti sono femmine sterili.

In sintesi, la tecnologia del DNA ricombinante applicata in campo agrario offre numerosi benefici, incluse rese nettamente superiori (conferendo resistenza alle malattie), cibi più nutrienti ed un minore utilizzo di pesticidi chimici. Tuttavia, come altri tipi di tecnologie, l'ingegneria genetica comporta alcuni rischi, come quello che piante o animali geneticamente modificati possano trasmettere i loro geni estranei alle corrispondenti popolazioni selvatiche, causando problemi ambientali non prevedibili. La scienza della valutazione del rischio ( risk assessment ), che utilizza metodi statistici per quantificare i rischi in modo da renderli confrontabili, potrà aiutare la società a decidere se ignorare, ridurre, oppure eliminare specifici rischi connessi agli organismi geneticamente modificati.

## Verifica

- Quali potrebbero essere alcuni dei problemi ambientali potenziali derivanti dall'utilizzo di organismi transgenici? Quale tipo di informazione è necessaria affinché la società possa stabilire se le preoccupazioni sono reali?

### SOMMARIO: CONCENTRARI SUGLI OBIETTIVI DI APPRENDIMENTO

#### 15.1

1. Spiegare come un tipico enzima di restrizione taglia le molecole di DNA e fornire alcuni esempi dell'utilizzo di questo tipo di enzimi nella tecnologia del DNA ricombinante.
  - La tecnologia del DNA ricombinante è utilizzata per isolare ed amplificare specifiche sequenze di DNA incorporandole in molecole di DNA vettore . Il DNA ricombinante che ne risulta può essere quindi clonato , cioè propagato e amplificato) in organismi come E. coli .
  - Gli enzimi di restrizione sono usati per tagliare il DNA in specifici frammenti. Ogni tipo di enzima di restrizione riconosce e taglia una sequenza di basi altamente specifica. Molti enzimi di restrizione tagliano le sequenze di DNA in modo da produrre terminazioni a singolo filamento tra loro complementari, dette “estremità appiccicose” o “sticky ends”.
  - Le molecole di DNA ricombinante sono spesso costruite facendo in modo che le estremità complementari di un frammento di DNA e di un vettore (che sono stati entrambi tagliati dallo stesso enzima di restrizione) possano unirsi per complementarità di basi. I filamenti di DNA sono poi legati covalentemente dalla DNA ligasi per formare una molecola di DNA ricombinante stabile.
2. Distinguere fra i concetti di libreria genomica, libreria cromosomica e libreria di DNA complementare (cDNA); spiegare perché si può clonare lo stesso gene eucariotico sia da una libreria genomica che da una di cDNA.
  - Una libreria genomica contiene migliaia di frammenti di DNA che rappresentano l'intero DNA di un organismo, mentre una libreria cromosomica contiene tutti i frammenti di DNA di uno specifico cromosoma. Ogni frammento di DNA di una libreria genomica o cromosomica è conservato in uno specifico ceppo batterico.
  - Una libreria di cDNA viene prodotta utilizzando la trascrittasi inversa per sintetizzare copie di DNA dagli mRNA maturi isolati da cellule eucariotiche. Queste sequenze, note come DNA complementare (cDNA) , vengono poi introdotte in vettori di DNA ricombinante.
  - I geni presenti nelle librerie genomiche e cromosomiche degli eucarioti contengono introni , ovvero regioni che non codificano per proteine. Questi geni possono essere amplificati nei batteri, ma le proteine non vengono espresse correttamente. Poiché gli introni sono stati rimossi dalle molecole di mRNA, i geni eucariotici nelle librerie di cDNA possono a volte essere espressi nei batteri, che ne sintetizzano i prodotti proteici funzionali.
3. Descrivere gli utilizzi di una sonda genetica.
  - Una sequenza radioattiva di DNA può essere usata come sonda genetica per lo screening di migliaia di molecole di DNA ricombinante presenti in cellule batteriche, allo scopo di identificare la colonia che contiene il DNA di interesse.
4. Descrivere il modo in cui la reazione a catena della polimerasi amplifica il DNA in vitro.
  - La reazione a catena della polimerasi (PCR) è una tecnica in vitro molto usata, automatizzata, in cui una particolare sequenza di DNA può essere identificata da primer specifici e poi clonata da una DNA polimerasi termoresistente.
  - Utilizzando la PCR, i ricercatori amplificano ed analizzano minimi quantitativi di DNA prelevati da varie fonti, come la scena di un crimine o un reperto archeologico.

#### 15.2

5. Fare una distinzione tra blotting del DNA, dell'RNA e delle proteine.
  - Nella tecnica del Southern blot , i frammenti di DNA sono separati mediante elettroforesi su gel, denaturati e poi trasferiti su una membrana di nitrocellulosa o di nylon. Una sonda è poi ibridata , mediante appaiamento complementare delle basi, al DNA legato alla membrana e le bande di DNA sono identificate per autoradiografia o per chemiluminescenza.
  - Un Northern blot consiste nel trasferimento su una membrana di molecole di RNA che sono state separate per elettroforesi su gel.
  - Un Western blot consiste nel trasferimento su una membrana di proteine o polipeptidi precedentemente separati per elettroforesi su gel.
6. Descrivere il metodo di terminazione della catena utilizzato nel sequenziamento del DNA.

- Il sequenziamento del DNA può dare informazioni sulla struttura di un gene e sulla probabile sequenza aminoacidica della proteina da esso codificata.
- Il sequenziamento automatizzato del DNA è basato sul metodo di terminazione della catena, che utilizza i dideossinucleotidi marcati con molecole fluorescenti di colore diverso, per bloccare l'allungamento nel corso della replicazione del DNA. I frammenti risultanti vengono separati per elettroforesi su gel e la sequenza nucleotidica viene determinata da un raggio laser.

15.3

7. Descrivere le tre grandi aree di interesse della genomica.
  - La genomica è un campo emergente della biologia che studia l'intera sequenza di DNA del genoma di un organismo. La genomica strutturale si occupa della mappatura e del sequenziamento dei genomi. La genomica funzionale riguarda le funzioni dei geni e delle sequenze non geniche presenti nei genomi. La genomica comparativa consiste nel confronto dei genomi di specie differenti per approfondire la comprensione delle relazioni evolutive.
8. Spiegare come funziona un DNA microarray e fornire un esempio del suo potenziale nell'applicazione in campo medico e nella ricerca.
  - Molti test diagnostici fanno uso dei microarray di DNA, in cui centinaia di molecole di DNA differenti sono poste su un supporto di vetro, o su un chip. I microarray di DNA permettono di confrontare le attività di migliaia di geni in cellule normali e patologiche prelevate da campioni di tessuto. Poiché il cancro ed altre malattie mostrano quadri di espressione genica alterati, i microarray di DNA hanno la potenzialità di identificare i geni che causano le malattie o i loro prodotti proteici, che possono quindi diventare il bersaglio di terapie farmacologiche.
9. Definire la farmacogenetica e la proteomica.
  - La farmacogenetica, la nuova scienza della medicina basata sui geni, tiene conto delle lievi differenze genetiche tra gli individui e personalizza i farmaci in base alla costituzione genetica dei pazienti.
  - La proteomica è lo studio di tutte le proteine codificate dal genoma umano e prodotte nelle cellule e nei tessuti di un individuo. I ricercatori cercano di identificare tutte le proteine prodotte da un determinato tipo cellulare, ma il processo è molto più complicato del sequenziamento del genoma umano.

15.4

10. Descrivere almeno un'importante applicazione della tecnologia del DNA ricombinante in ciascuno dei seguenti campi: medicina e farmacologia, tipizzazione del DNA, organismi transgenici.
  - Alcuni batteri geneticamente modificati sono capaci di produrre svariate proteine umane di notevole importanza, come l'insulina, l'ormone della crescita, l'attivatore tissutale del plasminogeno (TPA), il fattore di crescita tissutale-beta (TGF- $\beta$ ), il fattore VIII della coagulazione del sangue e la Dornasi Alfa (DNasi).
  - Il DNA fingerprinting consiste nell'analisi del DNA di un individuo. Si basa su una varietà di brevi ripetizioni in tandem (STR), marcatori molecolari altamente polimorfici all'interno delle popolazioni umane. La tipizzazione del DNA presenta applicazioni negli aspetti esecutivi della legge, nei processi per le dispute di parentela e nell'individuazione di cibi contaminati, per citarne alcune.
  - Gli organismi transgenici posseggono del DNA estraneo incorporato nel proprio materiale genetico. Il bestiame transgenico secerne proteine estranee nel latte. Le piante transgeniche presentano grandi potenzialità in campo agrario.

15.5

11. Citare almeno due questioni relative alla sicurezza della tecnologia del DNA ricombinante e spiegare in che modo sono state affrontate.
  - Alcuni consumatori hanno preoccupazioni relative alla sicurezza degli organismi geneticamente modificati. Per far fronte a queste preoccupazioni, i ricercatori rispettano alcune procedure di sicurezza nell'utilizzo della tecnologia del DNA ricombinante.
  - L'introduzione di piante ed animali transgenici nell'ambiente naturale e la loro potenziale diffusione incontrollata è una preoccupazione emergente.

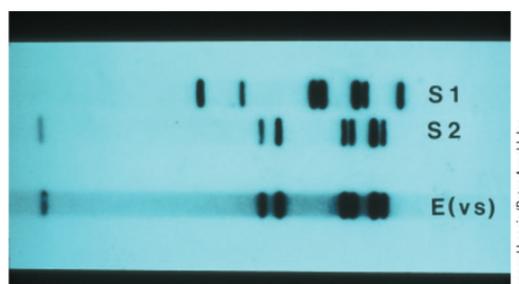
#### AUTOVERIFICHE

1. Un plasmide: (a) viene usato come vettore di DNA; (b) è un tipo di batteriofago; (c) è un tipo di cDNA; (d) è un retrovirus; (e) b e c.
2. Molecole di DNA con estremità coesive complementari si associano mediante: (a) legami

- covalenti; (b) legami a idrogeno; (c) legami ionici; (d) ponti disolfuro; (e) legami fosfodiesterici.
3. Sia il DNA umano che un particolare plasmide hanno entrambi siti che possono essere tagliati dagli enzimi di restrizione Hind III ed EcoRI . Per produrre una molecola di DNA ricombinante, si dovrebbe: (a) tagliare il plasmide con EcoRI ed il DNA umano con Hind III; (b) usare EcoRI per tagliare sia il plasmide che il DNA umano; (c) usare Hind III per tagliare sia il plasmide che il DNA umano; (d) a o b; (e) b o c.
  4. Quale tecnica permette di replicare rapidamente i frammenti di DNA senza clonarli utilizzando cellule? (a) L'elettroforesi su gel; (b) le librerie di cDNA; (c) le sonde genetiche; (d) i polimorfismi di lunghezza dei frammenti di restrizione; (e) la reazione a catena della polimerasi.
  5. La tecnica della PCR utilizza: (a) una DNA polimerasi resistente al calore; (b) una trascrittasi inversa; (c) una DNA ligasi; (d) enzimi di restrizione; (e) b e c.
  6. Un clone di cDNA contiene: (a) introni; (b) esoni; (c) anticodoni; (d) a e b; (e) b e c.
  7. I dideossinucleotidi ddATP, ddTTP, ddGTP e ddCTP sono importanti nel sequenziamento del DNA perché: (a) provocano la terminazione prematura della catena nascente di DNA; (b) sono usati come primer; (c) fanno sì che i frammenti di DNA che li contengono migrino più lentamente in un gel di sequenza; (d) non sono influenzati dalle alte temperature; (e) hanno più energia dei deossinucleotidi.
  8. Nella tecnica del Southern blot, \_\_\_\_\_ è/sono trasferito/i da un gel ad una speciale membrana di nitrocellulosa o di nylon. (a) Proteine; (b) RNA; (c) DNA; (d) colonie batteriche; (e) trascrittasi inversa.
  9. L'elettroforesi su gel separa gli acidi nucleici sulla base della differenza di: (a) lunghezza (peso molecolare); (b) carica; (c) sequenza nucleotidica; (d) proporzioni relative di adenina e guanina; (e) proporzioni relative di timina e citosina.
  10. Una libreria genomica: (a) rappresenta l'intero DNA di uno specifico cromosoma; (b) viene prodotta utilizzando la trascrittasi inversa; (c) è conservata in una collezione di batteri ricombinanti; (d) è una copia di DNA degli mRNA maturi; (e) permette di amplificare un piccolissimo campione di DNA.
  11. Il fattore di crescita tissutale-beta: (a) è una sonda genetica per i plasmidi ricombinanti; (b) è un prodotto della tecnologia del DNA utilizzato nell'ingegneria tissutale; (c) è necessario per la costruzione di una libreria di cDNA; (d) non può essere sintetizzato senza l'uso di una DNA polimerasi resistente al calore; (e) viene isolato mediante la tecnica del Southern blot.
  12. Quali dei seguenti marcatori molecolari altamente polimorfici sono utili nel DNA fingerprinting? (a) Vettori di clonaggio cosmidici; (b) sequenze clonate di DNA; (c) sequenze di DNA palindromiche; (d) brevi ripetizioni in tandem; (e) DNA complementari.

### PENSIERO CRITICO

1. Quali sono i problemi che possono sorgere quando si cerca di produrre una proteina eucariotica in un batterio? Come potrebbero essere risolti alcuni di questi usando piante o animali transgenici?
2. Sarebbe stata possibile la nascita dell'ingegneria genetica senza una profonda conoscenza della genetica batterica? Date una spiegazione.
3. Che relazione c'è tra la proteomica e la genomica funzionale?
4. ANALISI DEI DATI . È stata effettuata l'analisi di marcatori RFLP su un campione di sangue ritrovato sulla scena di un crimine e su quello di due sospetti. Il DNA relativo alla scena del crimine è indicato E(vs). Quale individuo sospettato è il probabile colpevole? Quale individuo è sicuramente innocente?
5. CONNESSIONE EVOLUTIVA . La tecnologia del DNA, come ad esempio la produzione di animali transgenici, è possibile solo grazie al fatto che organismi anche molto diversi tra loro posseggono sistemi genetici identici (DNA → RNA → proteine). Qual è il significato evolutivo dell'universalità dei sistemi genetici presenti in organismi tanto diversi, come ad esempio i batteri e i maiali?
6. SCIENZA, TECNOLOGIA E SOCIETÀ . Quali sono le vie attraverso le quali le recenti innovazioni nel campo della genetica potrebbero influenzarti personalmente?



I principi della genetica si applicano a tutti gli altri organismi, uomo compreso. Nonostante ciò, ci sono delle differenze rilevanti tra la ricerca genetica applicata all'uomo e quella condotta negli altri organismi. Per lo studio dell'ereditarietà in qualsiasi specie, i genetisti dovrebbero, in teoria, poter eseguire incroci controllati fra individui differenti e poter allevare la progenie in condizioni controllate. Naturalmente, nella popolazione umana è illegale e non etico effettuare gli incroci sperimentali in tali condizioni.

Una differenza importante tra la ricerca genetica condotta sull'uomo e quella effettuata in altre specie è riferibile principalmente al fatto che gli organismi non umani generano numerosi individui ad ogni evento riproduttivo e hanno brevi tempi generazionali. Al contrario, la maggior parte dei nuclei familiari umani sono numericamente piccoli e fra le varie generazioni intercorrono 20, 30 anni, o più.

Nonostante queste difficoltà oggettive, lo studio della genetica umana, ossia la scienza della variabilità ereditabile nell'uomo, sta facendo rapidi progressi (vedi figura). Tradizionalmente, la genetica umana è stata studiata usando approcci basati su studi di popolazione condotti su famiglie molto grandi. Più recentemente, questa disciplina ha ricevuto notevole impulso grazie all'interesse del mondo medico per le malattie genetiche dell'uomo. Inoltre, studi di genetica eseguiti su altri organismi hanno fornito preziose informazioni: molti interrogativi in genetica umana sono stati risolti studiando l'ereditarietà in organismi modello come i batteri, i lieviti, i vermi, i moscerini della frutta e i topi.

Il genoma umano, che contiene la totalità dell'informazione genetica delle cellule umane, è stato mappato e sequenziato. Con il sequenziamento del DNA è stato identificato l'ordine dei nucleotidi per cercare di comprendere le basi genetiche delle somiglianze e delle differenze tra individui.

In questo capitolo, sarà illustrato inizialmente come si studia il genoma umano, considerando anche i progressi derivati dal Progetto Genoma Umano. Quindi si analizzeranno diverse malattie genetiche umane, i test genetici, l'analisi e la consulenza genetica, e come vengono curate alcune malattie genetiche con la terapia genica. Il capitolo si conclude con una considerazione sui problemi etici emergenti al crescere delle conoscenze sul genoma umano.

## 16.1 LO STUDIO DELLA GENETICA UMANA

### OBIETTIVO DI APPRENDIMENTO

1. Fare una distinzione tra analisi del cariotipo ed analisi degli alberi genealogici.
2. Discutere le implicazioni del Progetto Genoma Umano.
3. Discutere il modello murino per lo studio della fibrosi cistica.

I genetisti umani utilizzano metodi diversi che consentono di identificare malattie genetiche e di fare deduzioni sulla modalità di trasmissione di un carattere. Noi considereremo tre di questi metodi: l'identificazione dei cromosomi attraverso il cariotipo, l'analisi dei quadri di ereditarietà familiare attraverso la costruzione di alberi genealogici (pedigree), il sequenziamento e il mappaggio dei geni mediante i progetti genomici. L'ereditarietà nell'uomo è spesso studiata utilizzando sia una combinazione dei metodi sopra citati sia altri approcci.

### I cromosomi umani sono studiati con l'analisi del cariotipo

Come avvenne con Mendel e le sue piante di pisello, molti dei principi di base della genetica sono stati scoperti utilizzando organismi semplici, con i quali è spesso possibile correlare i dati genetici al numero e alla struttura di specifici cromosomi. Alcuni degli organismi usati in genetica, come il moscerino della frutta *Drosophila melanogaster*, hanno pochissimi cromosomi; solo quattro paia nel caso del moscerino della frutta. Nelle ghiandole salivari delle larve di *Drosophila*, i cromosomi sono così grandi che si può osservare la loro struttura in dettaglio (Nella Figura 2-3 è possibile osservare i dettagli dei cromosomi di *Drosophila*). Questo organismo, quindi, ha consentito di correlare le alterazioni fenotipiche ereditabili ad alcune modificazioni della struttura dei cromosomi.

Il numero dei cromosomi nella specie umana è di 46: 44 autosomi (22 coppie) e due cromosomi sessuali (una coppia). Un cariotipo (dal greco, significa "nucleo") è il corredo cromosomico di un individuo. Fino alla metà degli anni '50, prima che fossero disponibili moderni sistemi di cariotipizzazione, il numero dei

cromosomi umani si pensava fosse 48. Questo risultato si basava su studi pubblicati nel 1923. La difficoltà nel determinare il corretto numero dei cromosomi era basata sull'incapacità di separare i cromosomi, in modo da poterli contare con sicurezza.

Nel 1952, il biologo cellulare T. C. Hsu dell'Università del Texas, trattando per errore le cellule con una soluzione ipotonica, osservò che le stesse si gonfiavano e i cromosomi si separavano magnificamente. Utilizzando questa e altre metodiche, nel 1956 i ricercatori J.H. Tjio e A. Levan riportarono che il corretto numero dei cromosomi era 46 e non 48. La storia della scoperta del numero dei cromosomi umani è un valido esempio della natura autocritica della scienza (benché questo processo a volte richieda un po' di tempo). La continua rivalutazione di fatti e idee, effettuata spesso utilizzando tecniche migliori delle precedenti, è una componente essenziale del processo scientifico.

I cromosomi umani sono visibili solamente nelle cellule in divisione (vedi Capitolo 10) ed è difficile ottenere cellule in divisione direttamente dal corpo umano. Normalmente si utilizza il sangue, in quanto i globuli bianchi possono essere indotti a dividersi in coltura trattandoli con sostanze chimiche. Altre fonti di cellule in divisione sono la pelle e, per analisi prenatali, i villi coriali o le cellule fetali del liquido amniotico (discussi più avanti nel capitolo).

Nell'esecuzione del cariotipo, le cellule sono coltivate e quindi trattate con colchicina, che le blocca in metafase mitotica, o tarda profase, quando i cromosomi sono maggiormente condensati. Successivamente, le cellule sono poste in una soluzione ipotonica che le fa rigonfiare, in modo che i cromosomi, separandosi, possano essere facilmente osservati. Le cellule sono quindi schiacciate su un vetrino e i cromosomi sono colorati per mettere in evidenza il quadro delle bande che è caratteristico per ogni coppia di omologhi. Dopo che l'immagine microscopica è stata acquisita da un computer, le coppie di omologhi sono appaiate elettronicamente (FIG. 16-1).

Per convenzione, i cromosomi possono essere identificati in base alla lunghezza, alla posizione del centromero, alla bandeggiatura (prodotta colorando i cromosomi con sostanze che originano bande chiare e scure di varia dimensione) e ad altre caratteristiche, come i satelliti presenti nelle regioni terminali di alcuni cromosomi. Ad eccezione dei cromosomi sessuali, i cromosomi sono numerati ed allineati in ordine di grandezza, eccetto il cromosoma 21, che è più piccolo del cromosoma 22. Il cromosoma più grande (cromosoma 1) è cinque volte più lungo del più piccolo (cromosoma 21), ma fra quelli di dimensioni intermedie le differenze sono minime. I cromosomi X e Y di un maschio normale sono omologhi solo alle estremità; le femmine normali hanno due cromosomi X e non posseggono il cromosoma Y. Differenze rispetto al cariotipo normale, che riguardano modificazioni del numero e della struttura dei cromosomi, sono associate con alcune malattie, come la sindrome di Down (discussa più avanti in questo capitolo). Un altro metodo per distinguere i cromosomi in un cariotipo è l'ibridazione in situ fluorescente (FISH). Un filamento di DNA complementare al DNA di uno specifico cromosoma viene marcato con un colorante fluorescente. Il DNA del cromosoma viene denaturato (cioè i due filamenti vengono separati) in modo che il filamento marcato vi si possa legare. Per ogni cromosoma viene usato un fluoroforo differente, cosicché ciascuno presenta un proprio colore (osservate il cariotipo in Fig. 16-1). Un cromosoma che presenti più colori (non mostrato) indica rottura e fusione di cromosomi, un'anomalia associata ad alcune malattie genetiche e a molti tipi di cancro.

### **Gli alberi genealogici possono aiutare ad identificare alcune condizioni ereditarie**

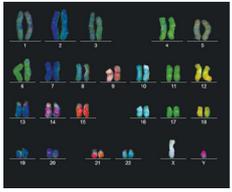
Gli studi iniziali di genetica umana generalmente si occupavano di analizzare la distribuzione all'interno dei membri di una famiglia di coppie di caratteri facilmente identificabili. L'"albero genealogico" che mostra la trasmissione dei caratteri genetici per parecchie generazioni all'interno di una famiglia è noto come pedigree. Anche con l'avvento delle moderne tecniche di genetica molecolare, l'analisi del pedigree rappresenta ancora una tecnica molto utile, in quanto aiuta i genetisti molecolari a determinare le esatte correlazioni tra le molecole di DNA che essi analizzano in individui imparentati. L'analisi del pedigree rappresenta anche uno strumento molto utile per la consulenza genetica e per la clinica. Però, poiché nella specie umana le famiglie tendono ad essere di piccole dimensioni e le informazioni su alcuni membri delle famiglie, soprattutto su quelli deceduti, possono essere carenti, l'analisi del pedigree presenta delle limitazioni.

**METODO DI RICERCA** *Perché si usa?* I ricercatori utilizzano l'analisi del cariotipo per identificare anomalie cromosomiche negli individui. *Come funziona?*

I cariotipi sono comunemente preparati da colture di globuli bianchi. Le cellule preparate sono disposte su un vetrino e i cromosomi sono rilasciati in seguito alla rottura del nucleo. Il microscopio ottico utilizzato per osservare il vetrino è collegato ad un computer in cui un software di analisi dell'immagine consente ai biologi di combinare i cromosomi omologhi e di ordinarli in base alla lunghezza. Prima dell'avvento dei computer, questo passaggio veniva effettuato ritagliando i cromosomi da una fotografia stampata.

Questi cromosomi sono stati "colorati" con sonde marcate con traccianti fluorescenti di diverso colore, che ibridizzano





con specifiche coppie di cromosomi. La colorazione facilita l'identificazione dei cromosomi. Nell'immagine sottostante è mostrato un tipico cariotipo maschile umano.

FIGURA 16-1  
La cariotipizzazione

I pedigree sono disegnati utilizzando una simbologia standardizzata. Esaminiamo la FIGURA 16-2, che mostra un ipotetico pedigree per l'albinismo, patologia caratterizzata dall'assenza di pigmentazione della pelle, dei capelli e degli occhi. Ogni riga orizzontale rappresenta una generazione, con la generazione più vecchia (identificata con il numero romano I) in alto e quella più recente in basso. All'interno di una determinata generazione, gli individui sono numerati consecutivamente da sinistra a destra con numeri arabi. Una linea orizzontale unisce due genitori, e una verticale scende dai genitori verso i figli. Per esempio, gli individui II-3 e II-4 hanno quattro figli (III-1, III-2, III-3 e III-4). È da notare che gli individui di una stessa generazione possono anche non essere correlati geneticamente. Per esempio, gli individui II-1, II-2 e II-3 non sono correlati con II-4 e II-5. All'interno di un gruppo di fratelli, il più vecchio è a sinistra e il più giovane è a destra.

L'allele per l'albinismo non può essere dominante; se lo fosse, almeno uno dei genitori della femmina III-2 sarebbe albino. Questo pedigree dimostra che l'albinismo è un esempio di ereditarietà autosomica (non legata cioè ai cromosomi sessuali) dovuta ad un allele recessivo. In questo caso, due genitori fenotipicamente normali possono generare un figlio albino in quanto eterozigoti e quindi in grado di trasmettere entrambi un allele recessivo.

Lo studio dei pedigree ha permesso di predire come sono ereditati i caratteri fenotipici che sono sotto il controllo genetico di un singolo locus. Questi caratteri sono definiti mendeliani. Nell'uomo, sono stati descritti circa 10.000 caratteri mendeliani. L'analisi del pedigree frequentemente identifica tre tipi di ereditarietà mendeliana: autosomica dominante, autosomica recessiva e recessiva legata al cromosoma X (cosiddetta X-linked); più avanti nel capitolo verranno presentati esempi delle tre modalità.

### Il Progetto Genoma Umano ha permesso di sequenziare il DNA di tutti i cromosomi umani

Coloro che hanno lavorato per il Progetto Genoma Umano hanno sequenziato il DNA dell'intero genoma nucleare umano, della lunghezza di circa 2,9 miliardi di coppie di basi. (Il genoma mitocondriale umano era già stato sequenziato nel 1981). Questo impegno internazionale, che ha utilizzato il DNA estratto da 6-10 individui anonimi, è stato concluso nel 2001 e ha coinvolto centinaia di ricercatori di due gruppi indipendenti: l'International Human Genome Sequencing Consortium finanziato dal governo e la compagnia privata Celera Genomics. Il completamento definitivo del Progetto Genoma Umano nel 2003 rappresenta una significativa pietra miliare della genetica (TABELLA 16-1).

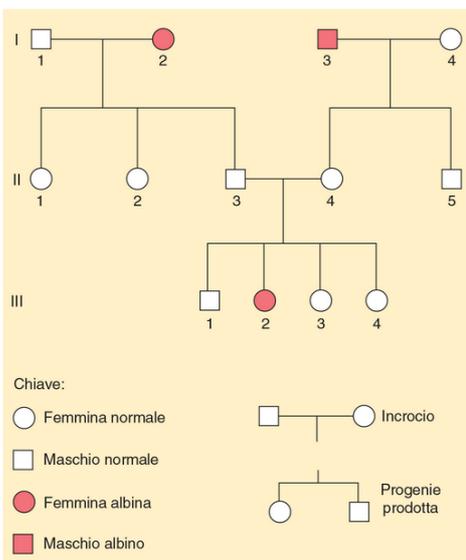
I ricercatori adesso sperano di riuscire ad identificare la localizzazione di tutti i geni all'interno del DNA sequenziato. Nel 2001, il National Human Genome Research Institute (NHGRI) ha stimato un numero di geni compreso tra 35.000 e 45.000 nel genoma umano, ma nel 2010 il numero stimato è sceso a circa 20.000-25.000.

← FIGURA 16-2  
Un albero genealogico per l'albinismo

L'identificazione dei geni rappresenta un impegno formidabile. Come è possibile identificare un gene all'interno di una sequenza di DNA se non se ne conosce alcunché? Il genoma umano è estremamente complesso, ed include il DNA contenuto sia nel nucleo che nei mitocondri. Tuttavia, il DNA nucleare costituisce la quasi totalità dell'informazione genetica presente nel genoma umano. Come nel caso dei genomi di altri organismi eucariotici, solo una parte del genoma umano (circa il 2%) codifica polipeptidi, mentre alcuni altri segmenti codificano solo prodotti ad RNA.



(a) Una ragazza albina, appartenente all'etnia nativa americana Cuna, gioca con gli amici. L'albinismo è frequente nell'etnia Cuna che vive nelle Isole San Blas di Panama.



(b) Attraverso lo studio della storia familiare, è spesso possibile determinare il meccanismo genetico di un tratto ereditario. Consideriamo l'individuo III-2, una ragazza albina con due genitori fenotipicamente normali, i soggetti II-3 e II-4.

**TABELLA 16-1 Funzioni degli elementi negli organismi**

Anno	Progresso scientifico
1866	Mendel propone l'esistenza dei fattori ereditari, oggi noti come geni
1871	Scoperti gli acidi nucleici
1879	Identificati i cromosomi e osservati durante la divisione cellulare
1929	Caratterizzata la natura chimica dei nucleotidi
1953	Determinata la struttura del DNA a doppia elica
1960-1970	Decifrato il codice genetico (come sono prodotte le proteine dal DNA)
1972	Prodotta la prima molecola di DNA ricombinante
1977	Inizia il sequenziamento del DNA
1986	Sequenziamento del DNA automatizzato
1995	Completato il sequenziamento del primo genoma procariotico (batterio <i>Haemophilus influenzae</i> )
1996	Completato il sequenziamento del primo genoma eucariotico (lievito <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )
1998	Completato il sequenziamento del primo genoma di un eucariote pluricellulare (nematode <i>Caenorhabditis elegans</i> )
2001	Publicata la sequenza grezza dell'intero genoma umano; scoperto che il 95% del genoma è non codificante
2003	Completato definitivamente il sequenziamento del genoma umano

La maggior parte del genoma è costituita da elementi di regolazione non codificanti, sequenze ripetute (copie multiple) di DNA e segmenti genici le cui funzioni sono ancora sconosciute. Talvolta, i geni sono sovrapposti gli uni agli altri, mentre in altri casi un singolo gene codifica proteine multiple. L'identificazione della correlazione tra specifici geni e gli RNA e le proteine da essi codificati, nonché la determinazione dei ruoli di tali RNA e proteine nell'organismo sono due degli obiettivi degli studi di genetica umana.

Ad esempio, l'analisi del cromosoma 22 mediante un processo computerizzato di scansione delle sequenze di DNA volto all'identificazione di marcatori, come gli elementi promotori tipicamente associati ai geni, ha permesso di identificare 545 geni su questo cromosoma. Molti dei geni identificati sono in realtà geni "potenziali", in quanto i loro RNA messaggeri (mRNA) ed i loro prodotti proteici non sono stati ancora isolati. Altri geni sono stati evidenziati solo perché codificano per proteine simili ad altre

precedentemente identificate nell'uomo e in altri organismi. Malgrado le difficoltà, si stanno facendo ampi progressi e gli studi di mappaggio permetteranno di capire le relazioni fisiche e funzionali tra i geni e i gruppi di geni, suggerite dal loro ordine sui cromosomi.

Ora che l'obiettivo del sequenziamento del genoma umano è stato raggiunto, i biologi saranno occupati per molti decenni nell'analisi dei dati ottenuti. Oltre ad identificare i geni, bisogna capire che cosa fa ogni gene, come interagisce con gli altri geni e come è regolata la sua espressione nei diversi tessuti. Tutte le migliaia di proteine prodotte nelle cellule umane saranno identificate, e sarà inoltre determinata la loro struttura tridimensionale e valutata la loro funzione.

### Gli studi di associazione genomica su larga scala mettono in evidenza la complessità genetica delle più importanti malattie dell'uomo

I biologi hanno cominciato a studiare la variabilità molecolare all'interno del genoma umano, con lo scopo di evidenziare differenze tra singoli individui che possano essere alla base della predisposizione ad alcune malattie. Le potenziali applicazioni mediche del Progetto Genoma Umano sono molto promettenti. Per esempio, le mutazioni nei geni del cromosoma 22 sono legate ad almeno 27 malattie, note per avere una componente genetica. I geni alla base di molte di queste malattie non sono però stati ancora identificati in modo preciso. A questo riguardo, un gene coinvolto nella schizofrenia è fortemente associato al cromosoma 22, ma la sua esatta posizione e la sua funzione non sono state ancora scoperte.

Gli studi di associazione genomica su larga scala (GWA) confrontano il genoma di individui affetti da una particolare malattia, con quello di individui sani. Per esempio, nel 2007 sono stati studiati i genomi di oltre 16.000 cittadini britannici per confrontare i profili genetici di individui sani con quelli di pazienti affetti da una delle sette più comuni patologie: disturbi bipolari, malattia coronarica, morbo di Crohn, ipertensione arteriosa, artrite reumatoide, diabete di tipo I e diabete di tipo II. I fenotipi assai variabili dei pazienti affetti sottintendono meccanismi di trasmissione ereditaria complessa, in cui diversi geni contribuiscono alla suscettibilità individuale alla malattia. In questo studio specifico, i ricercatori hanno scoperto 24 varianti geniche associate ad un aumentato rischio di sviluppare una o più di queste malattie. La funzione della maggior parte di queste varianti GWA non è stata definita, tuttavia conoscerne l'esatta localizzazione sui singoli cromosomi è un passo importante nella comprensione delle basi genetiche di alcune tra le più comuni patologie umane.

### La genomica comparativa ha evidenziato segmenti di DNA identici nei genomi di topo ed uomo

Sono noti circa 500 segmenti di DNA lunghi più di 200 coppie di basi che sono "conservati" al 100% (sono cioè identici) nei genomi murino ed umano. Questo notevole grado di conservazione presenta interessanti implicazioni evolutive, in quanto indica che tali segmenti non sono mutati nel corso dei circa 75 milioni di anni trascorsi dalla divergenza di uomo e topo da un antenato comune. Durante tutto questo tempo, altri segmenti di DNA sono andati incontro ad un alto tasso di mutazione e selezione, portando alla divergenza tra topi ed uomini fino allo stato attuale. Sebbene le funzioni di tali segmenti invariati non siano ancora state determinate, è chiaro che debbano avere un ruolo vitale. (Se non fossero stati essenziali nella loro

forma attuale, sarebbero andati incontro a mutazione e selezione). Molti dei segmenti altamente conservati sembrano contenere elementi non codificanti proteine che potrebbero regolare l'espressione di altri geni.

### **I ricercatori utilizzano modelli murini per lo studio delle malattie genetiche umane**

Molti dei quesiti relativi alle malattie genetiche umane sono di difficile risoluzione a causa delle questioni etiche derivanti dalla realizzazione di test sperimentali sugli esseri umani. Tuttavia, lo studio di una qualunque malattia è senza dubbio facilitato se è possibile avere un modello animale per la sperimentazione.

Un esempio calzante è quello della *fibrosi cistica*, una malattia genetica causata da una mutazione in un singolo gene che viene ereditata come allele recessivo. Nel 1994, i ricercatori hanno utilizzato il gene targeting per ottenere ceppi di topi che fossero omozigoti ed eterozigoti per la fibrosi cistica.

L'allele responsabile della fibrosi cistica è una forma mutante di un gene responsabile del controllo del bilancio dell'acqua e degli elettroliti nell'organismo.

Questo gene, conosciuto come *CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator)*, è stato clonato e si è visto che codifica per una proteina di un canale ionico per il cloruro posto nella membrana plasmatica. Questo canale ionico è responsabile del trasporto degli ioni cloruro all'esterno delle cellule che tappezzano il tubo digerente e l'apparato respiratorio. Quando lo ione cloruro lascia le cellule, l'acqua lo segue per osmosi; in questo modo, il secreto normale di queste cellule è relativamente acquoso. Dato che le cellule di un individuo affetto da fibrosi cistica sono prive dei normali canali ionici per il cloruro, il loro secreto ha uno scarso contenuto di acqua e il sudore è estremamente salato. Le cellule degli individui eterozigoti hanno solamente la metà del numero normale di canali CFTR funzionanti, ma questi sono sufficienti per mantenere una adeguata fluidità dei loro secreti.

Alcuni ricercatori stanno focalizzando i loro sforzi sulla comprensione della modalità di attivazione ed inattivazione del canale CFTR nei topi, in modo da poter usare questa informazione per progettare un farmaco che possa potenziare il trasporto di ioni cloruro attraverso questi canali. Tale farmaco, quindi, dovrebbe avere la potenzialità di trattare la fibrosi cistica nell'uomo mediante l'attivazione dei canali mutanti.

### **Verifica**

- Quali tipi di informazioni può fornire un cariotipo umano?
- Che cos'è l'analisi degli alberi genealogici (pedigree)?
- Quali sono due dei possibili benefici che si spera di ottenere studiando ulteriormente il genoma umano?
- In che modo l'utilizzo di un modello murino per lo studio di una malattia genetica può risolvere le difficoltà relative allo studio dell'ereditarietà umana?

---

## **16.2 ALTERAZIONI NEL NUMERO E NELLA STRUTTURA DEI CROMOSOMI**

### **OBIETTIVO DI APPRENDIMENTO**

---

4. Spiegare come la non disgiunzione durante la meiosi possa essere responsabile di anomalie cromosomiche come la sindrome di Down, la sindrome di Klinefelter e la sindrome di Turner.
5. Distinguere tra le seguenti anomalie strutturali dei cromosomi: traslocazioni, delezioni e siti fragili.

La poliploidia, cioè la presenza di corredi cromosomici completi multipli, è comune nelle piante, ma rara negli animali. Può verificarsi come risultato di una mancata separazione dei cromosomi durante la meiosi o per la fecondazione della cellula uovo da parte di più di uno spermatozoo. La poliploidia nell'uomo ed in molti altri animali è letale quando è a carico di tutte le cellule somatiche. Per esempio, la *triploidia* ( $3n$ ) si riscontra qualche volta in embrioni abortiti spontaneamente nelle prime fasi della gravidanza.

Anomalie per la presenza di un unico cromosoma extra o per l'assenza di un cromosoma sono molto più comuni nell'uomo: tali situazioni sono indicate come aneuploidie. Bisogna ricordare che, come regola, vi sono due rappresentanti per ciascun tipo di cromosoma e questa è la normale condizione disomica. Un individuo con un cromosoma extra — cioè con tre rappresentanti di un determinato tipo — è detto trisomico per quel tipo di cromosoma; la trisomia viene indicata  $2n + 1$ . Un individuo che non possiede un membro di una coppia di cromosomi è detto monosomico; il cariotipo monosomico è indicato  $2n - 1$ . La TABELLA 16-2 riassume alcune delle malattie causate da aneuploidie.

Le aneuploidie, generalmente, si verificano come risultato di una divisione meiotica (o, raramente, mitotica) anormale in cui i cromosomi non si separano all'anafase; tale fenomeno è detto non disgiunzione

e può interessare sia gli autosomi, sia i cromosomi sessuali. Nella meiosi, la non disgiunzione si può avere sia nella prima che nella seconda divisione (o in entrambe). Per esempio, due cromosomi X che non si separano alla prima o alla seconda divisione possono trovarsi entrambi nel nucleo della cellula uovo, oppure i due cromosomi X possono finire in un globulo polare lasciando la cellula uovo priva di cromosoma X. (Ricordate dal Capitolo 10 che un globulo polare è una cellula aploide non funzionale prodotta nel corso dell'oogenesi; vedi anche Fig. 50-11 ).

La non disgiunzione della coppia XY nel maschio può portare alla formazione di spermatozoi contenenti entrambi questi cromosomi oppure di spermatozoi con nessuno dei due ( FIG. 16-3 ). In maniera analoga, la non disgiunzione alla seconda divisione meiotica può produrre spermatozoi con due cromosomi X o due Y. Quando un gamete anormale si unisce con uno normale, lo zigote che ne risulta presenta un'anomalia cromosomica che sarà presente in ogni cellula dell'organismo.

La non disgiunzione meiotica origina un numero anormale di cromosomi a livello dello zigote, e pertanto tutte le cellule del futuro individuo avranno un numero anormale di cromosomi. Al contrario, la non disgiunzione durante la mitosi avviene in stadi di sviluppo più tardivi e pertanto conduce ad una linea di cellule anormali in un individuo per il resto normale. Questa mescolanza di cellule con differente numero di cromosomi potrà o meno interessare i tessuti somatici e/o della linea germinale.

Anomalie nel numero dei cromosomi sono ricorrenti nelle cellule cancerose, in modo particolare in quelle dei tumori solidi, tuttavia non è chiaro se l'aneuploidia è una causa del cancro, oppure ne è una conseguenza.

Anomalie cromosomiche riconoscibili si riscontrano in meno dell'1% dei nati vivi, ma molte osservazioni suggeriscono che il tasso al concepimento sia molto più elevato. Almeno il 17% delle gravidanze arrivate ad 8 settimane è destinato a terminare in un aborto spontaneo. Circa la metà di tali embrioni abortiti spontaneamente presenta grosse anomalie cromosomiche, tra cui trisomie autosomiche (come la trisomia 21), triploidie, tetraploidie e sindrome di Turner (XO), dove lo O si riferisce all'assenza del secondo cromosoma sessuale. Le monosomie autosomiche sono estremamente rare, forse perché causano aborti spontanei molto precocemente, ancor prima che si venga a conoscenza dello stato di gravidanza. Alcuni studiosi forniscono stime sorprendentemente alte (50% o più) per il tasso di perdita di embrioni molto precoci. Probabilmente, alla base di tali aborti spontanei ci sono proprio anomalie cromosomiche.

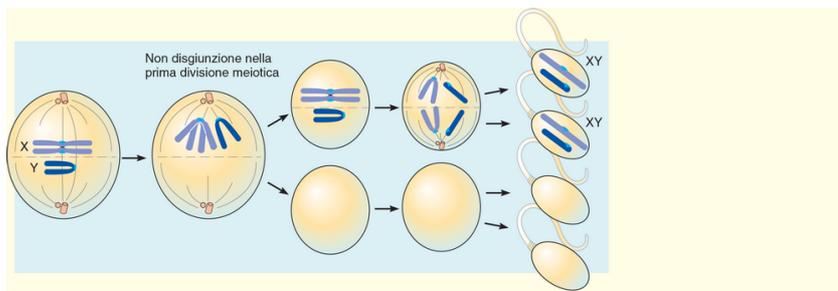
### La sindrome di Down è causata di norma dalla trisomia 21

La sindrome di Down è una delle anomalie cromosomiche più comuni nell'uomo (il termine *sindrome* si riferisce ad una serie di sintomi che di solito sono presenti insieme in un particolare stato patologico). È stata chiamata così perché John Langdon Down, un medico inglese, la descrisse per primo nel 1866. I soggetti colpiti presentano anomalie nel volto, nelle palpebre, nella lingua, nelle mani e in altre parti del corpo, e spesso sono fisicamente e mentalmente ritardati ( FIG. 16-4a ). Inoltre, essi sono particolarmente suscettibili nei confronti di particolari malattie, come la leucemia e il morbo di Alzheimer.

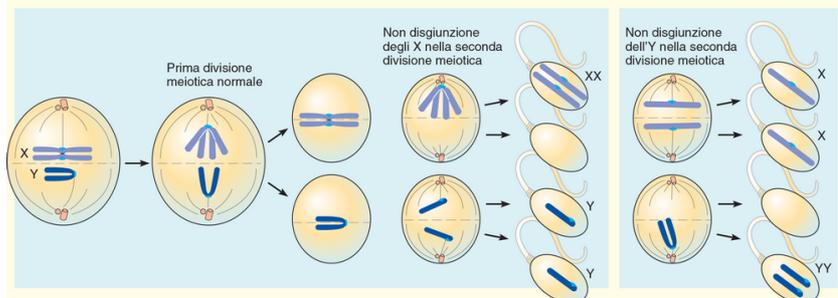
Studi citogenetici hanno rivelato che la maggior parte degli individui con la sindrome di Down ha 47 cromosomi a causa di una *trisomia autosomica*: questa condizione è nota come trisomia 21 ( FIG. 16-4b ). Si pensa che la presenza del cromosoma soprannumerario sia dovuta alla non disgiunzione durante la meiosi. Sebbene in questi individui l'informazione genetica sia completa, le copie soprannumerarie dei geni del cromosoma 21 portano un qualche tipo di sbilanciamento che è responsabile dello sviluppo anomalo, sia fisico che mentale. La sindrome di Down è abbastanza variabile nell'espressione, con alcuni individui che manifestano una sintomatologia più grave di altri. I ricercatori stanno usando le metodologie dell'ingegneria genetica per identificare sul cromosoma 21 sia i geni che influenzano lo sviluppo mentale sia possibili *oncogeni* (geni in grado di causare il cancro) e geni che possono essere coinvolti nel morbo di Alzheimer. (Come molte condizioni umane, il cancro ed il morbo di Alzheimer hanno componenti sia genetiche sia ambientali).

**TABELLA 16-2 Funzioni degli elementi negli organismi**

Cariotipo	Nome comune	Descrizione clinica
Trisomia 13	Sindrome di Patau	Difetti multipli, morte in genere nei primi tre mesi di vita
Trisomia 18	Sindrome di Edwards	Orecchie deformi, difetti cardiaci, spasticità e altri danni; morte in genere nel primo anno di vita
Trisomia 21	Sindrome di Down	Incidenza circa 1 su 800 nati vivi. La trisomia vera si trova più frequentemente fra figli di madri anziane (+ di 35 anni), mentre la traslocazione, che porta ad una situazione equivalente alla trisomia, non è correlata all'età. La trisomia 21 è caratterizzata da una plica della pelle al di sopra dell'occhio, ritardo mentale di grado variabile, bassa statura, lingua sporgente e rugosa, solco palmare trasversale, deformità cardiache e rischio aumentato per leucemie e morbo di Alzheimer
XO	Sindrome di Turner	Bassa statura, collo con pliche palmate, talvolta leggero ritardo mentale; le ovaie degenerano in fase embrionale tardiva producendo caratteristiche sessuali rudimentali; il sesso è femminile; assenza di corpi di Barr
XXY	Sindrome di Klinefelter	Maschi con testicoli in progressiva degenerazione, mammelle ingrossate; un corpo di Barr per cellula
XYY	Cariotipo XYY	Molti maschi non presentano sintomi; alcuni maschi sono eccezionalmente alti con acne vistosa; una certa tendenza a un lieve ritardo mentale
XXX	Triplo-X	Nonostante i tre cromosomi X, femmine generalmente normali e fertili; due corpi di Barr per cellula



(a) La non disgiunzione nella prima divisione meiotica dà origine a due spermatozoi con X e Y e a due spermatozoi sprovvisti di entrambi.



(b) La non disgiunzione degli X nella seconda divisione meiotica dà origine ad uno spermatozoo con due X, due con un Y ciascuno ed uno privo di cromosomi sessuali. In maniera analoga, la non disgiunzione dell'Y dà origine ad uno spermatozoo con due Y, due con un X ciascuno ed uno privo di cromosomi sessuali (riquadro a destra).

**PUNTO CHIAVE** L'aneuploidia può essere il risultato di una non disgiunzione meiotica, ovvero la separazione anomala dei cromosomi nel corso della meiosi.

FIGURA 16-3  
*Non disgiunzione meiotica*

La sindrome di Down si riscontra in circa 1 su 800 neonati di tutti i gruppi etnici, ma la sua incidenza aumenta notevolmente con l'età della madre. L'incidenza della sindrome di Down non è influenzata dall'età del padre (sebbene lo siano altri disordini, come la schizofrenia e l'accondroplasia, la forma più comune di nanismo). La sindrome di Down è 68 volte più probabile nella prole di madri di 45

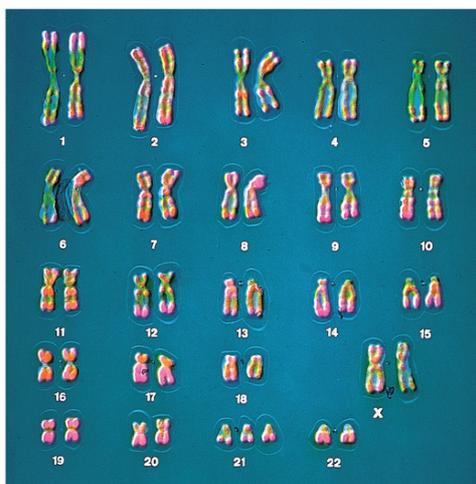
anni rispetto a quella di madri di 20 anni. Tuttavia, negli USA, la maggior parte dei bambini con sindrome di Down nasce da madri con età inferiore ai 35 anni. Ciò è in parte da attribuire al fatto che queste donne sono molto più numerose di quelle più anziane, e in parte perché circa il 90% delle donne più anziane, che si sottopongono al test prenatale, decide di porre termine alla gravidanza se vi è la diagnosi di sindrome di Down.

La ragione della relazione tra l'aumento dell'incidenza della sindrome di Down e l'età materna non è nota. Molte ipotesi cercano di spiegare l'effetto dell'età materna, ma nessuna di esse è suffragata in modo inequivocabile. Una di queste suggerisce che nelle donne più anziane il mantenimento delle cellule uovo

nello stato di meiosi sospesa per un tempo troppo lungo, potrebbe portare ad un deterioramento dell'apparato del fuso meiotico. (Alla nascita, la donna possiede già tutti gli oociti che permarranno nel corso della sua vita; tali oociti restano bloccati alla profase I della meiosi fino all'ovulazione). Un'altra possibilità è che un utero più vecchio abbia una minore capacità di rigettare un feto anormale.



(a) Questo ragazzino con la sindrome di Down si dedica ad un esperimento scientifico nella sua classe all'asilo. Alcuni individui con la sindrome di Down imparano a leggere e a scrivere.



(b) Si noti la presenza di un cromosoma 21 soprannumerario in questo cariotipo colorato di una femmina con la sindrome di Down.

FIGURA 16-4  
*Sindrome di Down*

### La maggior parte delle aneuploidie dei cromosomi sessuali è meno grave delle aneuploidie autosomiche

Le aneuploidie dei cromosomi sessuali sembrano essere relativamente ben tollerate (vedi Tabella 16-2), apparentemente e almeno in parte a causa del fenomeno della compensazione del dosaggio. Le cellule di mammifero, per compensare il materiale cromosomico X in eccesso, rendono inattivi uno dei due cromosomi X. Il materiale X inattivo è visibile come corpo di Barr, una zona di cromatina intensamente colorata presente vicino all'involucro nucleare durante l'interfase (vedi Fig. 11-16). La presenza del corpo di Barr nelle cellule delle femmine (ma non dei maschi) rappresenta un primo test per verificare se un individuo è geneticamente maschio o femmina. Come vedremo nella nostra discussione sulle aneuploidie dei cromosomi sessuali, il test del corpo di Barr ha grossi limiti.

Individui con la sindrome di Klinefelter hanno 47 cromosomi, che comprendono due X e un Y. Si tratta di maschi che hanno testicoli piccoli, producono pochi o nessuno spermatozoo e sono di conseguenza sterili. La dimostrazione che il cromosoma Y è il maggior determinante del fenotipo maschile è stata convalidata dal fatto che c'è almeno un gene sul cromosoma Y che sembra agire come "interruttore genetico",

indirizzando lo sviluppo in senso maschile. I soggetti con la sindrome di Klinefelter tendono ad essere eccezionalmente alti e ad avere mammelle di tipo femminile; circa la metà mostra un certo grado di ritardo mentale, ma la maggior parte di essi conduce una vita relativamente normale. Esaminando le loro cellule, si trova un corpo di Barr per cellula; sulla base di questo test, potrebbero essere classificati erroneamente come femmine. Circa 1 su 1000 maschi nati vivi è affetto dalla sindrome di Klinefelter.

La costituzione cromosomica sessuale per la sindrome di Turner viene indicata come Xo, dove o si riferisce all'assenza del secondo cromosoma sessuale. Mancando il forte effetto mascolinizante del cromosoma Y, gli individui affetti da sindrome di Turner si sviluppano come femmine. Tuttavia, il loro apparato genitale esterno ed interno è poco sviluppato e sono sterili. È chiaro che un secondo cromosoma X è necessario in un embrione femmina per il corretto sviluppo delle ovaie. L'esame delle loro cellule rivela l'assenza di corpi di Barr, mancando il cromosoma X extra da inattivare. Usando il test del corpo di Barr, l'individuo sarebbe classificato erroneamente come maschio. Circa 1 su 2500 femmine nate vive ha la sindrome di Turner.

Soggetti con un cromosoma X e due cromosomi Y sono fenotipicamente maschi e fertili. Le altre caratteristiche di questi soggetti (eccezionalmente alti e con acne grave) difficilmente meritano la qualifica di sindrome; da qui la designazione di cariotipo XYY. Anni fa era diffusa l'opinione che i soggetti con questo cariotipo avessero più probabilità di sviluppare tendenze criminali e di finire in prigione. Tuttavia, tali studi non erano attendibili, in quanto si basavano su piccoli numeri di maschi XYY e mancavano di studi di controllo adeguati su maschi XY. Oggigiorno, l'opinione prevalente in genetica medica è che nella popolazione generale vi siano molti maschi XYY non diagnosticati, che non mostrano aggressività e tendenze criminali e che di conseguenza non sono stati incarcerati.

### **Anomalie nella struttura cromosomica sono causa di determinate malattie**

Le anomalie cromosomiche non sono soltanto causate da cambiamenti nel numero dei cromosomi, ma anche da distinti cambiamenti nella struttura di uno o più cromosomi. La rottura e la riunione di parti di cromosomi possono produrre quattro tipi di alterazioni strutturali all'interno di un cromosoma o tra cromosomi diversi: duplicazioni, inversioni, delezioni e traslocazioni ( FIG. 16-5 ). Le rotture nei cromosomi sono il risultato di errori nel corso della replicazione o della ricombinazione. In una duplicazione, un segmento cromosomico è ripetuto una o più volte; tali ripetizioni si presentano spesso in tandem. In un' inversione, l'orientamento di un segmento cromosomico è invertito. In una delezione, la rottura determina la perdita di parte di un cromosoma, insieme ai geni presenti in quel segmento. Una delezione può verificarsi all'estremità o all'interno di un cromosoma. In alcuni casi di traslocazione, un frammento cromosomico si stacca e si attacca ad un cromosoma non omologo. In una traslocazione reciproca, due cromosomi non omologhi si scambiano segmenti.

Qui di seguito consideriamo tre semplici esempi di alterazioni strutturali in uno o più cromosomi che causano anomalie fenotipiche: traslocazioni, delezioni e siti fragili, ovvero siti cromosomici suscettibili alla rottura.

### **La traslocazione è l'attacco di parte di un cromosoma ad un altro cromosoma**

Le conseguenze delle traslocazioni variano in modo considerevole; esse comprendono situazioni in cui mancano alcuni geni (delezioni) o sono presenti copie soprannumerarie di altri geni (duplicazioni). In circa il 4% degli individui con la sindrome di Down sono presenti soltanto 46 cromosomi, ma uno è anormale. Solitamente in questi casi il braccio lungo del cromosoma 21 è stato traslocato sul braccio lungo del cromosoma 14. Il cromosoma anomalo con la traslocazione si definisce cromosoma 14/21. Le persone affette dalla sindrome di Down per traslocazione hanno quindi un cromosoma 14, un cromosoma 14/21 e due copie normali del cromosoma 21. Tutto o parte del cromosoma 21 è presente in triplice copia. Quando si studiano i cariotipi dei genitori di un individuo in questa situazione, si trova che o la madre o il padre hanno 45 cromosomi, sebbene siano fenotipicamente normali. Questi individui hanno un cromosoma 14, un cromosoma 14/21 ed un cromosoma 21. Sebbene il cariotipo sia anormale, non c'è materiale genetico in eccesso. A differenza della trisomia 21, questa forma di sindrome di Down per traslocazione è familiare e la sua incidenza non è correlata con l'età materna.

### **Una delezione è la perdita di una parte di un cromosoma**

A volte i cromosomi si rompono e non si riuniscono. Queste rotture portano a delezioni che possono andare da poche basi fino all'intero braccio di un cromosoma. Come ci si potrebbe aspettare, grosse delezioni sono letali, mentre piccole delezioni non hanno alcun effetto oppure sono causa di malattie fenotipicamente riconoscibili.

Un'alterazione causata da delezione è la sindrome "cri-duchat" (pianto di gatto) (1 su 50.000 nati vivi), in cui è delevata una parte del braccio corto del cromosoma 5. Come avviene nella maggior parte delle delezioni, il punto esatto di rottura del cromosoma 5 varia da persona a persona; in alcuni casi c'è una piccola perdita, mentre in altri la perdita è più consistente. I bambini nati con questa sindrome hanno tipicamente una testa piccola con lineamenti alterati, descritti come "faccia a luna", ed un pianto caratteristico che assomiglia al

miagolio di un gatto. Gli individui affetti di solito sopravvivono oltre l'infanzia, ma presentano forte ritardo mentale.

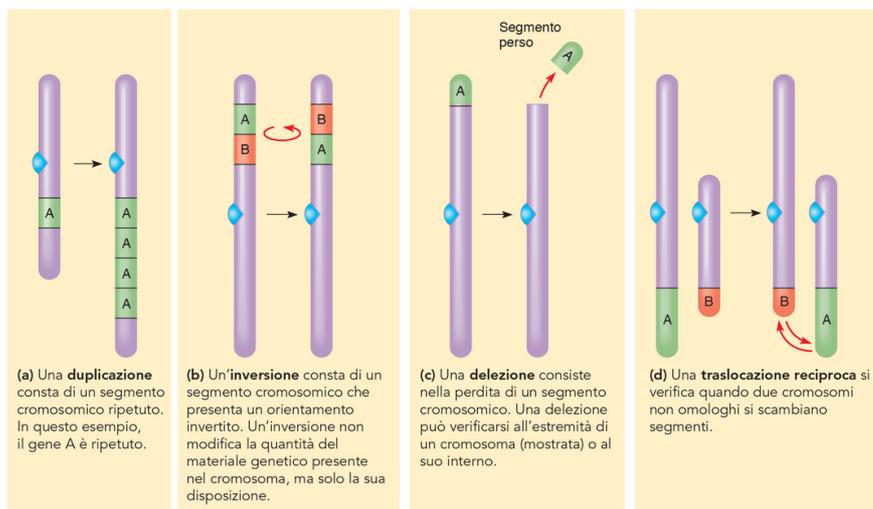


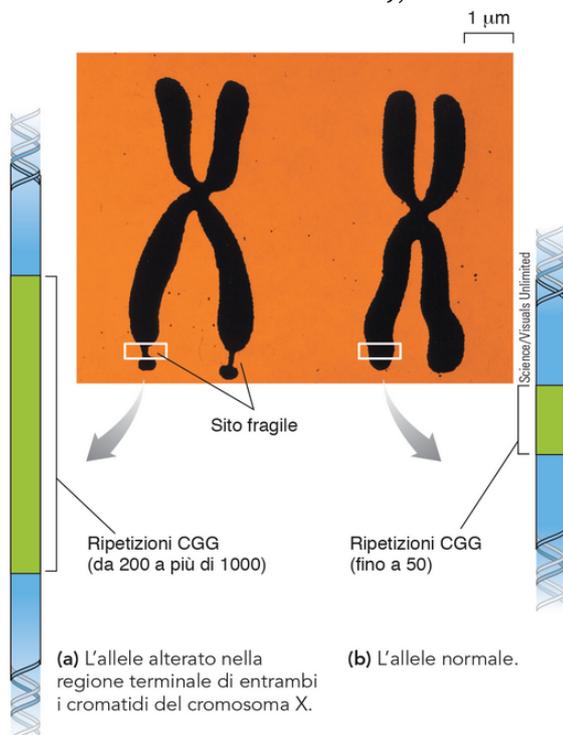
FIGURA 16-5  
Comuni anomalie nella struttura dei cromosomi

**I siti fragili sono punti deboli in siti specifici dei cromatidi**  
Un sito fragile, in cui parte di un cromatidio sembra essere attaccata al resto del cromosoma da un sottile filo di DNA, può presentarsi in una posizione specifica su entrambi i cromatidi di un cromosoma. Questi siti sono stati identificati sia sul cromosoma X, sia su alcuni autosomi. La posizione di un sito fragile è

esattamente la stessa in tutte le cellule di un individuo e nelle cellule di altri membri della famiglia. Vi sono prove sempre più forti che nelle cellule tumorali le rotture avvengano più facilmente a livello di questi siti fragili. Al momento non è noto se le cellule tumorali destabilizzano i siti fragili, oppure se i siti fragili stessi contengono geni che contribuiscono alla progressione tumorale.

Nella sindrome dell'X fragile, anche nota come sindrome di Martin-Bell, il sito fragile si trova vicino all'estremità terminale del cromosoma X, dove una tripletta di nucleotidi (CGG) è ripetuta da 200 a 1000 volte (FIG. 16-6). Nel cromosoma X normale, la tripletta CGG è invece ripetuta fino a 50 volte.

La sindrome dell'X fragile è la causa più comune di ritardo mentale ereditario. Gli effetti della sindrome dell'X fragile sono più pronunciati nei maschi che nelle femmine e vanno da una leggera incapacità di apprendere o di focalizzare l'attenzione ad un grave ritardo mentale ed iperattività. Secondo la Fondazione Nazionale per l'X fragile, circa l'80% dei maschi e il 35% delle femmine con la sindrome dell'X fragile sono affetti almeno da leggero ritardo mentale. Le femmine con la sindrome dell'X fragile sono di solito eterozigoti (dal momento che l'altro X è di solito normale) e generalmente hanno un'intelligenza normale. La scoperta del gene dell'X fragile nel 1991 e lo sviluppo del primo modello di topo con l'X fragile nel 1994 hanno dotato i ricercatori di strumenti per saggiare i potenziali trattamenti, compresa la terapia genica. Al microscopio, le cellule nervose degli individui affetti dalla sindrome dell'X fragile mostrano malformazioni a livello dei dendriti (la parte del neurone che riceve gli impulsi nervosi da altri neuroni). A livello molecolare, il numero eccessivo di ripetizioni della tripletta CGG associato alla sindrome dell'X fragile altera la funzionalità di un gene che codifica per una proteina detta proteina del ritardo mentale da X fragile (FMRP). Nelle cellule normali, la FMRP si lega a dozzine di molecole di mRNA differenti (la ragione di tali interazioni non è nota), mentre nelle cellule degli individui affetti dalla sindrome dell'X fragile l'allele mutato non consente la produzione della FMRP funzionale.



### L'imprinting genomico è determinato dall'ereditarietà uniparentale

Alcuni tratti sono il risultato dell'imprinting genomico o parentale, mediante il quale l'espressione di un gene in un determinato tessuto o in un preciso stadio di sviluppo è determinata dall'origine parentale, ossia è condizionata dalla trasmissione materna o paterna del gene. In alcuni geni imprintati, l'allele ereditato dal padre è sempre represso (non espresso) mentre per altri è quello materno ad essere represso. Ne consegue che i genomi materno e paterno hanno differenti alleli sottoposti a imprinting che determinano un'espressione genica differenziale nell'embrione. Come discusso nel Capitolo 14, l'ereditarietà epigenetica si riferisce alle diverse modalità di espressione di un gene in assenza di variazioni nella sequenza codificante del DNA. L'ereditarietà epigenetica può causare imprinting genomico.

FIGURA 16-6 *Sindrome dell'X fragile*

Immagine MES colorata di un cromosoma X con un sito fragile e di un cromosoma X normale.